



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE CYP450 POR BIOTINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. MARIA DOLORES RONQUILLO SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. J. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DRA. CRISTINA FERNANDEZ MEJIA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
DR. ROLANDO HERNANDEZ MUÑOZ
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR, U.N.A.M.

MEXICO, D.F. OCTUBRE DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A Dios

Que me da la vida y me permite estar en este momento y en este espacio, le doy gracias por guiarme y darme la perseverancia para alcanzar mis metas.

A mis padres

Por todo su amor y apoyo, por ser mi ejemplo e inspiración de superación y por creer en mí, este logro es para ustedes a cambio de lo mucho que me han dado, ¡los quiero mucho!.

A mis hermanos

Por apoyarme y estar conmigo siempre, deseo lo mejor para todos ustedes, los quiero.

A mi sobrina Blanquita

Por ser la lucecita que vino a iluminar nuestras vidas.

A toda mi familia, con cariño a mis tías Anita, Cadia y Clemencia.

A Miguel Angel Palafox

Mi ahora esposo que ha sido mi apoyo, inspiración y motor, gracias por tu cariño, comprensión, amor y paciencia ¡te amo!.

Al pueblo donde crecí, la Heroica Tetela de Ocampo, lugar hermoso enclavado en las montañas de la Sierra Norte de Puebla.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier Espinosa

Que es mi Papá académico, gracias por todo su apoyo y paciencia, por aceptarme como parte de su grupo de trabajo y por guiarme durante toda mi formación.

Al Dr. Rafael Camacho

Por todo su apoyo, comentarios y sugerencias que siempre reforzaron mi proyecto.

A la Dra. Cristina Fernández

Por ser mi tutora y por ayudarme, reforzar mi trabajo y guiarme siempre con sus comentarios y opiniones.

Al Dr. Rolando Hernández

Por ser parte de mi comité tutorial y por todas sus sugerencias para la mejora de este trabajo.

Se agradece el apoyo técnico brindado por la Biol. Sandra Luz Hernández, gracias por su infinita amabilidad, apoyo, paciencia y valiosa amistad.

Al Dr. Víctor Dávila

Por apoyarme en los momentos de incertidumbre y desconcierto, por su paciencia y valiosa amistad, gracias Vic.

Se agradece el apoyo técnico brindado por la Dra. Martha Elinos Baez.

A CONACYT por financiar mi proyecto.

Al Posgrado y Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A Azucena, Blanca y Norma por su amable atención y apoyo.

A Lucia Brito y la Biblioteca del Instituto de investigaciones Biomédicas por su amable atención en el préstamo de material bibliográfico.

A mis compañeros y amigos del laboratorio y de otros laboratorios, en especial a Cony, Netzi, Antonio Vallecillo, Claus, Blanquis y todas aquellas personas que no necesito nombrar, desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado su apoyo, colaboración, cariño y amistad.

A mi compañera y amiga Lupi Maya por todos los momentos que pasamos juntas, gracias por tu invaluable amistad.

A la Dra. Lourdes Millán

Que desde mi formación en la licenciatura me motivo y apoyo a desarrollarme en el mundo de la investigación.

A todos mis maestros que contribuyeron con mi formación académica.

INDICE

1. RESUMEN.....	13
2. ABSTRACT.....	15
3. ABREVIATURAS.....	17
4. ANTECEDENTES.....	19
4.1 LA BIOTINA.....	19
4.1.1 Historia.....	19
4.1.2 Propiedades fisicoquímicas.....	20
4.1.3 Síntesis, absorción y metabolismo de la biotina.....	21
4.1.4 Catabolismo de la biotina.....	24
4.1.5 Efectos de la suplementación de biotina en la regulación de genes.....	24
4.1.5.1 Mecanismos que median los efectos de biotina en la expresión de genes.....	25
4.1.5.1.1 Vía de señalización GC/GMPC PKG.....	26
4.1.5.1.2 Biotinilación de histonas.....	27
4.1.6 Toxicidad de la biotina.....	28

4.2 FASES DEL METABOLISMO.....	29
4.3 CITOCROMO P450.....	34
4.3.1 Nomenclatura.....	42
4.3.2 Reacciones.....	45
4.3.3 Ciclo catalítico del CYP450.....	47
4.3.4 Toxicidad del CYP450.....	49
4.3.5 Mecanismos de regulación del CYP450.....	50
4.3.5.1 Regulación vía Receptor de Aril Hidrocarburo (AHR).....	51
4.3.5.2 Receptores nucleares (NRs).....	53
4.3.5.3 Regulación vía Receptor pregnano X (PXR).....	55
4.3.5.4 Regulación vía Receptor constitutivo de androstano (CAR).....	57
4.3.5.5 Estabilización de mRNA y proteínas.....	59
4.3.5.6 Regulación vía miRNAs.....	60
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	63
6. HIPÓTESIS.....	64
7. OBJETIVO GENERAL.....	64
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
9. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	65

10. MATERIAL Y MÉTODOS	66
10.1 Reactivos.....	66
10.2 Estudio in vivo.....	66
10.2.1 Animales tratados con biotina.....	66
10.2.2 Animales tratados con biotina más B(a)P.....	67
10.2.3 Obtención de Fracciones S9 y microsomal.....	67
10.2.4 Aislamiento de ARN total.....	68
10.2.5 Transcripción reversa.....	69
10.2.6 PCR en Tiempo real.....	70
10.2.7 RT-PCR en Tiempo Real para evaluar la expresión de los mir-27b, miR-122 y miR-328a.....	71
10.2.8 Determinación de la actividad enzimática.....	72
10.2.9 Electroforesis en gel poliacrilamida e inmunodetección.....	73
10.3 Estudios in Vitro.....	73
10.3.1 Interacciones biotina-CYPs.....	73
10.3.2 Ensayo de Ames.....	74
10.4 Estadística.....	74
11. RESULTADOS	75
11.1 PCR en Tiempo Real.....	75
11.2 Inmunodetección y análisis densitométrico.....	79
11.3 Determinación de la actividad enzimática.....	84

11.4 Determinación de los efectos de biotina en la actividad de CYP1A inducida con B(a)P.....	86
11.5 Determinación de la posible interacción de biotina en las actividades de CYP1A1 y CYP1A2.....	87
11.6 Ensayo de Ames.....	88
11.7 Predicción in silico de la interacción de miRNAs y CYPs.....	89
11.8 Expresión de miRNAs por PCR en Tiempo Real.....	117
12.- DISCUSIÓN.....	118
13.- CONCLUSIONES.....	125
14.- PERSPECTIVAS.....	126
15. ARTICULO PUBLICADO.....	127
16.- REFERENCIAS.....	136

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estructura de la biotina.....</i>	21
<i>Figura 2. Fuentes (a), metabolismo (b) y catabolismo (c) de biotina.....</i>	23
<i>Figura 3. Mecanismo de acción de biotina a través de la vía GC/CMPC/PKG.....</i>	27
<i>Figura 4. Ejemplos de xenobióticos presentes en el medio ambiente, alimentos y lugares de trabajo habitual.....</i>	30
<i>Figura 5. Reacciones de Biotransformación.....</i>	32
<i>Figura 6. Participación relativa de diferentes enzimas de fase I en el metabolismo de xenobióticos.....</i>	33
<i>Figura 7. Localización del sistema del citocromo P450 en el retículo Endoplásmico.....</i>	34
<i>Figura 8. Enzimas P450 identificadas en humanos.....</i>	35
<i>Figura 9. Estructura general de las isoenzimas del CYP450.....</i>	36
<i>Figura 10. Regiones comunes de anclaje de los CYP450 en la membrana lipídica.....</i>	37
<i>Figura 11. Orientación e inmersión de diferentes citocromos en la Membrana.....</i>	37
<i>Figura 12. Ryo Sato y Tsuneo Omura.....</i>	38

<i>Figura 13. Complejo CYP- monóxido de carbono.....</i>	39
<i>Figura 14. Pico de Soret</i>	40
<i>Figura 15. Abundancia de los CYP450 en el hígado humano.....</i>	41
<i>Figura 16. Nomenclatura y clasificación de CYP450.....</i>	43
<i>Figura 17. Mecanismo de acción del citocromo P450.</i>	44
<i>Figura 18. Reacciones enzimáticas de oxidación.....</i>	45
<i>Figura 19. Reacciones catalizadas por el citocromo P450.....</i>	46
<i>Figura 20. Ciclo catalítico del citocromo P450.....</i>	47
<i>Figura 21. Activación de compuestos por CYP450.....</i>	49
<i>Figura 22. Factores que modulan la expresión, proteína y actividad del CYP450.....</i>	50
<i>Figura 23. Regulación de CYP1 por AHR.....</i>	52
<i>Figura 24. Clasificación filogenética de los receptores nucleares.....</i>	53
<i>Figura 25. Estructura primaria, secundaria y terciaria de los receptores nucleares.....</i>	54
<i>Figura 26. PXR</i>	57
<i>Figura 27. Estructura tridimensional del receptor CAR.....</i>	58

<i>Figura 28. Biogenesis de los miRNAs.....</i>	62
<i>Figura 29. Integridad del mRNA.....</i>	69
<i>Figura 30. Efecto curso-temporal de la biotina en la abundancia del mRNA de los CYPs.....</i>	76-78
<i>Figura 31. Inmunodetección y análisis densitométrico del CYP1A1.....</i>	79
<i>Figura 32. Inmunodetección y análisis densitométrico del CYP1A2.....</i>	80
<i>Figura 33. Inmunodetección y análisis densitométrico del CYP1B1.....</i>	81
<i>Figura 34. Inmunodetección y análisis densitométrico del CYP2E1.....</i>	82
<i>Figura 35. Inmunodetección y análisis densitométrico del CYP3A2.....</i>	83
<i>Figura 36. Actividad enzimática de CYPs.....</i>	84
<i>Figura 37. Actividad de CYP1A1 y CYP1A2.....</i>	86
<i>Figura 38. Determinación de la posible interacción química de biotina con los sustratos de CYP1A1 y CYP1A2.....</i>	87
<i>Figura 39. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A1 de rata con la secuencias del pre-miR-27b y miR-27b maduro de rata.....</i>	89-92
<i>Figura 40. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A1 de rata con la secuencias del pre-miR-122 y miR-122 maduro de rata.....</i>	93-96

<i>Figura 41. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A1 de rata con la secuencias del pre-miR-328a y miR-328a maduro de rata.....</i>	97-99
<i>Figura 42. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A2 de rata con la secuencias del pre-miR-27b y miR-27b maduro de rata.....</i>	100-106
<i>Figura 43. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A2 de rata con la secuencias del pre-miR-122 y miR-122 maduro de rata.....</i>	107-111
<i>Figura 44. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A2 de rata con la secuencias del pre-miR-328a y miR-328a maduro de rata.....</i>	112-116
<i>Figura 45. Expresión de los miR-27b, miR-122, miR-328a en hígado de ratas tratadas con biotina.....</i>	117
<i>Figura 46. Posible mecanismo.....</i>	123

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Nomenclatura de los CYP450.....</i>	42
<i>Tabla 2: Evaluación de la mutagenicidad de la fracción S9 de ratas tratadas con biotina en el ensayo de Ames.....</i>	88

1. RESUMEN

La biotina en concentraciones farmacológicas modifica la expresión de diversos genes entre los que destacan algunos que tienen un papel central en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. De acuerdo con estos hallazgos se ha encontrado que la suplementación de biotina mejora la homeostasis de glucosa, por lo que se han desarrollado medicamentos disponibles comercialmente que contienen dosis farmacológicas de biotina solas o en combinación con otros fármacos para el tratamiento de dislipidemias y diabetes. A pesar de su uso y disposición comercial existen pocos y controversiales estudios que evalúan su toxicidad y no existen reportes que evalúen aspectos como su efecto sobre los Citocromos P540 in vivo a excepción del CYP1B1 in vitro.

Estudios de microarreglos encontraron que la suplementación con biotina aumenta el mRNA que codifica para el CYP1B1 *in Vitro*, en células mononucleares de sangre periférica y la activación transcripcional de este gen fue asociada con un aumento en la actividad de CYP1B1 en linfocitos humanos y con el aumento de la frecuencia de rompimiento de hebras de DNA de cadena sencilla.

Los CYP450 son una superfamilia de enzimas que metabolizan compuestos endógenos y exógenos denominados "xenobióticos". La expresión de estas enzimas puede ser inducida o inhibida teniendo diversas repercusiones que pueden causar efectos adversos en la salud, por lo que el objetivo principal de este estudio fue evaluar en un modelo in vivo, el efecto producido por la administración de dosis farmacológicas de la vitamina biotina en la expresión y actividad de los CYP450 1A1, 1A2, 1B1, 2E1 y 3A2; enzimas que participan en el metabolismo de compuestos pro-carcinógenos, fármacos de uso habitual y diversos compuestos endógenos, mediante la determinación de los niveles de RNA mensajero, proteína y actividad enzimática en hígado de ratas. Se usaron ratas macho de la cepa Wistar que se dividieron en ocho grupos, cuatro control y

cuatro experimentales (4 animales por grupo). Los grupos experimentales se trataron diariamente con biotina en dosis de 2 mg/kg vía intraperitoneal por 1, 3, 5 y 7 días y se sacrificaron por dislocación cervical 24 horas después de la última administración. Los grupos control se trataron exactamente igual que los experimentales pero se les inyectó con el vehículo (amortiguador de fosfatos). Posteriormente, se determinaron los niveles de RNA mensajero mediante PCR en tiempo real y los niveles de proteína por Western blot. La actividad enzimática fue determinada mediante el uso de sustratos específicos.

Los resultados obtenidos mostraron que la administración de biotina vía IP en el modelo de rata modificó la transcripción de las sub-familias 1A y 1B, pero no produjo cambios ni en la actividad ni en la concentración de las proteínas estudiadas; lo que sugiere que estas enzimas también están siendo reguladas postranscripcionalmente.

Se confirmó la carencia del efecto de biotina en la actividad de CYP1A1 por medio de otras estrategias experimentales como: i) co-tratamiento de los animales con biotina (2mg/kg, i.p.) + BaP (un inductor conocido de CYP1A); ii) adición de biotina a la mezcla de reacción para medir la actividad de CYP1A1 y CYP1A2; iii) ensayo de Ames con fracciones S9 de ratas tratadas con biotina.

Los resultados indican que la biotina no interfiere con la actividad de CYP1A y sugieren que no influye en el metabolismo de xenobióticos mediado por CYP1A.

2. ABSTRACT

Pharmacological doses of biotin affect the expression of several genes, some which have a central role on glucose and lipid metabolism. In agreement with these findings, it was found that biotin supplementation improves glucose and triglyceride homeostasis, which has led to the development of commercially available medications containing pharmacologically amounts of biotin alone or in combination with other drugs for the treatment of dyslipidemias and diabetes. Despite its commercial use and disposal, few and controversial studies have addressed the toxicity of biotin and there are no reports that assess aspects such as its effect on cytochrome P540 *in vivo* with the exception of CYP1B1 *in vitro*. DNA microarray studies have provided evidence that biotin supplementation increases the levels of mRNA encoding cytochrome 1B1 (CYP1B1) in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. In addition, the transcriptional activation of this gene was associated with increased activity of CYP1B1 in human lymphoid cells and with the increased frequency of single-stranded DNA breaks.

CYP enzymes are a superfamily of enzymes that metabolize endogenous compound and foreign substances (xenobiotics). CYP expression is subject to induction or inhibition that results in adverse health effects, so the main objective of this study was to analyze the effect of pharmacological doses of biotin on the modulation of gene expression and activity of CYP450 1A1, 1A2, 1B1, 2E1 and 3A2 isoforms; enzymes that are involved in the metabolism of procarcinogens, commonly used drugs and various endogenous compounds by determination of messenger RNA levels, protein and enzyme activity in rat liver.

Male rats of Wistar strain were divided into eight groups, four control and four experimental (4 animals per group). The experimental groups were treated daily with biotin, (2mg/kg, intraperitoneally) for 1, 3, 5 and 7 days, and sacrificed by cervical dislocation 24 hours after the last administration. The control groups were treated exactly like the experimental but injected with vehicle (phosphate buffer).

The mRNA levels were determined by real time PCR, the protein levels by Western blotting and the enzyme activity was determined by using specific substrates.

Compared to controls, biotin modified the mRNA of CYP1A1 and CYP1A2 while enzyme activity and protein concentration were not affected. Increased mRNA level was not correlated with the protein or activity suggesting that these enzymes are also being regulated post-transcriptionally.

The lack of effect of biotin on CYP1A1 activity was confirmed with other experimental strategies such as: i) co-treatment of animals with biotin (2mg/kg, ip) + BaP (a known CYP1A inducer), ii) addition of biotin to the reaction mixture for the measurement of CYP1A1 and CYP1A2 activities and iii) Ames test with S9 fractions from rats treated with biotin.

The results indicate that biotin do not interfere with CYP1A activity, and suggest that it does not influence the CYP1A-mediated metabolism of xenobiotics.

3. ABREVIATURAS

ACC1	Acetil CoA carboxilasa 1 (citosólica)
ACC2	Acetil-CoA carboxilasa 2 (mitocondrial)
AhR	Receptor de arilhidrocarburos
B[a]P	Benzo(a)pireno
CAR	Receptor constitutivo de androstano
cDNA	ADN complementario
CYP	Citocromo P450
CYP1A1	Citocromo P540 1A1
CYP1A2	Citocromo P540 1A2
CYP1B1	Citocromo P540 1B1
CYP2E1	Citocromo P540 2E1
CYP3A2	Citocromo P540 3A2
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EROD	Etoxrresorufin-O-demetilasa
FAD	Flavin adenin dinucleótido
FMN	Flavin mononucleótido
GC	Guanilato ciclasa
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
HCS	Holocarboxilasa sintetasa
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry nomenclature
kDa	kiloDalton

MCC	β -metilcrotonil-CoA carboxilasa
mg	Miligramo
min	Minuto
miRNA	Micro RNA
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleíco mensajero
MROD	Metoxirresorufin-O-demetilasa
NADH+H	Nicotinamida adenina nucleótido (forma reducida)
NADPH	Nicotinamida adenina nucleótido (forma reducida y fosforilada)
PC	Piruvato carboxilasa
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RE	Retículo endoplásmico
S9	Fracción postmitocondrial
SMVT	Transportador multivitamínico dependiente de sodio
XRE	Elemento de respuesta a xenobióticos

4. ANTECEDENTES

4.1 La Biotina

La biotina (del griego *bios*, “vida”), es una vitamina hidrosoluble del complejo B también llamada vitamina H, vitamina B7 o coenzima R (Zempleni et al. 2009; Medical Dictionary 2011), cuya función más conocida en el organismo es la de actuar como grupo prostético de las carboxilasas las cuales catalizan reacciones claves de carboxilación del metabolismo intermediario (Chapman-Smith y Cronan 1999; McMahon 2002).

Los humanos como otros mamíferos no podemos sintetizarla, de tal forma que debemos obtenerla de la dieta, las fuentes animales que la contiene son la carne, leche, yema de huevo, el hígado o vísceras en general y las fuentes vegetales que la aportan son la levadura de cerveza, las setas, los cereales, guisantes y nueces. Las bacterias intestinales la sintetizan en menor cantidad por la síntesis *de novo* (Said 2012).

4.1.1 Historia

En 1901, E. Wildiers descubre que la levadura necesita un factor especial de crecimiento al que denomina "*factor bios*". En siguientes investigaciones al "*factor bios*" se le denominó *biotina* (Lanska 2012).

En 1916, Bateman, observó que las ratas alimentadas con una dieta basada en clara de huevo cruda como única fuente de proteína, presentan un síndrome caracterizado por trastornos neuromusculares, dermatitis grave y pérdida de pelo. En 1927, Boas, en Inglaterra, reportó que la alimentación con clara de huevo producía dermatitis en ratas (Boas 1927).

En 1931, P Giörgy descubre en el hígado un factor curativo del trastorno producido por la clara de huevo al que denominó vitamina H, tomando la primera letra de la palabra piel en alemán: haut (Melo V. 2004).

En 1935, Kögl y Tönnis aislaron a partir de la yema de huevo en forma cristalina un factor esencial para el crecimiento de levadura al que llamaron biotina (Kögl 1932). Después se demostró que esta última y el factor que protegía contra la toxicidad de la clara de huevo son uno mismo.

En 1942, Kögl y col. en Europa, y Du Vigneaud y col. en Estados Unidos identifican la estructura química de la biotina y la sintetizan poco tiempo después.

Entre tanto, la naturaleza del antagonista de la biotina en la clara de huevo fue objeto de estudios extensos. El compuesto resultó ser una proteína, aislada por vez primera por Eakin y col. en 1940 y la denominaron avidina. Esta última es una glucoproteína que en la clara de huevo cruda se une con gran afinidad a la biotina y así, evita su absorción. Este efecto se puede evitar al cocer la proteína de la clara de huevo (Dakshinamurti y Chauhan 1989).

Hacia la década de los 50s se habían identificado tres formas de biotina, además de la biotina libre: biocitina (e-biotinil-L-lisina), y los sulfóxidos D y L de la biotina. Si bien las formas derivadas de la biotina son activas para apoyar el crecimiento de algunos microorganismos, se desconoce su eficacia como sustitutos de la biotina en la nutrición humana. Para entonces quedó bien establecido que la biotina forma parte de las enzimas carboxilasas que actúan en el metabolismo de la glucosa, ácidos grasos, aminoácidos y purinas.

4.1.2 Propiedades fisicoquímicas

El nombre químico de la biotina asignado por la IUPAC es ácido hexahidro-2-oxo-1H-tieno-[3,4-d]imidazol-4-pentanoico. Es un ácido monocarboxílico con peso molecular de 244.31 g/ mol, hidrosoluble (0.02% p/v) y en etanol (0.08% p/v), estable al calor y susceptible a la oxidación. Su estructura química consiste de dos anillos heterocíclicos, uno de ellos contiene un grupo ureido (-N-CO-N-), y el otro anillo contiene azufre, formando un anillo de tetrahidrotiofeno, unidos a una

cadena de ácido valérico que le confiere la propiedad ácida (pH 4.51) (Said et al. 1989; Mock 1999) (Figura 1).

Existen 8 isoformas de biotina de las cuales solo una de ellas, la d-(+)-biotina o D-biotina se encuentra en la naturaleza y es enzimáticamente activa (Said 2012).

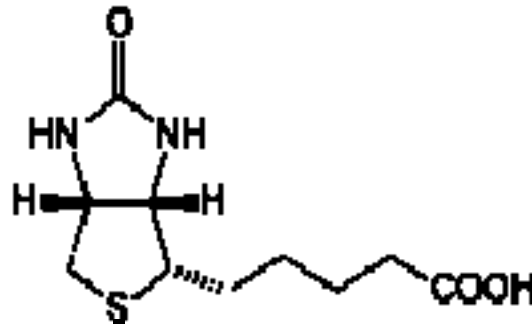


Figura 1. Estructura de la Biotina.

4.1.3 Síntesis, absorción y metabolismo de la biotina

A excepción de las bacterias los organismos superiores son incapaces de sintetizarla y por lo tanto dependen completamente de la dieta para satisfacer sus requerimientos; para esto, han desarrollado un ciclo muy eficiente que asegura la adecuada suplementación y utilización de esta vitamina (Figura 2b).

La biotina se encuentra de forma libre en los alimentos o unida covalentemente a proteínas por un residuo de lisina (Figura 2a). Una vez ingerida el enlace entre la biotina y la lisina es roto por la proteasa biotinidasa, una enzima presente en el jugo pancreático, formando biocitina (biotina unida a residuos de lisina y péptidos pequeños), la biotina libre se absorbe por los enterocitos de la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno a través del un transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) (Dakshinamurti et al. 1987; Said 2009) .

La biotina se absorbe en el intestino y atraviesa la membrana de los enterocitos por un transportador multivitaminico dependiente de sodio (SMVT). Una vez dentro de la célula la biotina se une específicamente a un grupo ξ -amino de un residuo de lisina de las carboxilasas, reacción catalizada por la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS).

Cuatro de estas enzimas, piruvato carboxilasa (PC), propionil-CoA carboxilasa (PCC), β -metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) y acetil-CoA carboxilasa 2 (ACC2) son mitocondriales y solo la acetil CoA carboxilasa 1 (ACC1) es citosólica. Estas carboxilasas catalizan pasos esenciales en el metabolismo de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos.

El paso final de la degradación de las carboxilasas es el rompimiento de la fracción biotinil del grupo ξ -amino de lisina y es catalizado por la enzima biotinidasa, resultando en la liberación de biotina libre la cual puede ser nuevamente reciclada (Fig.2b) (McMahon 2002).

La importancia de este ciclo es mantener los niveles de biotina dentro de la célula y es evidenciada por el hecho de que mutaciones en ambas, biotinidasa u holocarboxilasa sintetasa resulta en desordenes metabólicos letales (Pacheco-Alvarez et al. 2002).

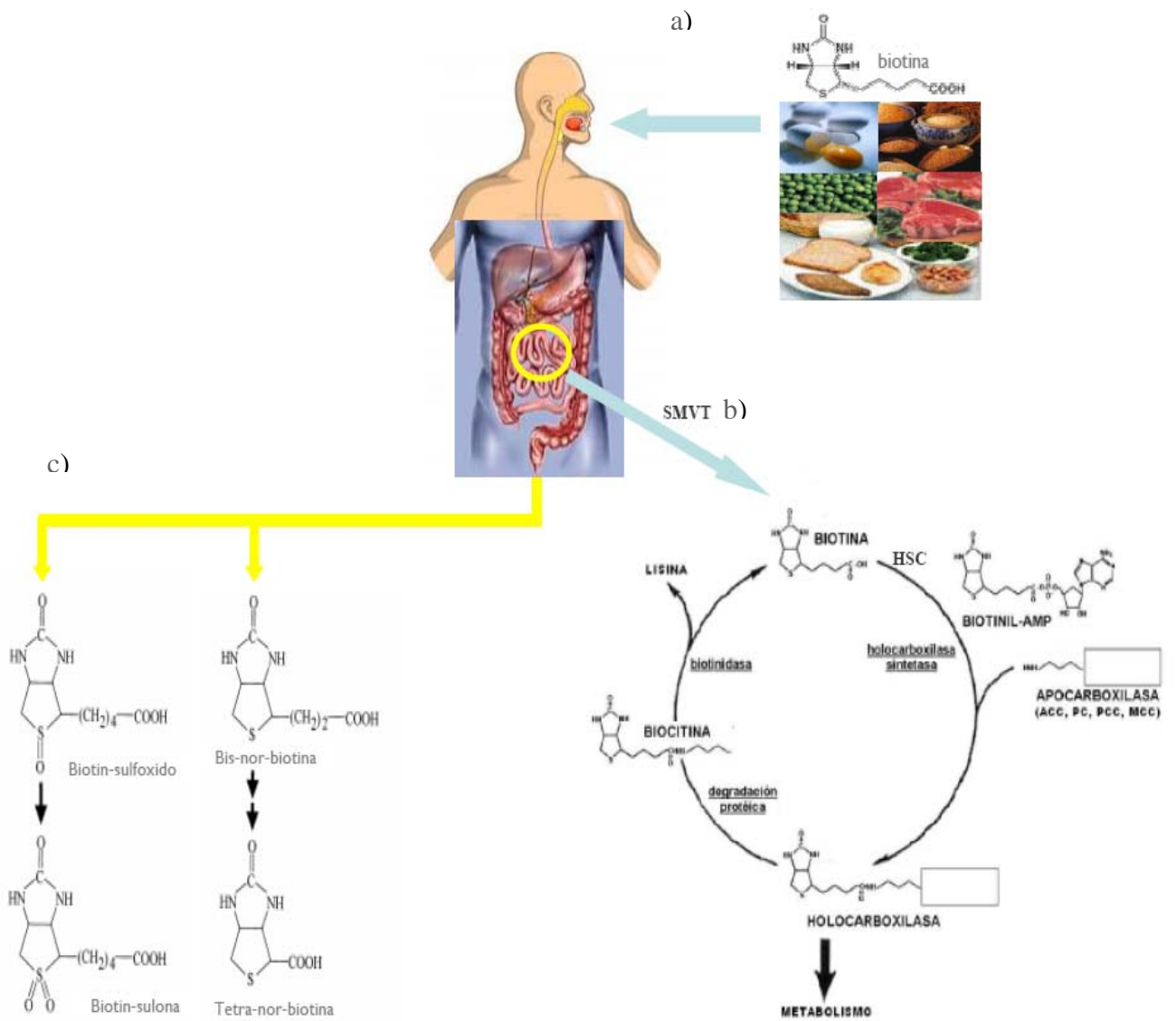


Figura 2. Fuentes (a), metabolismo (b) y catabolismo (c) de biotina.

4.1.4 Catabolismo de la biotina

En una serie de estudios pioneros en microorganismos McCormick y col. elucidaron las 2 regiones de la molécula de biotina que son catabolizadas primariamente. En la cadena del ácido valérico, la biotina es catabolizada por β -oxidación (Figura 2c).

El repetido anclaje de 2 unidades de carbono permite la formación de bisnorbiotina, tetranorbiotina y metabolitos relacionados que son conocidos como resultantes de la β -oxidación (p.e., α , β -dehidro-, β -hidroxi- y β -ceto intermediarios en oxidaciones sucesivas de la cadena de 5 carbonos). Si el lugar donde se lleva a cabo la β -oxidación tiene lugar en la mitocondria o en peroxisomas es desconocido. β -cetobiotina y β -cetobisnorbiotina son inestables y pueden decarboxilarse espontáneamente a bisnorbiotin metil cetona y tetranorbiotin metil cetona (Zempleni et al. 1997, McCormick et al. 1997).

El azufre del anillo heterocíclico puede ser oxidado a sulfoxido-L o -D de biotina y biotin sulfona (Figura 2c). La oxidación del azufre de biotina ocurre en el retículo endoplásmico por un proceso NADPH-dependiente (Lee et al. 1970). Los metabolitos de la sulfur-oxidación o β -oxidación de la biotina se han identificado en mamíferos (Zempleni y Mock 1999).

4.1.5 Efectos de la suplementación de biotina en la regulación de genes.

De manera independiente de su papel clásico como grupo prostético de las carboxilasas se ha reportado que la biotina en concentraciones farmacológicas modifica la expresión de diversos genes tanto a nivel transcripcional como a nivel de la traducción (Dakshinamurti y Litvak 1970; Rodríguez-Melendez y Zempleni 2003; Wiedmann et al. 2004; Rodríguez-Melendez et al. 2005). Entre los genes que modifica se encuentran genes relacionados con el metabolismo (Chauhan et al. 1991; Dakshinamurti et al. 1994; Borboni et al. 1996; Romero-Navarro et al. 1999; De La Vega et al. 2000; Fernandez-Mejia 2005; Vilches-

Flores et al. 2009) y otros relacionados con diversas funciones como la morfogénesis, inmunidad, diferenciación y metabolismo de xenobióticos como el citocromo 1B1 (Spence et al. 1984; Bhullar et al. 1985; Dakshinamurti et al. 1988; Watanabe et al. 1990; Chauhan et al. 1991; Watanabe et al. 1995; Watanabe 1996; Baez-Saldana et al. 1998; Pacheco-Alvarez et al. 2002; Rodriguez-Melendez et al. 2003; Rodriguez-Melendez et al. 2004; Wiedmann et al. 2004).

4.1.5.1 Mecanismos que median los efectos de biotina en la expresión de genes.

Si bien diversos estudios demuestran la regulación de la expresión de genes por biotina (Rodriguez-Melendez et al. 2001; Wiedmann et al. 2004; Dakshinamurti 2005) los mecanismos moleculares por los cuales se producen sus efectos son desconocidos. Hasta el momento se han descrito dos mecanismos:

- 1) Activación de la guanilato ciclasa soluble/proteína cinasa G (GC/PKG).
- 2) Remodelación de la cromatina por biotilación de histonas.

Estos mecanismos no son mutuamente exclusivos y podrían coexistir en células humanas.

4.1.5.1.1 Vía de señalización GC/GMPc/PKG.

Esta cascada de transducción de señales fue estudiada en 1982, donde encontraron que la adición de biotina aumentaba la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GCs) in vitro (Vesely 1982), posteriormente estudios in vivo demostraron que el efecto de biotina esta mediado por el aumento de las concentraciones intracelulares de un segundo mensajero, el guanosin monofosfato cíclico (GMPc). Solórzano et al. han propuesto que el compuesto biotinil-AMP es el vínculo en la cascada de fosforilaciones involucradas en la regulación de la expresión genética por la biotina (Solorzano-Vargas et al. 2002). La síntesis de este compuesto es catalizada por la holocarboxilasa sintetasa. Estos investigadores encontraron que la regulación de la expresión de la acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1), propionilCoA carboxilasa y de la propia holocarboxilasa sintetasa requiere de la actividad enzimática de la holocarboxilasa sintetasa. Con base en sus resultados proponen que el biotinil-AMP, por un mecanismo aún no conocido, activa la guanilato ciclasa soluble, y que, de esta manera, se incrementa el contenido de GMPc, que a su vez activa a la PKG, favoreciendo así una serie de fosforilaciones que modifican la expresión de los genes (Figura 3).

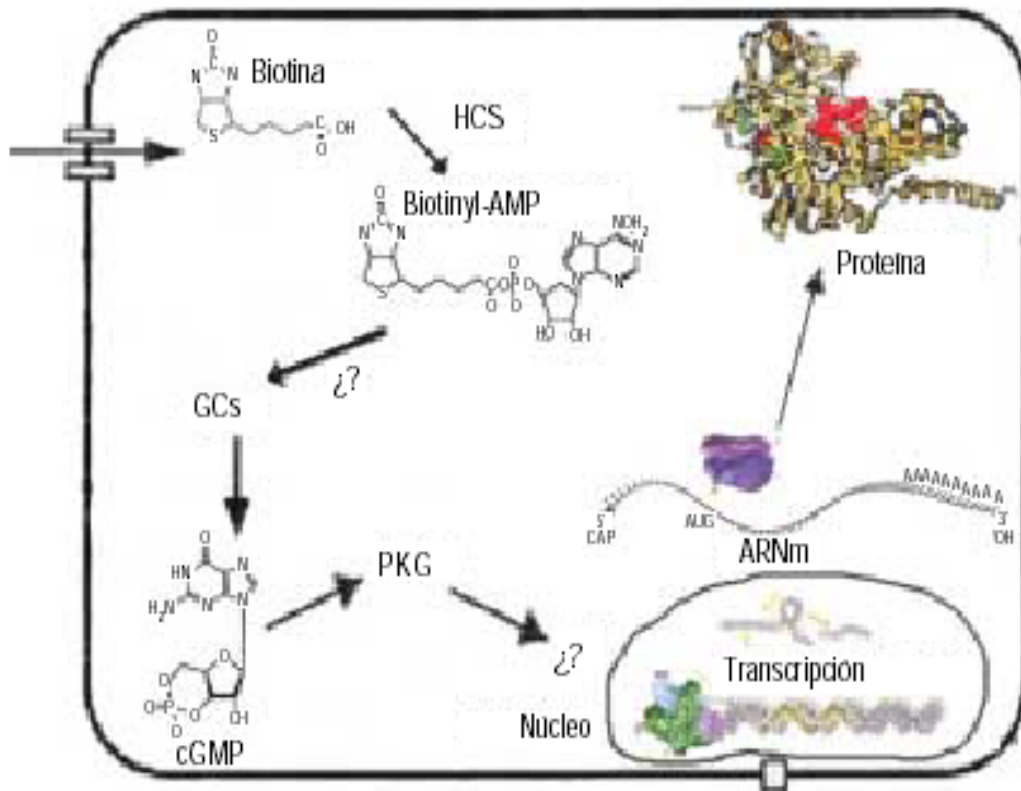


Figura 3. Mecanismo de acción de biotina a través de la vía GC/CMPC/PKG.

4.1.5.1.2 Biotinilación de histonas.

A pesar de que varios estudios demostraron que las histonas son susceptibles a ser biotiniladas (Hymes et al. 1995; Stanley et al. 2001; Hassan y Zempleni 2006) investigaciones recientes han cuestionado este posible mecanismo de regulación por biotina (Bailey et al. 2008; Healy et al. 2009).

4.1.6 Toxicidad de la biotina.

Pocos y controversiales son los estudios de la toxicidad de esta vitamina, ya que mientras algunos autores reportan que a pesar del uso prolongado de biotina a altas dosis tanto en modelos animales como en humanos no se observaron efectos adversos (Bonjour 1991; Baumgartner y Suormala 1997; Fiume 2001) otros autores reportan irregularidades en el ciclo estral y reabsorción de fetos y placenta en ratas preñadas y gestantes (Paul et al. 1973). En un estudio en plantas el potencial mutagénico fue a una dosis de 244.3 mg/ml (Ma et al. 1984) mientras que en otro modelo mediante el uso de la prueba de Ames no presentó mutagenicidad (Fiume 2001) al igual que en el modelo bacteriano RK (Hayes et al 1984). La DL_{50} oral para ratas y ratones es de 10 g/kg de peso y 354 mg/g de peso respectivamente (Bonjour 1991). La DL_{50} i.p. en ratas es de 29 mg/kg de peso y la dosis i.v para ratones es de 1g/kg (Bonjour 1991).

No hay datos suficientes para concluir sobre la ingesta segura a altas dosis de biotina por lo que más estudios son necesarios.

4.2 Fases del metabolismo de los xenobióticos

A lo largo de su evolución, los organismos vivos han estado expuestos de forma continua a un número creciente de sustancias químicas extrañas presentes en su entorno y susceptibles de acceder a su interior de modo accidental. Para salvaguardarse del libre acceso de estos compuestos, los organismos vivos interponen una serie de barreras de naturaleza física o biológica. No obstante, un número indeterminado de los mismos es capaz de superar dichos mecanismos de protección y contactar con las células y tejidos produciendo efectos de diversa índole. Los compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano, pero que son capaces de acceder a su interior se conocen con el nombre genérico de xenobióticos. Se trata de compuestos de naturaleza química muy variada, algunos de los cuales son de origen natural, entre los que destacan las micotoxinas o los alcaloides, si bien la inmensa mayoría son productos originados por la propia actividad humana, como los contaminantes ambientales o los compuestos químicos de síntesis.

El vertiginoso desarrollo de la industria química en las últimas décadas ha hecho aumentar de forma excepcional el número de estos compuestos, con el correspondiente aumento del riesgo de contacto con los mismos. Algunas estimaciones elevan a varios miles el número de moléculas nuevas introducidas cada año y que engrosan la ya larga lista de xenobióticos.

Estos compuestos pueden acceder a nuestro organismo mediante ingestión, inhalación, por vía parenteral o a través de la piel. Entre los mismos se incluyen fármacos, cosméticos, aditivos alimentarios, pesticidas, productos de uso doméstico, derivados de la combustión de carburantes, residuos procedentes de la industria química, etc. (Figura 4).



Figura 4. Ejemplos de xenobióticos presentes en el medio ambiente, alimentos y lugares de trabajo habitual.

Los xenobióticos no son utilizados como nutrientes, por lo que no se incorporan a las rutas bioquímicas del metabolismo intermediario y no son degradados a través de estas vías metabólicas. Se trata, en general, de compuestos de naturaleza lipofílica por lo que pueden atravesar con relativa facilidad las membranas biológicas, acceder al interior de las células y unirse a estructuras celulares de carácter lipofílico. Al mismo tiempo, su eliminación del organismo es dificultosa, dado que la excreción de compuestos no volátiles se realiza a través de fluidos de naturaleza acuosa, principalmente orina.

Ante esta situación, los organismos vivos han desarrollado sistemas metabólicos alternativos para acelerar la eliminación de estos compuestos. Se trata de una serie de enzimas no integrados en las vías del metabolismo energético o intermediario del organismo y cuyos substratos son los xenobióticos. Su función es la de convertir los xenobióticos en moléculas más polares, más hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente excretables. El papel de estas enzimas es clave para la supervivencia celular. De no existir tales vías metabólicas, una vez en el interior del organismo estos compuestos tenderían a acumularse alterando el equilibrio celular y provocando alteraciones funcionales e incluso la muerte celular.

Al conjunto de procesos enzimáticos a los que se ven sometidos los xenobióticos en el organismo, en general, a su neutralización y eliminación se les conoce como reacciones de biotransformación o del metabolismo de xenobióticos. Tradicionalmente estos procesos se han agrupado en dos fases o etapas. En la fase I los xenobióticos son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y se convierten en productos más hidrosolubles gracias a la aparición de nuevos grupos funcionales de carácter polar (hidroxilo, amino, carboxilo). En la fase II los xenobióticos, o los metabolitos generados por las reacciones de la fase I, se combinan con moléculas endógenas de carácter polar para formar productos de conjugación que son rápidamente excretados (figura 5).

BIOTRANSFORMACIÓN

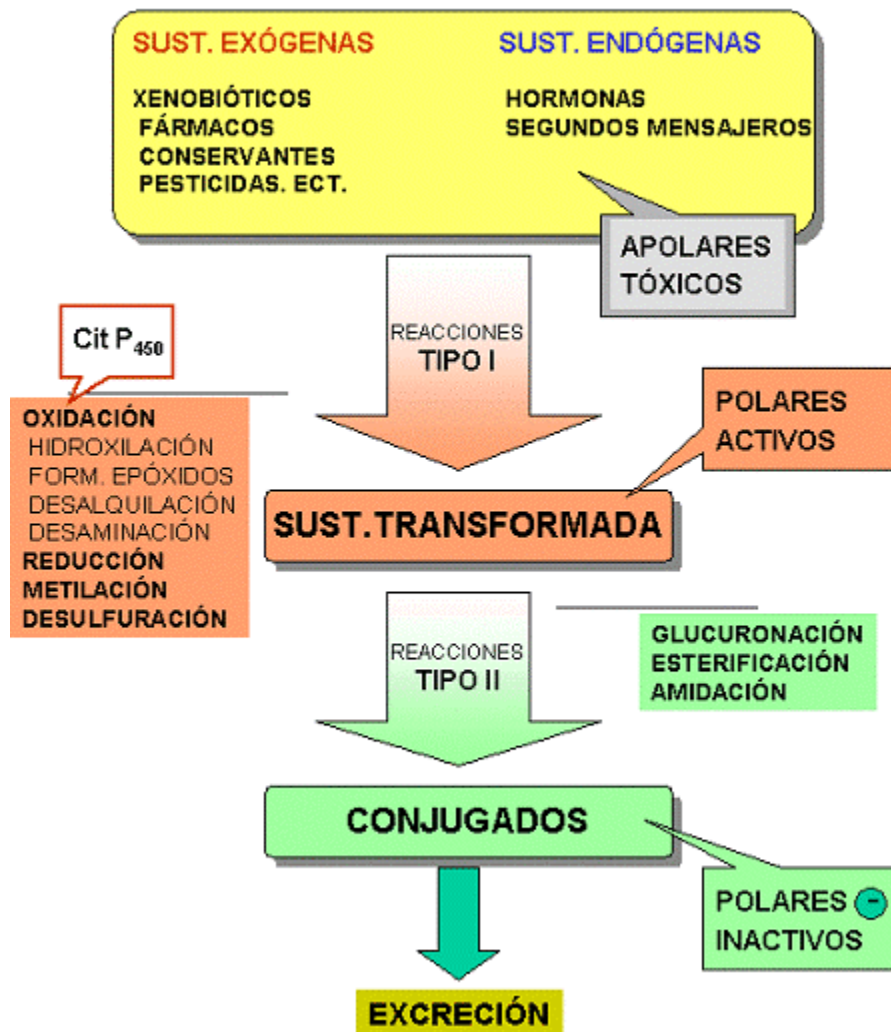


Figura 5. Reacciones de Biotransformación.

En general, las enzimas de fase I son capaces de transformar múltiples substratos y catalizar diferentes reacciones. Se trata de proteínas catalíticas de naturaleza muy diversa entre los que se incluyen enzimas con actividad monooxigenasa, como el citocromo P450 o la flavin monooxigenasa, diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas, aromatasas), la epóxido hidrolasa o esterasas y amidasas hepáticas y plasmáticas (Figura 6). El citocromo P450 es sin duda el miembro más destacado de este grupo de enzimas y el que ha sido más ampliamente estudiado.

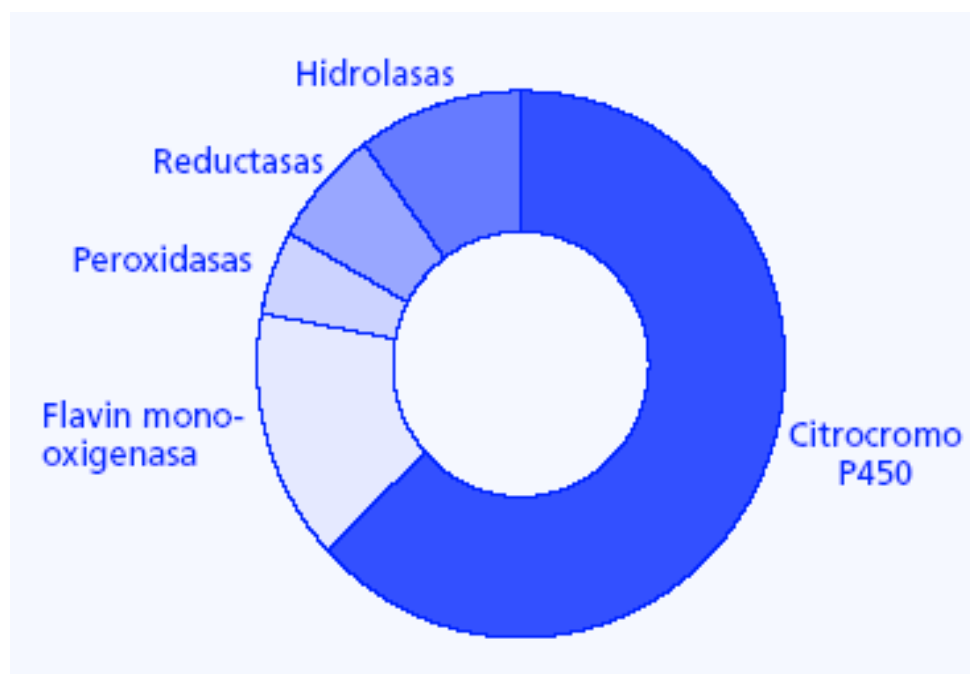


Figura 6. Participación relativa de diferentes enzimas de fase I en el metabolismo de xenobióticos.

4.3 Citocromo P450

El sistema enzimático del citocromo P450 (CYP450) constituye una superfamilia de hemoproteínas que catalizan el metabolismo de fase I de diversos compuestos endógenos como colesterol, ácidos biliares, hormonas (Capdevila et al. 2002) y compuestos exógenos denominados “xenobióticos” como fármacos, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, entre otros (Goepfert et al. 1995).

En organismos eucariontes se ha detectado prácticamente en todas las membranas subcelulares, acoplado intracelularmente a la mitocondria, y principalmente al retículo endoplásmico liso, junto con otras enzimas que transfieren electrones como: la citocromo P450 reductasa, el citocromo b5, y en caso de la mitocondria la ferredoxina reductasa (Figura 7). (Berka et al. 2011).

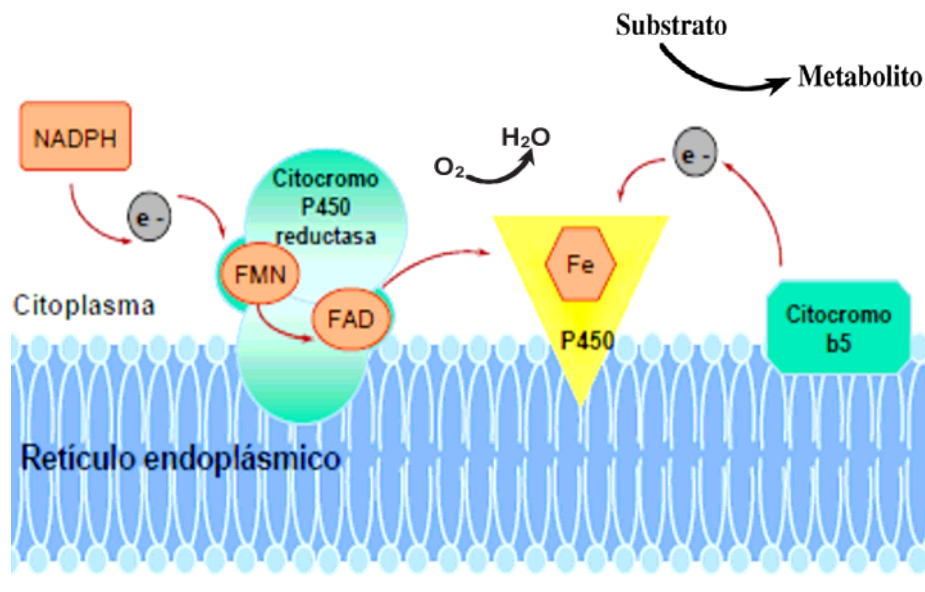


Figura 7. Localización del sistema del citocromo P450 en el retículo endoplásmico.

Estas enzimas se encuentran presentes en numerosas especies, desde bacterias a mamífero y a la fecha se han identificado más de 1,200 isoformas (Nelson et al. 1996). Actualmente están reportadas 7.700 secuencias de P450 distribuidas en 866 familias. 2.740 secuencias se encuentran en animales y 2.675 en plantas (Donato 2004), aunque estos datos se encuentran en continua evolución (figura 8). Actualmente se conocen, en humanos, 18 familias y 43 subfamilias (Nelson et al. 2004).

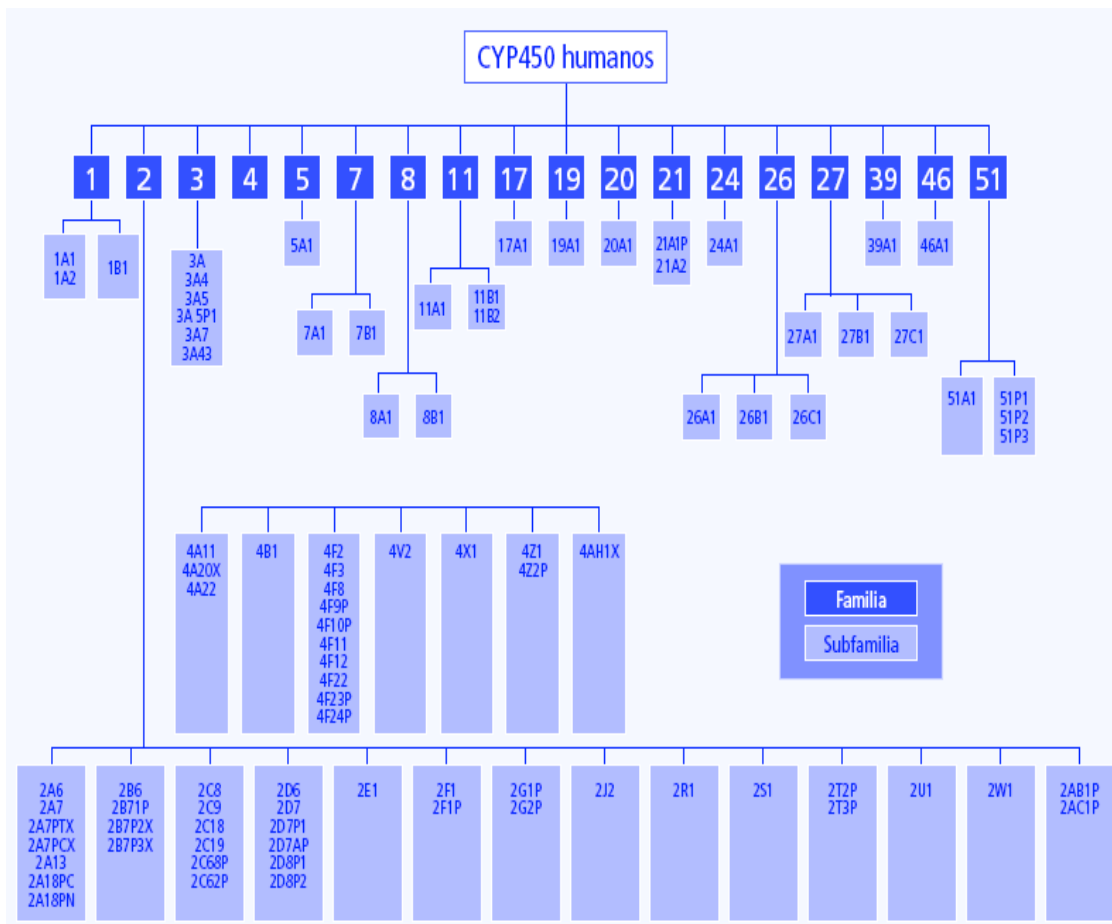


Figura 8. Enzimas P450 identificadas en humanos.

Al ser hemoproteínas los CYP450, poseen una parte proteica (apoproteína) y un grupo hemo o centro catalítico (grupo prostético) donde se localiza un átomo de hierro (Montellano 1995), el grupo hemo se encuentra unido no covalentemente a una cadena polipeptídica a través de una cisteína (Joel Griffith Hardman 2006).

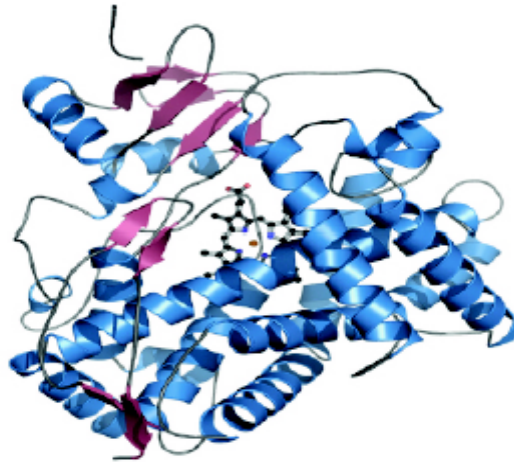


Figura 9. Estructura general de las isoenzimas del CYP450. El esquema de cintas corresponde a la estructura del CYP2D6 donde la estructuras de la α -hélice y β -plegada de la apoproteína están marcadas en azul y rojo respectivamente, y en la región media se observa el grupo hemo con un átomo de hierro al centro.

Las regiones más variables son las que constituyen los lugares de anclaje a la membrana o de unión y reconocimiento de sustratos (Gotoh 1992). La alta conservación de la región hemo, refleja un mecanismo común de transferencia de electrones y de protones y de activación de oxígeno (Williams et al. 2000). La enzima permanece anclado a la membrana a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo N-terminal, por lo que la mayor parte de la proteína se sitúa en la cara citosólica de la membrana (Figura 10, 11) (Chapple 1998, Berka et al. 2013). Esta hélice transmembranal está seguida, por regla general, por una serie de aminoácidos básicos cuyos residuos interaccionan con las cargas negativas de los lípidos de la membrana (Donato 2004).

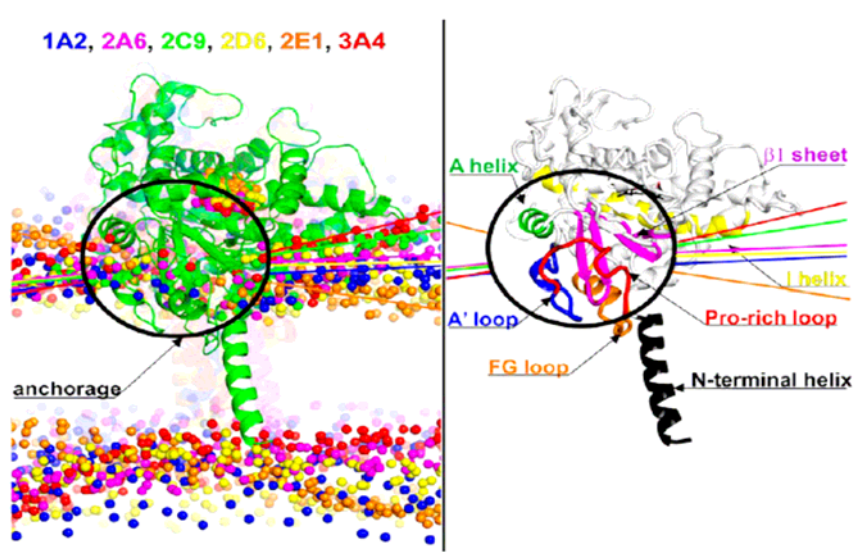


Figura 10. Regiones comunes de anclaje de los CYP450 en la membrana lipídica.

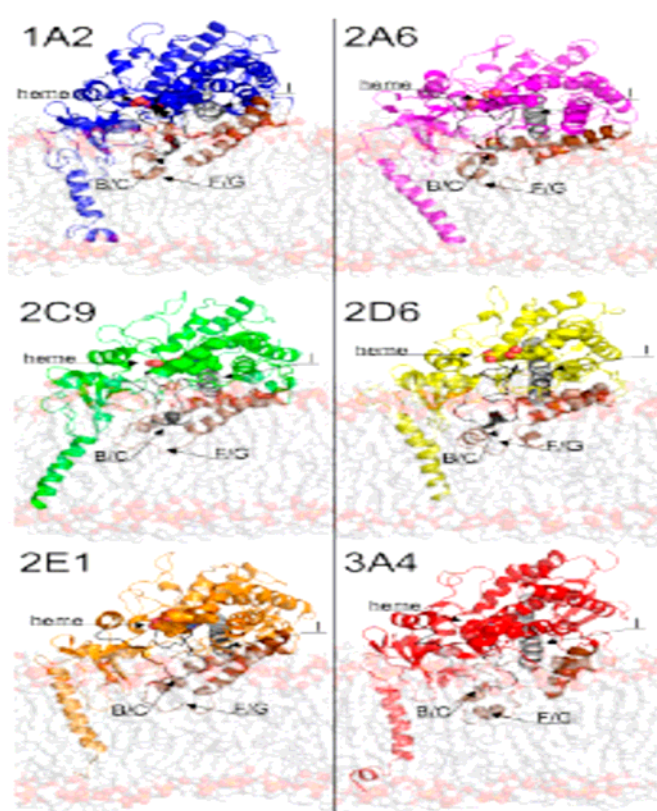


Figura 11. Orientación e inmersión de diferentes citocromos en la membrana. El sitio activo está parcialmente inmerso, mientras que el dominio N-terminal está profundamente inmerso.

El descubrimiento del citocromo P450 se remonta a la década de los años 50, en la que comenzaron a estudiarse unos pigmentos encontrados en células hepáticas, a los que se les denominó *citocromos*, del griego *bitos* (*kuVto*~ «hueco», «recipiente», «urna» —en biología *célula*—) y *croma* (*crwVma* «color»). A principios de esta década Martin Klingenberg, investigador alemán estaba estudiando las propiedades espectro-fotométricas de pigmentos en fracciones microsomales de hígados de rata. Él observó que al adicionar un agente reductor (ditiocionita de sodio) a microsomas diluidos previamente gaseados con monóxido de carbono, una única banda de absorbancia máxima a 450nm de longitud de onda aparecía en el espectro (Klingenberg 1958).

No sería hasta 1964 cuando Omura y Sato, identificaron la naturaleza hemoproteica de este pigmento, que se encontraba presente en los microsomas hepáticos de diferentes especies de mamíferos y que tras ser reducido por NADPH, era capaz de unirse al CO, mostrando un característico pico de absorbancia en el espectro UV a 450 nm (Omura and Sato 1964). Por este motivo a esta hemoproteína se la denominó *citocromo P450* (P por pigmento y 450 por su pico de absorbancia en el UV).



Figura 12. Ryo Sato y Tsuneo Omura.

La unión de CO al hierro del grupo hemo de CYP450 confiere el pico característico observado a 450 nm. La forma inactiva del CYP tiene una absorbancia de 420nm, por lo que es llamada P420 (Coon et al. 1992).

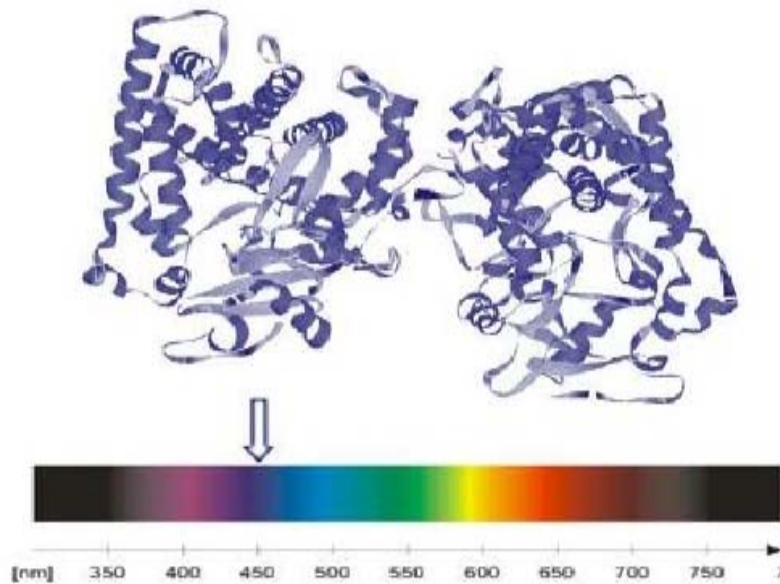


Figura 13. Omura y Sato en 1964 encontraron que estas proteínas en su estado reducido que forman complejos con monóxido de carbono presentan una absorbancia máxima de 450nm.

El máximo de absorbancia característico del P450 es utilizado para su cuantificación espectrofotométrica. El grupo tiol de la cisteína ligado al átomo de hierro es el responsable de este pico de Soret. En el resto de hemoproteínas, en las que la histidina actúa como ligando, el máximo de absorción aparece a 420 nm. El CO se une con gran afinidad e impide la unión y la activación del oxígeno molecular y, de este modo, inhibe de forma reversible la actividad enzimática del P450. Otros ligandos (substratos e inhibidores) también pueden inducir cambios de absorbancia en el pico de Soret, lo que permite el análisis por espectrofotometría de la unión de tales compuestos.

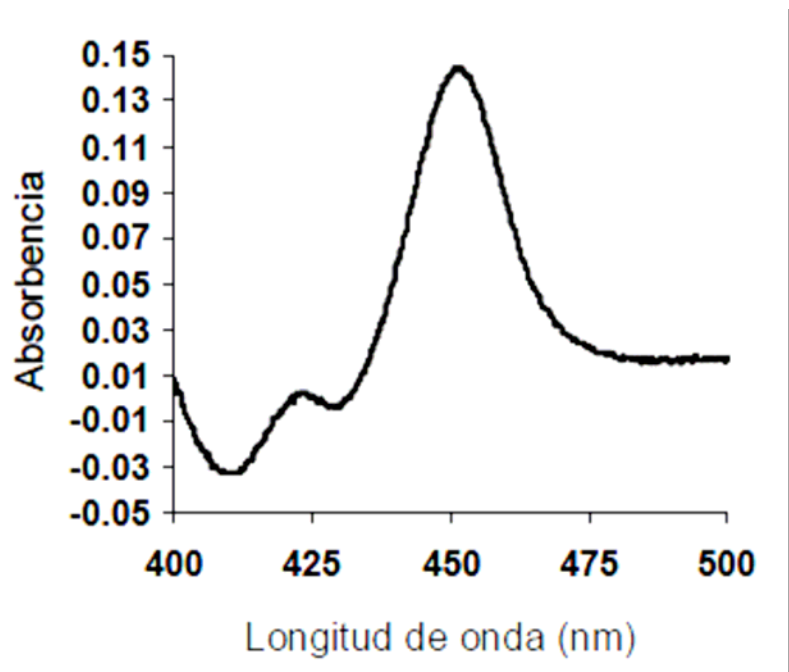


Figura 14. Pico característico de absorción del grupo hemo o pico de Soret a los 450nm.

En un principio se pensó que los P450s eran proteínas exclusivamente hepáticas localizadas en el retículo endoplásmico liso, pero esta idea inicial se descartó al comprobarse la presencia de estas enzimas en prácticamente todo el organismo (Ding y Kaminsky 2003). La amplia distribución tisular de los P450s se debe probablemente al gran número de funciones que realizan. No obstante, el hígado es el órgano con mayor expresión de estos enzimas (figura 15) y en él se encuentran tanto los P450s implicados en reacciones fisiológicas como los encargados del metabolismo de xenobióticos,

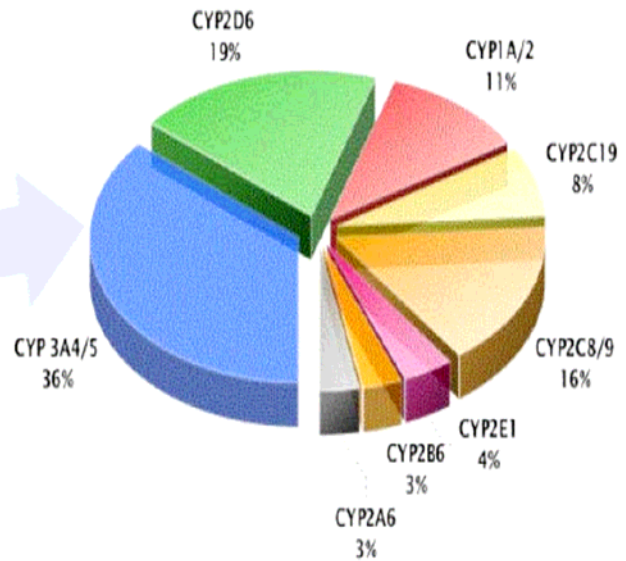


Figura 15. Abundancia de los CYP450 en el hígado humano.

El hígado se considera como el principal órgano que metaboliza a los xenobióticos. El papel clave del hígado en la eliminación de estos compuestos deriva de su mayor contenido en enzimas implicadas en las reacciones de biotransformación y de su privilegiada situación anatómica que le permite el contacto directo con todos los compuestos que acceden al organismo por vía oral. Se estima que alrededor del 70% de los P450 hepáticos pertenecen a las familias 1 a 3. Precisamente estas tres familias son las que catalizan la mayor parte de las reacciones de biotransformación de substratos exógenos. Existen isoformas extrahepáticas en numerosos tejidos como en el intestino, riñón, cerebro, linfocitos, etc.

4.3.1 Nomenclatura

Desde los años 50 hasta finales de los 80, las enzimas se nombraban en función de la reacción que catalizaban o de su inducibilidad, lo que provocó que un mismo citocromo P450 tuviese diferentes nombres dependiendo del laboratorio donde había sido aislado. A finales de los años 80, el número elevado de citocromos P450 conocidos hizo que la comunidad científica se planteara la necesidad de establecer unos criterios de nomenclatura que evitaran posibles ambigüedades (Donato 2004).

En 1987 se establecieron los principios del sistema de nomenclatura y clasificación que se utiliza hoy en día, el cual obedece a criterios filogenéticos y se basa en la identidad de la secuencia de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas de las diferentes enzimas (Nebert et al. 1987). Según este criterio, los P450 se identifican con las siglas CYP seguido de un número que designa la familia, una letra que identifica la subfamilia y otro número que se corresponde a el gen (p. e. CYP1A1, CYP2C9).

Categoría	Adición a P450	Ejemplos
Familia	Número arábigo + letra mayúscula	P450 1, P450 2
Subfamilia	Número arábigo + letra mayúscula	P450 1A P450 2D
Gen o proteína	Número arábigo + letra mayúscula + Número arábigo	P450 1A2 P450 2D6

Tabla 1. Nomenclatura de los CYP450.

Con este sistema de nomenclatura, quedan totalmente identificados todos los P450s, tanto procariotes como eucariotes. En una misma familia se agrupan aquellos enzimas cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud mayor del 40%, independientemente de la especie de procedencia. Dentro de una familia los P450s se agrupan en diferentes subfamilias que, siempre que haya más de una, se denominan correlativamente empezando siempre por la letra A (p. e., CYP2A, CYP2B, CYP2C, etc).

En este caso, el requisito para que dos P450 pertenezcan a la misma subfamilia es que tengan una homología en la secuencia de aminoácidos superior al 55%. Por último, dentro de la misma subfamilia, las enzimas individuales se designan según números empezando siempre por el 1 (p. e., CYP1A1, CYP1A2), teniendo en cuenta que dos P450 se consideran como diferentes siempre y cuando sus respectivas secuencias difieran en más de un 3%.

CYP	3	A	4
Citocromo	Familia > 40%	Subfamilia > 55%	Individuo > 3%

Figura 16. Principios del sistema de nomenclatura y clasificación.

Las familias 1, 2 y 3 están constituidas por enzimas encargadas de la biotransformación de xenobióticos, mientras que el resto de las familias incluyen P450s que intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos.

Una de las características más significativas de los P450 que metabolizan xenobióticos es su baja especificidad, ósea, un mismo sustrato puede ser metabolizado por diferentes citocromos, originando la formación de diferentes metabolitos, lo que permite que sean capaces de metabolizar un número casi ilimitado de sustratos, principalmente a través de reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis. Las oxidaciones catalizadas por el P450 son reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH y para las que utiliza oxígeno molecular. Como consecuencia de estas reacciones el P450 acelera la eliminación del organismo de gran número de fármacos y compuestos tóxicos, pero también es el responsable de la activación de toxinas o pre-carcinógenos.

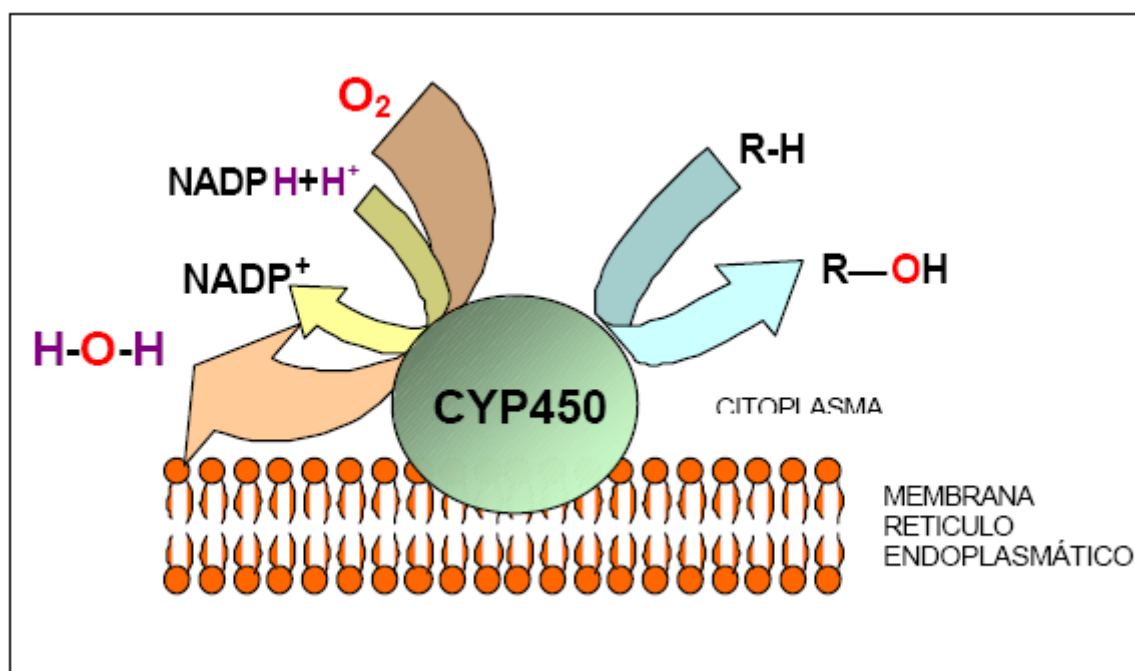


Figura 17. Mecanismo de acción del citocromo P450. Hidroxilación de una droga liposoluble por acción del citocromo P450. El producto R-OH aumenta la solubilidad en agua, facilitando su excreción.

4.3.2 Reacciones

El sistema P450 presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar, como en el número elevado de sustratos que es capaz de metabolizar. Si bien el P450 interviene fundamentalmente en reacciones de oxidación, también es capaz de catalizar reducciones, hidrataciones o hidrólisis. Salvo contadas excepciones, el P450 requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato. A las enzimas que catalizan este tipo de oxidaciones se les conoce como mono-oxigenasas u oxidasas de función mixta, en las que sólo uno de los átomos de oxígeno se incorpora a la molécula del sustrato, mientras que el otro átomo se reduce hasta agua. Estas reacciones difieren de las catalizadas por las oxidasas del metabolismo intermediario, con formación de peróxido de oxígeno, y de las reacciones de peroxidación en las cuales el átomo de oxígeno introducido en el sustrato procede de peróxidos y no del oxígeno molecular.

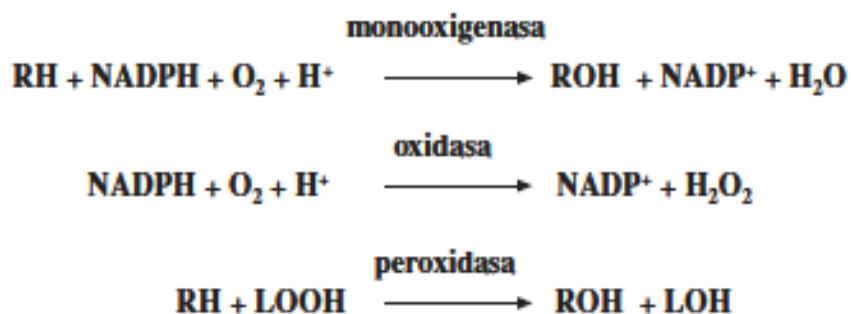


Figura 18. Reacciones enzimáticas de oxidación.

Entre las oxidaciones catalizadas por el P450 se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S-oxidaciones, epoxidaciones, O-, N- y S-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones. Entre sus substratos se incluyen tanto moléculas pequeñas como otras mucho mayores (p. e., etanol y ciclosporina, con pesos moleculares de 40 y 1203 D, respectivamente), aromáticas o lineales, tanto planas como globulares, que contengan o no hetero-átomos.

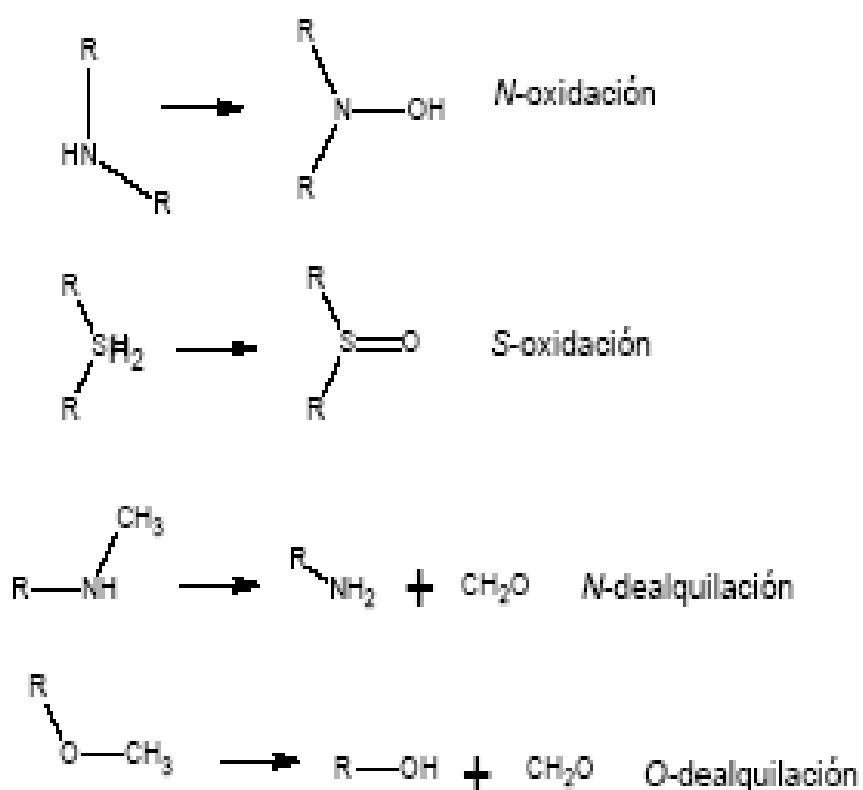


Figura 19. Reacciones catalizadas por el citocromo P450.

4.3.3 Ciclo catalítico del CYP450

En la Figura 20, se muestra una simplificación del ciclo de óxido-reducción del CYP y su sustrato, propuesto por Coon (Coon et al. 1992). El mecanismo de acción es complejo y aún no está bien esclarecido debido a la vida media baja de sus intermediarios. Existen evidencias de que en el proceso se generan especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), además del radical libre sustrato (R^{\bullet}) el que al unirse a un radical hidroxilo, generara finalmente el producto hidroxilado (ROH).

La descomposición del CYP oxigenado se describe como una de las mayores fuentes de radicales superóxido de los sistemas biológicos y su producción depende de la isoforma del CYP, la naturaleza del sustrato unido (si lo hay) y de la eficiencia en la entrada del segundo electrón (etapa 4) (Guengerich 1995).

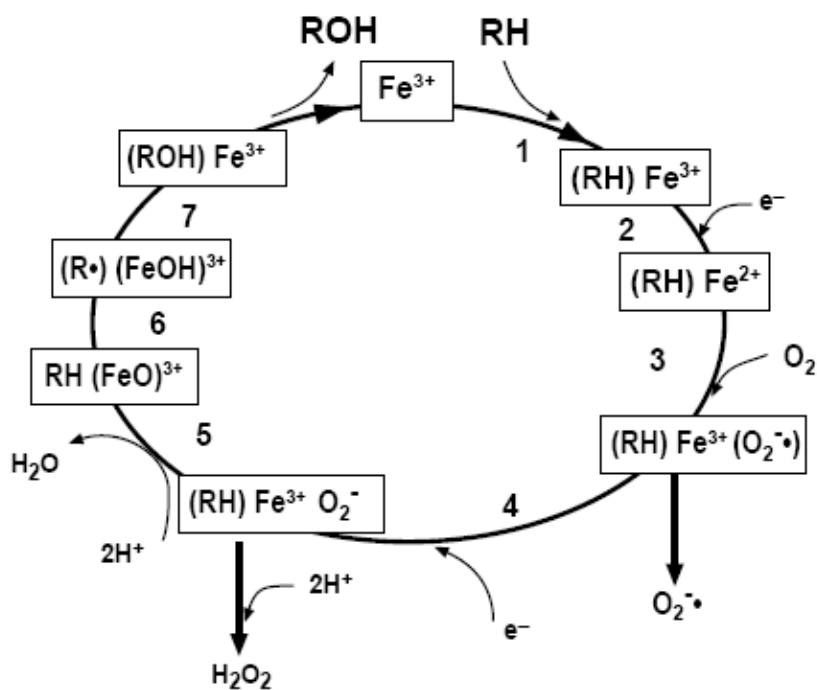


Figura 20. Ciclo catalítico del citocromo P450, RH y ROH representan a los sustratos y productos respectivamente.

El primer paso del proceso catalítico consiste en la unión del sustrato al sitio catalítico de la enzima originando cambios en el estado del spín del átomo de hierro, cambios en el máximo de absorbencia de la hemoproteína y cambios conformacionales por la reducción en el potencial redox (Wang et al. 2006) lo que favorece su acoplamiento con la enzima NADPH-CYP450 reductasa. Esta le transfiere un electrón de un agente reductor (NADPH en retículo endoplásmico) y promueve la reducción del complejo hemoproteína-sustrato que encuentra en su estado férrico y pasa al estado ferroso ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$), conformando el segundo paso del ciclo catalítico.

El tercer paso es la unión del oxígeno molecular para formar un complejo superóxido y en el cuarto paso se produce el aporte de un segundo electrón con la formación de ERO.

A partir de este punto los mecanismos no se conocen con certeza. La naturaleza de las ERO es desconocida, pero se sugiere pudiera ser una mezcla de complejos hierro-peroxo o hierro-oxo con la hemoproteína. En cualquier caso, se trataría de un oxidante electrofílico de vida muy corta formado por la protonación del dioxígeno ($\text{O}=\text{O}$).

El resultado final es la liberación de uno de los átomos de oxígeno en forma de una molécula de agua y la incorporación del otro átomo en el sustrato (R-OH) (Omura y Sato 1964; Donato 2004).

El ciclo catalítico puede ser desacoplado cuando los electrones del NADPH son consumidos sin la formación de los metabolitos oxidados.

4.3.4 Toxicidad y CYP450

La expresión de CYP está regulada por factores genéticos (algunos presentan polimorfismos genéticos), fisiopatológicos (regulación hormonal, enfermedades) o ambientales (factores nutricionales, inducción, inhibición). Por esta causa, sus niveles hepáticos varían extraordinariamente entre diferentes individuos, lo que justifica las notables diferencias que, en ocasiones, se observan en el metabolismo de fármacos y xenobióticos y, en última instancia, la variabilidad en la respuesta farmacológica o la diferente susceptibilidad a la acción de tóxicos o carcinógenos.

Son enzimas de gran trascendencia desde el punto de vista farmacológico y toxicológico. Son los responsables del metabolismo de fármacos y de los procesos de detoxificación. No obstante, en ocasiones participan en procesos de activación contribuyendo a la producción de metabolitos altamente reactivos, los cuales pueden formar enlaces covalentes con macromoléculas como proteínas y ADN, conocidos como aductos, iniciando procesos mutagénicos que guardan relación con fenómenos tóxicos o de carcinogénesis.

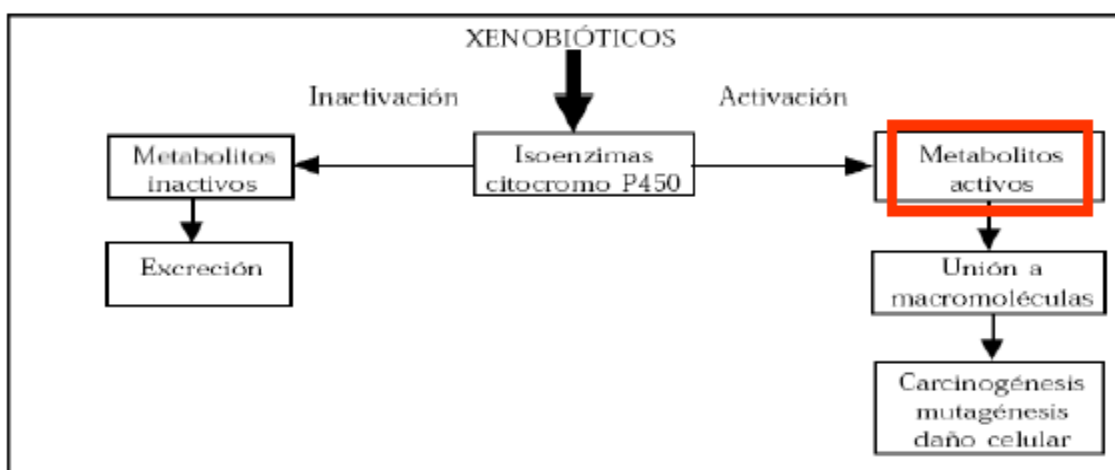


Figura 21. Activación de compuestos por CYP450.

4.3.5 Mecanismos de regulación del CYP450

El patrón de expresión de los citocromos P450 de un individuo puede ser modulado por diversos factores intrínsecos y extrínsecos.

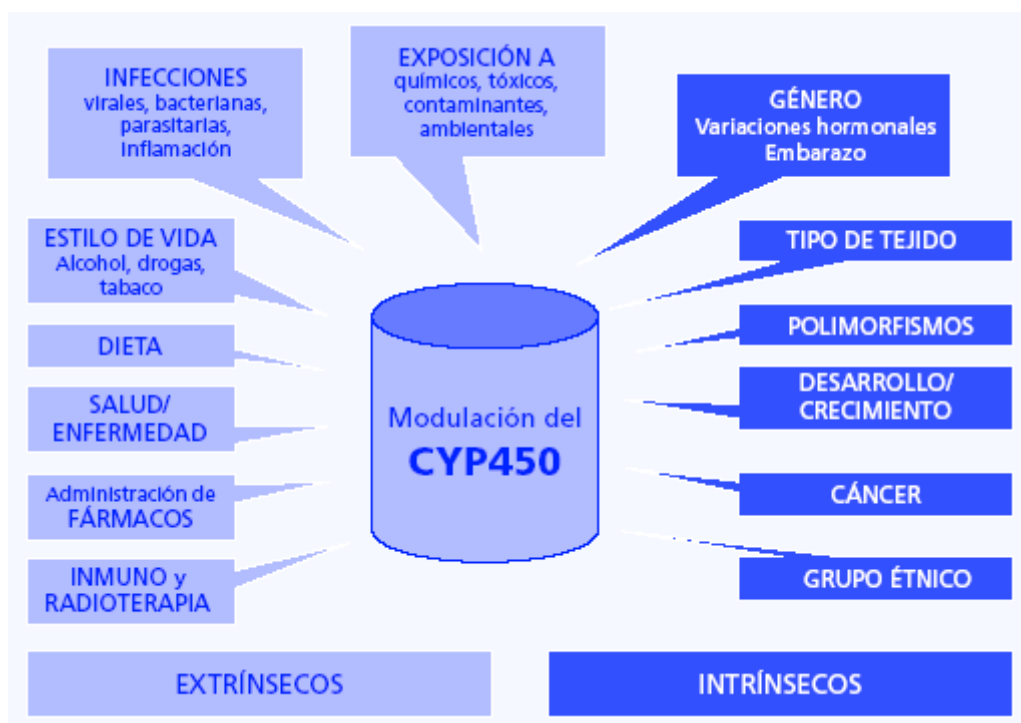


Fig.22 Factores que modulan la expresión, proteína y actividad del CYP450.

Existen diversos mecanismos de regulación de la expresión de CYPs como:

- Participación del Receptor de Aril Hidrocarburos (AhR), que regula a la familia CYP1 (Schmidt y Bradfield 1996; Li et al. 1998; Hewitt et al. 2007) el cual interactúa en la región promotora de estos genes con el elemento sensible a xenobióticos (XRE).
- Receptores nucleares, como el receptor pregnano X y el receptor constitutivo de androstano que regula las familias CYP2 y CYP3 respectivamente (Drocourt et al. 2001; Tirona et al. 2003).
- CYP2E1 es regulado por la vía de la estabilización de las proteínas (Gonzalez et al. 1993; Novak y Woodcroft 2000).

d) Recientemente se ha reportado que miRNAs regulan la expresión de algunos CYPs en humano (Tsuchiya et al. 2006; Takagi et al. 2008; Komagata et al. 2009; Pan et al. 2009; Mohri et al. 2010), en ratón (Cyp 2r1, Cyp 2d9, Cyp 8b1, Cyp 17a1, Cyp 2c55, Cyp 26a1, Cyp 2b10, Cyp ,7a1 y Cyp 7b1) (Xiu-Fen Yang 2008) y en rata (Kalscheuer et al. 2008).

4.3.5.1 Regulación vía Receptor de Aril Hidrocarburo (AHR)

El receptor de aril hidrocarburo (AhR) es una proteína ubicada en el citosol, que se encuentra unido a diferentes proteínas chaperonas como la HSP90, XAP2 y p23. Cuando un compuesto xenobiótico se une a él formando un complejo, el AhR se libera de las proteínas chaperonas y el complejo viaja al núcleo donde se unen al traslocador nuclear del receptor Ah (ARNT) formando un heterodímero, AhR/ARNT.

En el núcleo este heterodímero se une a secuencias consenso del DNA conocidas como elemento de respuesta a xenobióticos (XRE), lo cual ocasiona un cambio conformacional en la estructura de la cromatina, rompimiento de nucleosomas e inicia el reclutamiento de proteínas co-activadoras y acetilasas, lo que activa a la enzima RNA polimerasa II (Pol II) para iniciar la transcripción genética (Whitlock 1999; Delescluse C. 2000; Fujii-Kuriyama y Mimura 2005; Brauze et al. 2006; Kawajiri y Fujii-Kuriyama 2007).

Entre los genes controlados por el AhR se encuentran: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, NADPH-quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), Aldehído deshidrogenasa (ALDH3A1), entre otros (Montellano 1995; Brauze et al. 2006) .

La acción de AhR se puede suprimir por la unión con su represor (AhRR) y su posterior degradación vía ubiquitin-26S proteosoma (Ma y Baldwin 2002; Ma 2007).

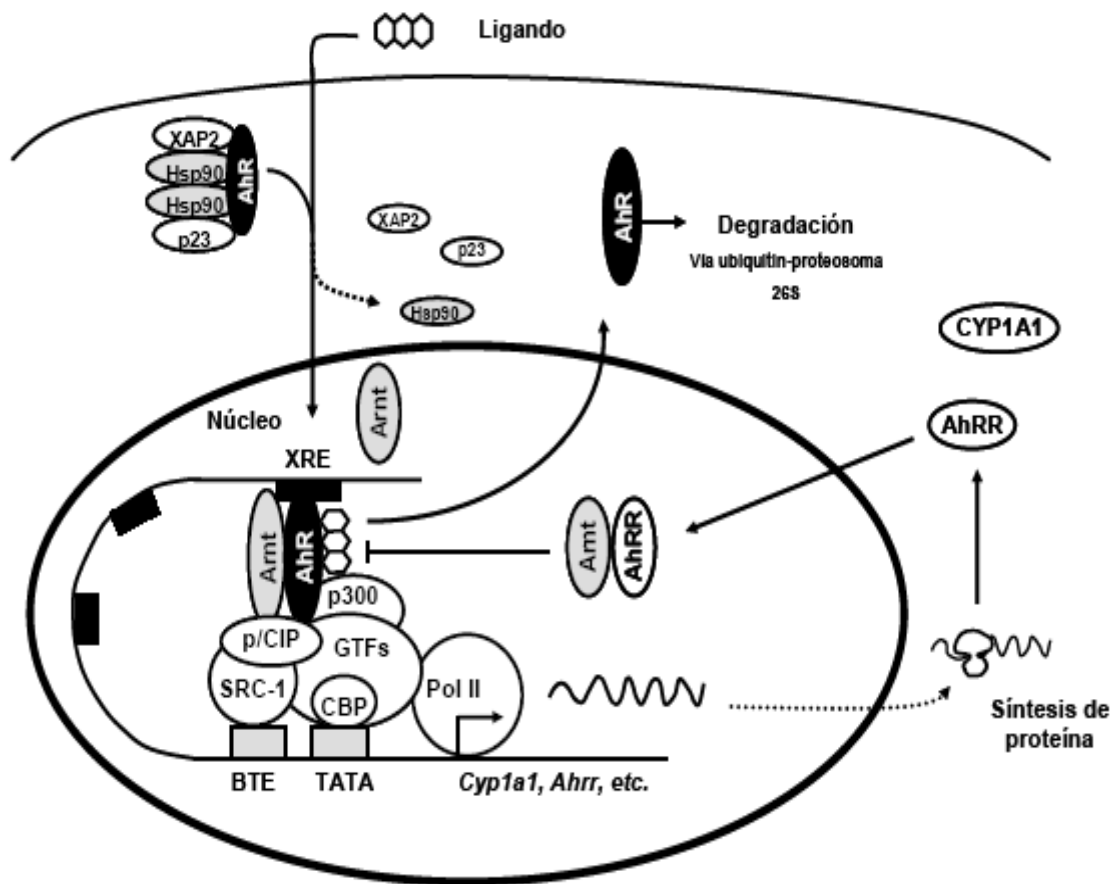


Figura 23. Regulación de CYP1 por AHR.

Inicialmente reconocidos como elementos de respuesta a hormonas (por la unión con cortisol, aldosterona, estradiol, progesterona, testosterona, vitamina D y tiroxina), estos receptores presentan una estructura que consiste de 5 a 6 dominios designados A – F del extremo N-terminal al extremo C-terminal. El dominio de unión al DNA (DBD, región C) y el dominio de unión a ligandos (LBD, región E) son dominios altamente conservados, son las regiones más importantes y pueden funcionar independientemente. El dominio A/B y la región D son menos conservados. La región F no está presente en todos los receptores y su función es poco conocida (Germain et al. 2006) .

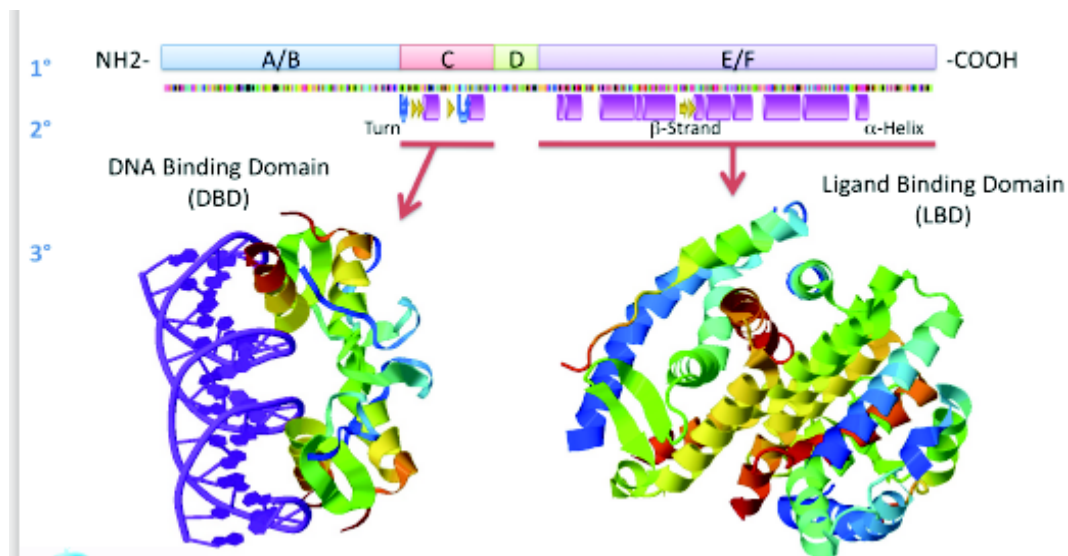


Figura 25. Estructura primaria, secundaria y terciaria de los receptores nucleares.

La activación inicia con la unión de un ligando al receptor, lo que provoca que el complejo receptor-ligando se una a regiones promotoras ubicadas en distintos sitios del genoma, conocidas como elementos de respuesta a hormonas y xenobióticos (HRE, XRE); posteriormente, se inicia el reclutamiento de proteínas co-activadoras que permiten la apertura de la cromatina, y estabilizan y activan a la RNA polimerasa II (Pol II) (Kininis et al. 2007). Los miembros de las familias CYP3A y CYP2 pueden ser inducidos por compuestos como rifampicina, clotrimazol, pregnenolona, carbonitrilo y fenobarbital vía activación del receptor X

de pregnano (PXR) y del receptor de androstano constitutivo (CAR) (Savas et al. 1999). El receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) participa en la inducción de miembros de la familia CYP4. Tanto CAR, PPAR y PXR son receptores que pueden heterodimerizar con el receptor X de retinoides (RXR) para unirse a elementos de respuesta y activar la transcripción de genes. Otros receptores como el de estrógenos (ER), puede participar en la inducción de CYP1A, CYP1B y CYP2D; el de glucocorticoides (GR), en la inducción de CYP1A1, CYP1B, CYP2B y CYP3A; el factor nuclear de hepatocitos (HNF-4), induce CYP2A, CYP2C y CYP2D; el receptor de ácido retinoico (RAR), actúa sobre CYP1A, CYP2C, CYP3A4 y CYP26; el receptor para vitamina D, puede activar CYP2D, CYP3A4, CYP27B1 y CYP24, por mencionar sólo algunos ejemplos (Montellano 1995; Kliewer et al. 1999; Delescluse C. 2000; Jurutka et al. 2005).

4.3.5.3 Regulación vía Receptor pregnano X (PXR).

El Receptor de pregnano X (PXR), también conocido como NR1I2 (de sus siglas en inglés "*nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2*") o receptor de esteroides y xenobióticos (SXR) o receptor de pregnano activado (PAR) es un receptor nuclear que regula la expresión de enzimas metabolizadoras y transportadoras implicadas en las respuestas de los mamíferos a su ambiente químico y diversos compuestos endógenos (Bertilsson et al. 1998; Blumberg et al. 1998).

Este receptor funciona como un sensor de xenobióticos y responde a señales internas para ayudar al cuerpo a adaptarse a los cambios en el medio ambiente interior, incluida la desregulación del sistema inmune. PXR responde a las señales externas e internas por arriba o abajo de la regulación ciertas vías metabólicas y las señales celulares a través de la regulación de genes.

El extremo amino terminal del PXR contiene un dominio de unión al DNA que media la interacción con elementos de respuesta a hormonas (HREs); El extremo carboxilo terminal determina la especificidad de unión al ligado, y contiene un motivo que dirige la unión al receptor X retinoico (RXR) (Watkins et al. 2001; Carnahan y Redinbo 2005).

PXR ejerce sus funciones reguladoras de la transcripción mediante la dimerización con el receptor X retinoico y el complejo PXR-RXR se une a secuencias de ADN específicas para regular la expresión génica. Las funciones del PXR están reguladas a nivel epigenético por modificaciones de la cromatina, la metilación del ADN y el ARN no codificante. Las modificaciones de la cromatina se llevan a cabo, en parte, a través de la interacción con los complejos co-regulator, como co-activadores esteroides (SRC), co-represores (NCoR / SMRT), factor nuclear de hepatocitos 4 alfa, receptor activado por proliferadores y coactivador 1 alfa y proteína arginina metiltransferasa 1. El PXR puede ser modificado por acetilación, fosforilación y sumoylation, y el promotor del PXR puede ser metilado en la isla "CpG". La mayoría de los estudios de PXR se centran en su papel como un factor de transcripción, que es responsable de la generación de ARN mensajero. Nuevas prueba sugieren que PXR regula la expresión génica, tanto a nivel de transcripción como de la traducción (Kodama y Negishi; Tian 2013).

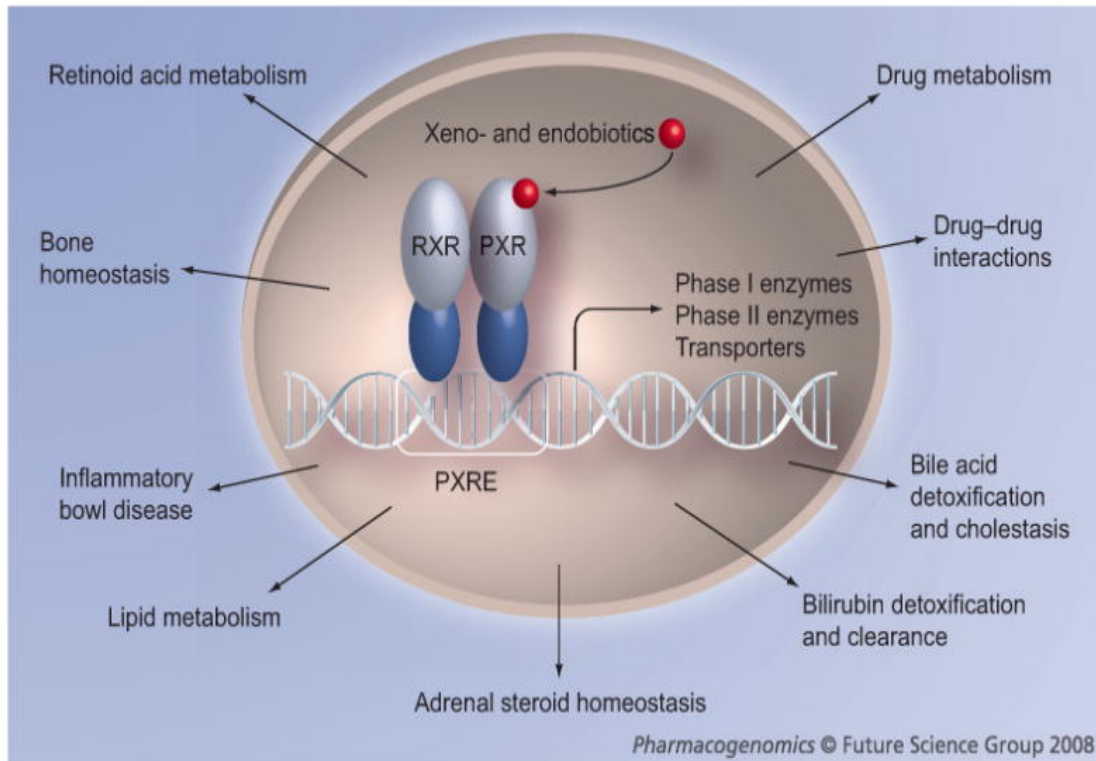


Figura 26. PXR se activa por muchos xeno-y endo-bióticos, regulando la expresión de enzimas metabolizadoras de fármacos y transportadores. Tras la unión del ligando, PXR forma un heterodímero con el RXR y la regulación se consigue mediante la unión del heterodímero de RXR-PXR a la PXRE en los promotores de genes diana.

4.3.5.4 Regulación vía Receptor constitutivo de androstano (CAR).

El receptor constitutivo de androstano (CAR), también conocido como NR113 (de sus siglas en inglés "nuclear receptor subfamily 1, group 1, member 3"), es un receptor nuclear clave en la regulación del metabolismo de xenobióticos y endobióticos. Se ha observado que actúa en concierto con PXR para desintoxicar compuestos xenobióticos.

La proteína se une al ADN como monómero o como heterodímero formando un complejo con el receptor X retinoide, regulando así la transcripción de los genes

diana implicados en el metabolismo de drogas y fármacos y en el aclaramiento de la bilirrubina. Al contrario de lo que sucede con la mayoría de los receptores nucleares, la proteína CAR se encuentra activa de forma constitutiva en ausencia de ligando, pero es regulada tanto por agonistas como por agonistas inversos. La unión del ligando da lugar a una traslocación de CAR hacia el núcleo, donde activará o reprimirá la transcripción de los genes diana. Estos ligandos incluyen la bilirrubina, hormonas esteroideas, una variedad de compuestos extraños y determinados fármacos. Diversas variantes transcripcionales del gen codifican diferentes isoformas del receptor CAR (Molnar et al.).

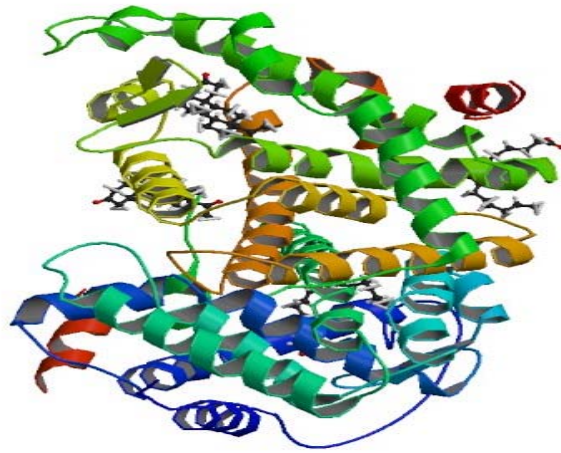


Figura 27. Estructura tridimensional del receptor CAR.

4.3.5.5 Estabilización del mRNA y proteínas

A nivel post-transcripcional se ha observado que diversos compuestos químicos pueden incrementar los niveles de algunas isoformas de CYP450, por mecanismos que conducen a la estabilización del RNA mensajero, o la estabilización de proteínas (Song et al. 1987; Koop y Tierney 1990; Novak y Woodcroft 2000). Se ha observado que la estabilización del mRNA producida por algunos compuestos químicos, tiene que ver con la producción de algunas proteínas, como la ribonucleoproteína A1 (hnRNP A1) que puede unirse a las regiones 3'-UTR del mRNA (región 3' de aproximadamente 70 nucleótidos que no se traduce) y que protege las colas de Poli A (colas poli-adeniladas) que finalmente conducen a la estabilización del mRNA (Raffalli-Mathieu et al. 2002; Su y Ding 2004). Las isoformas de CYP450 que se han observado pueden ser inducidas por este mecanismo, comprende a miembros de la familia CYP2A, a las isoformas, CYP11B1 y CYP11B2 de humanos, y en otros mamíferos como en rata y ratón (Raffalli-Mathieu et al. 2002; Gonzalez-Jasso et al. 2003).

La inducción de isoformas de CYP450 por estabilización de la proteína, se ha observado ampliamente con CYP2E1. Compuestos como el etanol, piridina, pirazol e isoniazida, pueden incrementar de 2 a 8 veces los niveles de la enzima en el hígado y en cultivos de hepatocitos; sin que se aumenten los niveles del mRNA de CYP2E1 (Ryan et al. 1985; Kim y Novak 1990; Zangar et al. 1993). Este fenómeno se ha confirmado cuando en presencia de inhibidores de la transcripción, compuestos como la piridina, incrementan los niveles de proteína de CYP2E1 (Kim y Novak 1990), y se ha sugerido que dicha estabilización sucede por la alteración en la degradación de la enzima (Eliasson et al. 1988). Diversos estudios han demostrado que compuestos como el etanol, imidazol, 2-propanol y DMSO, se unen al sitio activo de CYP2E1 y mantienen estables los niveles de la enzima. La vida media de CYP2E1 en microsomas hepáticos de rata oscila alrededor de 6 a 7 hrs, pero el tratamiento con etanol produce que la enzima se mantenga estable hasta 38 hrs, lo cual está relacionado con la disminución en la

ubiquitinación de la enzima y su posterior degradación vía proteosoma (Roberts et al. 1995; Goasduff y Cederbaum 2000).

4.3.5.6 Regulación vía miRNAs

Los microRNAs (miRNAs) comprenden una gran familia de pequeños RNAs monocatenarios no codificantes de ~21 nucleótidos de longitud que han surgido como reguladores clave de la expresión genética a nivel post-transcripcional.

Se describieron inicialmente en 1993 por Lee y col. en el laboratorio de Victor Ambros (Lee et al. 1993), sin embargo el término "microRNA" sólo se acuñó en 2001 en un conjunto de tres artículos publicados en Science (Ruvkun 2001).

En mamíferos, los miRNAs controlan la actividad de más del 60% de genes que codifican para proteínas (Friedman et al. 2009) y participan en la regulación de casi todos los procesos celulares investigados hasta la fecha (Bushati y Cohen 2007; Bartel 2009; Ghildiyal y Zamore 2009), y son expresados ampliamente en todos los tejidos y todos los estados del desarrollo.

Desde el descubrimiento de los miembros fundadores de los microRNA (miRNA), la familia, lin-4 y let-7 (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993; Reinhart et al. 2000), se han identificado cientos de miRNAs en plantas, animales y virus mediante clonación molecular y herramientas bioinformáticas (Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001; Lee y Ambros 2001; Berezikov et al. 2006; Ruby et al. 2006).

La mayoría de los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II (pol II) generando una de horquilla que contiene el precursor del miRNA, que puede variar en tamaño de cientos de nucleótidos a decenas de kilobases (Cai et al. 2004; Lee et al. 2004) (Figura 28). Como los mRNAs los pri-miRNAs contienen estructuras 5'-cap, son poli-adeniladas y pueden sufrir splicing, (Bracht et al. 2004; Cai et al. 2004). Los pri-miRNAs son procesados dentro del núcleo por un complejo multiproteico llamado "el microprocesador", conformado por la enzima

Drosha una RNasa tipo III, el dominio de unión al ARN de doble cadena (dsRBD) y la proteína DGCR8/Pasha (Lee et al. 2003; Denli et al. 2004; Gregory et al. 2004; Han et al. 2004; Landthaler et al. 2004). En la interacción con el complejo, drosha corta las bases de la horquilla, formando lo que se denomina un pre-miRNA (precursor de miRNA). Este pre-miRNA es transportado desde el núcleo al citoplasma por la exportina 5. Una vez en el citoplasma el pre-miRNA es fragmentado por la enzima dicer, que lo corta hasta la longitud final de 20-25 nucleotidos (Bohnsack et al. 2004; Lund et al. 2004). En principio cada hebra del duplex puede llegar a ser un miRNA maduro, pero usualmente solo una es incorporada al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), formado por proteínas Argonauta (Ago) de las cuales hay cuatro en mamíferos (Ago 1- Ago4) las cuales se unen al miRNA maduro y lo orientan para facilitar su interacción por apareamiento de bases con el mRNA blanco (Gregory et al. 2005; Maniataki y Mourelatos 2005). El grado de complementariedad determina el tipo de regulación; En caso de existir complementariedad perfecta el mRNA es anclado y degradado y si es casi perfecta, su traducción es reprimida (Hutvagner et al. 2001; Martinez y Tuschl 2004; Filipowicz et al. 2008). Como el complejo reprime la traducción o promueve la degradación, no es claro pero envuelve el reclutamiento de proteínas adicionales como los P bodies (cuerpos P), también llamados GW o GW 182 (Standart y Jackson 2007).

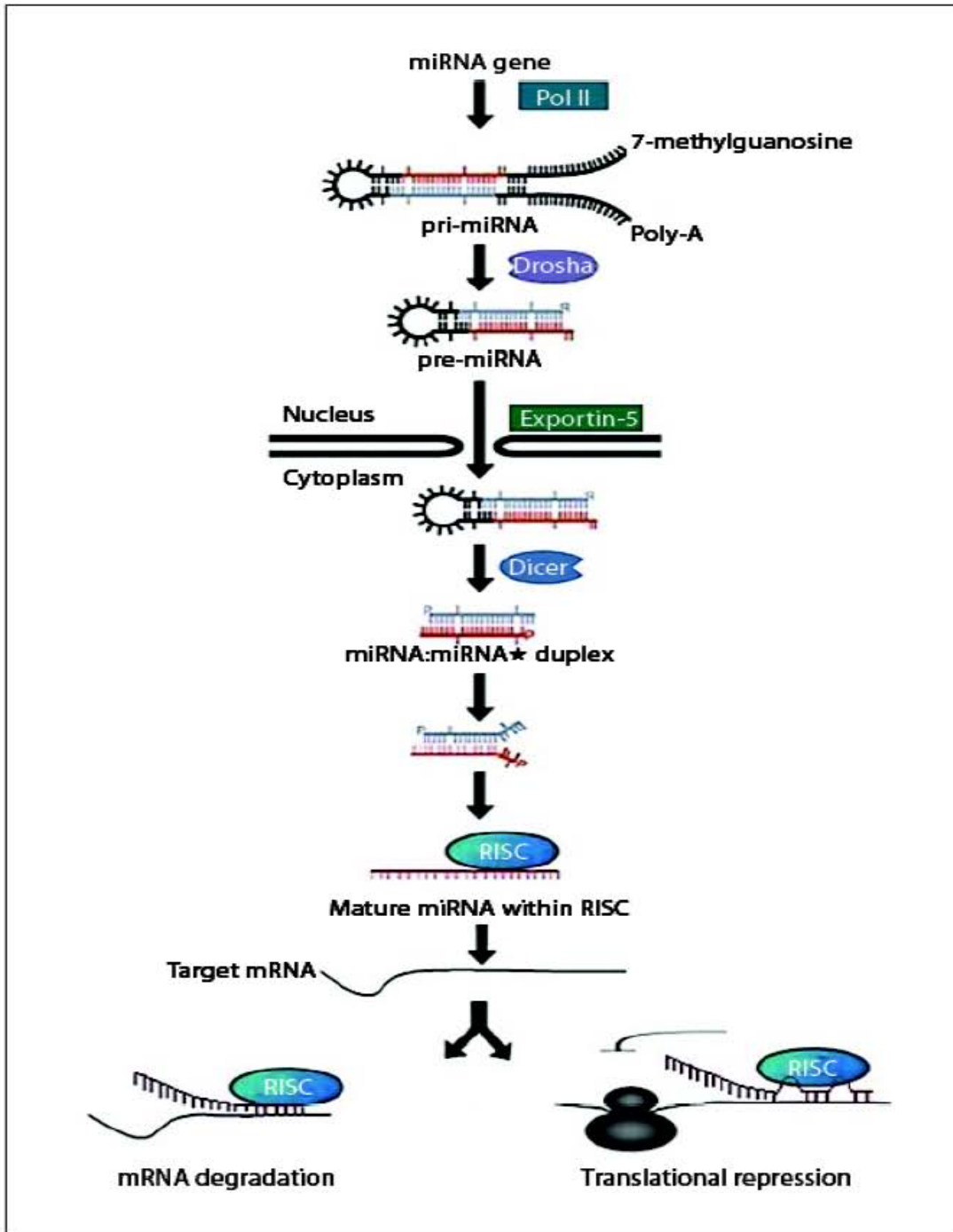


Figura 28. Biogenesis de los miRNAs.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe evidencia de que la biotina en concentraciones farmacológicas modifica la expresión de diversos genes (Rodríguez-Melendez y Zempleni 2003; Wiedmann et al. 2004; Dakshinamurti 2005; Zempleni 2005), entre los que destacan algunos relacionados con el metabolismo de glucosa y lípidos (Chauhan y Dakshinamurti 1991; Dakshinamurti y Li 1994; Romero-Navarro et al. 1999; De La Vega y Stockert 2000; Sugita et al. 2008; Vilches-Flores et al. 2009; Larrieta et al. 2010). De acuerdo con estos hallazgos varias observaciones indican que la suplementación de biotina mejora la homeostasis de glucosa y triglicéridos (Dokusova y Krivoruchenko 1972; Coggeshall et al. 1985; Maebashi et al. 1993; Koutsikos et al. 1996; Revilla-Monsalve et al. 2006) por lo que se han desarrollado medicamentos disponibles comercialmente que contienen dosis farmacológicas de biotina solas o en combinación con otros fármacos (Albarracin et al. 2005; Singer y Geohas 2006); A pesar de su uso y disposición comercial existen pocos estudios que evalúan su toxicidad (SRI- 1979; Hayes et al. 1984; Ma et al. 1984; Fiume 2001) y no existen reportes que evalúen aspectos como su efecto sobre los Citocromos P540 in vivo a excepción del CYP1B1 in vitro (Rodríguez-Melendez et al. 2004; Wiedmann et al. 2004), en donde encontraron que incrementó la expresión de CYP1B1, un citocromo que participa en el metabolismo de xenobióticos como fármacos y compuestos endógenos como estrógenos y testosterona, el aumento observado fue asociado con el rompimiento de hebras de DNA. Sin embargo, no se conoce su efecto sobre los citocromos 1A1, 1A2, 1B1, 2E1 y 3A2 en el hígado, quienes tienen relevancia en el metabolismo de xenobióticos y metabolismo endógeno.

6. HIPÓTESIS

La administración de biotina modificará la expresión y actividad de CYP450 involucrados en el metabolismo de xenobióticos y el metabolismo endógeno en hígado de rata.

7. OBJETIVO GENERAL

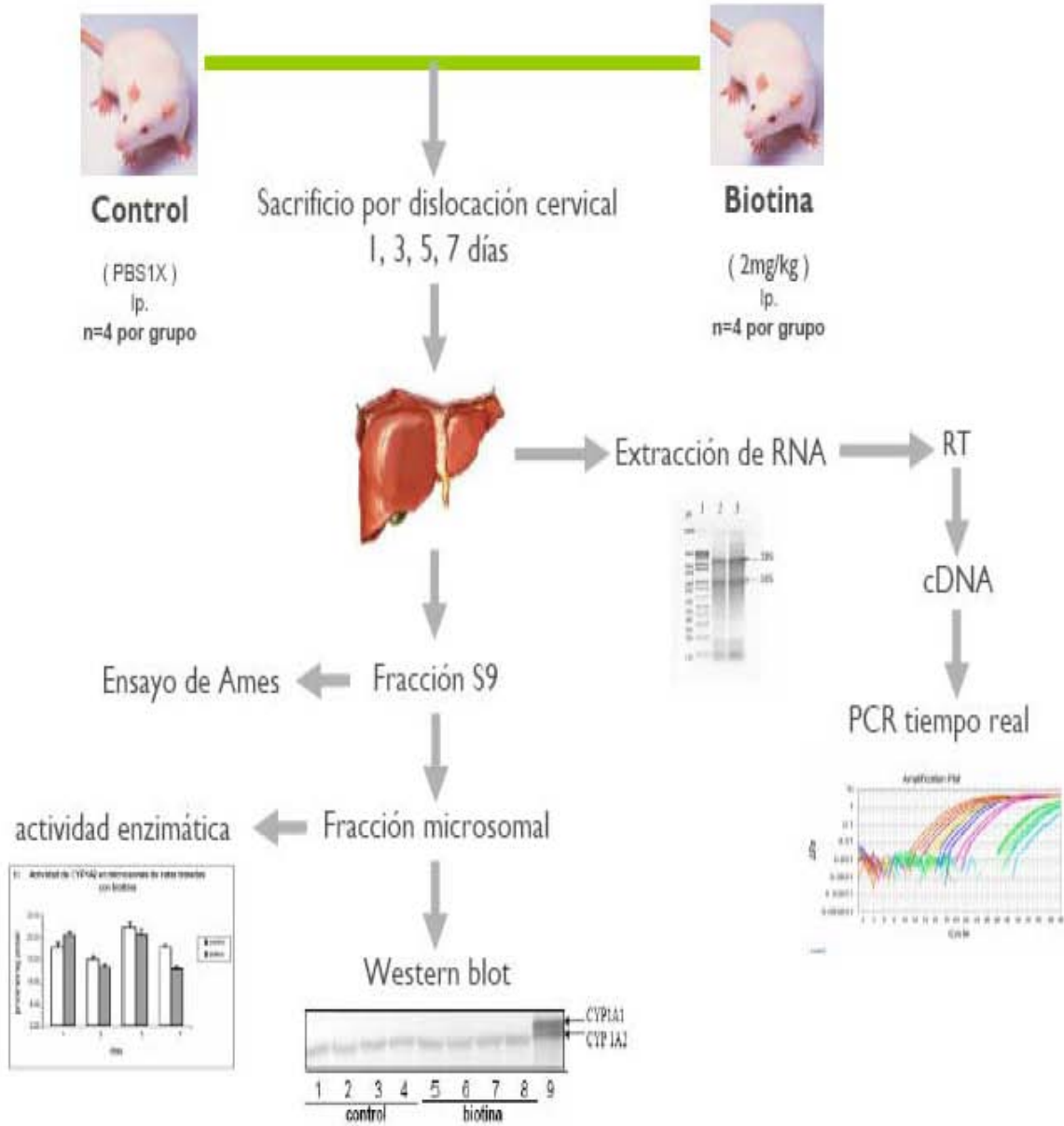
Analizar el efecto de dosis farmacológicas de biotina en la expresión y actividad de citocromos de relevancia en el metabolismo de xenobióticos y metabolismo endógeno.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar los efectos de la administración de biotina en la expresión y actividad de los citocromos P450 1A1, 1A2, 1B1, 2E1 y 3A2 evaluando:

- a) El nivel de mRNA mediante extracción de RNA total y RT-PCR en tiempo real.
- b) El nivel de proteína en los microsomas hepáticos mediante la inmunodetección con anticuerpos específicos.
- c) La actividad enzimática mediante el uso de sustratos específicos.

9. DISEÑO EXPERIMENTAL



10.- MATERIAL Y MÉTODOS

10.1 Reactivos

La biotina, la etoxirresorufina (ER), la metoxirresorufina (MR), la resorufina, el dimetil sulfóxido (DMSO), el benzo(a)pireno B[a]P y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). Los anticuerpos policlonales primarios anti-rata CYP1A1 y CYP1A2 se adquirieron de Chemicon International Inc., el anticuerpo policlonal primario anti-rata CYP1B1 se adquirió de Santa Cruz Biotechnology Inc., el anticuerpo policlonal primario anti-rata CYP2E1 fue adquirido de Millipore, el anticuerpo policlonal primario anti-rata CYP3A2 se adquirió de Fitzgerald, el anticuerpo policlonal primario anti-ratón GAPDH fue adquirido de Millipore y los anticuerpos policlonales secundarios IgG conjugados con peroxidasa de conejo anti-ratón y de cabra anti-conejo se adquirieron de Invitrogen. Los químicos para la electroforesis y las membranas de nitrocelulosa se adquirieron de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). El Trizol®, la M-MLV transcriptasa reversa y el oligo se adquirieron de Invitrogen, la Taq Man® universal PCR master mix y las sondas TaqMan® MGB fueron adquiridas de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

10.2 Estudio in vivo

10.2.1 Animales tratados con biotina

Se utilizaron ratas Wistar macho, divididas en ocho grupos experimentales; cuatro grupos control y cuatro grupos tratados con biotina, (4 animales por grupo), con dosis diarias de biotina de 2 mg/kg de peso corporal vía intraperitoneal.

Se sabe que esta dosis induce la expresión de genes que están relacionados con el metabolismo de la glucosa (Dakshinamurti y Cheah-Tan 1968; Dakshinamurti y

Tarrago-Litvak et al. 1970; Larrieta y Velasco 2010) además equivale a una suplementación y a una dosis supra-fisiológica ya que es mayor a los requerimientos nutricionales (Innis y Allardyce 1983; Yates y Schlicker et al. 1998). Esta concentración esta dentro del intervalo usado en medicamentos y suplementos disponibles comercialmente.

Los grupos control se trataron con el vehículo de amortiguador de fosfatos (pH= 7.4) vía intraperitoneal. Todos los animales se sacrificaron por dislocación cervical a las 24 horas, 3, 5 y 7 días después de la última dosis.

10.2.2 Animales tratados con biotina más B(a)P

Evaluamos el efecto de la administración conjunta de biotina en combinación con benzo(a)pireno, un inductor clásico de citocromos, para evaluar el posible efecto de sinergismo. Veinte ratas divididas en 4 grupos (5 animales por grupo): control (amortiguador de fosfatos i.p.), tratadas con biotina (2mg/kg, i.p.), tratadas con B(a)P (15mg/kg, i.p.) y biotina+B(a)P (2mg/kg - 15mg/kg respectivamente) y sacrificadas por dislocación después de 24hrs de tratamiento. Se obtuvieron los microsomas hepáticos (Maron y Ames 1983) para medir las actividades de EROD y MROD.

10.2.3 Obtención de Fracciones S9 y microsomal

Una vez sacrificados los animales se obtuvo el hígado, que se cortó en pequeñas porciones y se homogenizó en una solución de KCl 0.15 M a una proporción de 3 mL/g de peso de hígado. El homogeneizado se centrifugó a 9,000 g durante 10 minutos para obtener la fracción postmitocondrial (S9) (Maron y Ames 1983), la cual se centrifugó a 100,000 g por 60 minutos a 4°C. Después, el botón obtenido se resuspendió en una solución de fosfatos 100 mM (pH 7.4) con sacarosa 0.32 M y nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones para la obtención de la

fracción microsomal. El botón final se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM, DTT 1 mM y glicerol al 20%. Se dividió el volumen en pequeñas alícuotas para su conservación a -70°C hasta su uso. La cantidad de proteína total se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976) utilizando el protocolo descrito por el proveedor (BioRad).

10.2.4 Aislamiento de ARN total

Se aisló el RNA total de hígados de ratas control y tratadas con biotina por el método del TRIzol (1 mL por aproximadamente 100 a 200 mg de tejido). Para la separación de fases se adicionaron 200 µl de cloroformo, agitando vigorosamente por 15 seg. (vortex) e incubando por 3 min. a temperatura ambiente; posteriormente se centrifugó 15 min a 12,000 rpm a 4°C. De las 3 fases formadas se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo estéril y se adicionaron 500 µl de alcohol isopropílico para su precipitación, se volvió a centrifugar 10 min a 12,000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante obteniéndose un pellet el cual se lavó tres veces con con 1mL de etanol 75% centrifugando por 10 min a 7500 rpm a 4°C, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante quedando una pastilla que se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua libre de RNAasas.

La concentración del RNA se cuantificó por espectrofotometría a 260nm y la pureza se obtuvo a partir del cociente de los valores de absorbancia a 260 y 280 nm. Dando una relación de ≈ 2 . Para verificar la integridad del RNA total, 1 µg de cada muestra se colocó en un gel de agarosa al 2 % para determinar la presencia de bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28s y 18s como se muestra en la siguiente figura 29.

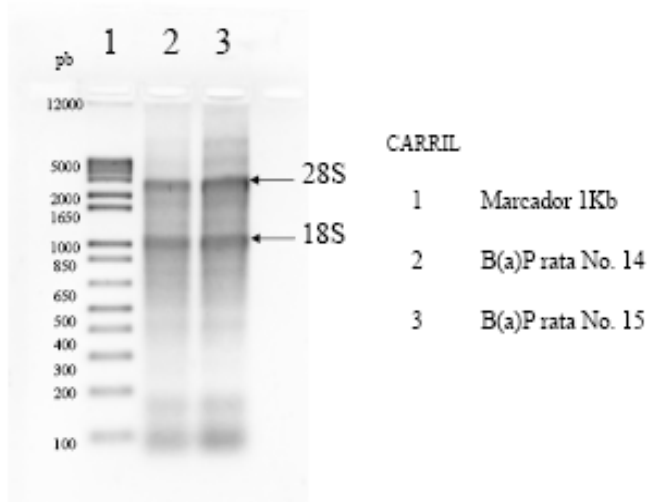


Figura 29. Integridad de RNA de hígados de ratas tratadas con B(a)P 50mg / kg a las 24 hrs de administración usadas como control positivo de inducción de CYP1A.

10.2.5 Transcripción reversa

Para la síntesis del cDNA se tomó una concentración de 1 µg del RNA total, para la preparación de la mezcla de reacción se adicionaron 1 µL de oligo dT, 1 µL de dNTP mix 10mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y se ajustó la mezcla con H₂O libre de nucleasas a un volumen final de 12 µL, se incubó a 65° C por 5 min y se colocó en hielo rápidamente. A continuación se adicionaron 4 µL de buffer First-strand 5X, 2 µL DTT 0.1 M y 1 µL de H₂O libre de nucleasas, se mezcló el contenido del tubo y se incubó a 70°C por 15 min., se adicionó 1 µL de M-MLV RT (enzima de reverso transcriptasa del virus de leucemia murina) y se incubó a 37°C por 50 min., la reacción se inactivó calentando a 70°C por 15 minutos (volumen final 20 µL). El cDNA obtenido se guardó a -20°C hasta su uso.

10.2.6 PCR en Tiempo real

La expresión relativa de los citocromos se evaluó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, utilizando los materiales y métodos proporcionados por Applied Biosystems. La enzima DNA polimerasa de *Thermopilus acuaticus* crea varias copias del cDNA al identificar la doble cadena formada con una sonda de oligonucleótidos específica para una secuencia determinada de mensajero. Al sintetizarse cada copia se libera un fluoróforo, el cual se detecta por un sistema de lectura del termociclador, acoplado a una computadora. El cambio en la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de copias de DNA. Para la reacción se mezcló el cDNA respectivo con la mezcla TaqMan® universal PCR y su respectiva sonda TaqMan® MGB marcadas con el fluoróforo FAM en placas de 96 pozos con 12.5 µl de la reacción por pozo. Las determinaciones se realizaron por triplicado usando gapdh como gen de referencia endógena. Las sondas fueron seleccionadas del catálogo de Applied Biosystems en la página http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/index.htm, CYP1A1 (Rn 00487218_m1), CYP1A2 (Rn 00561082_m1), CYP1B1 (Rn 00564055_m1), CYP2E1 (Rn 00580624_m1), CYP3A2 (Rn 00756461_m1) y GAPDH (Rn 99999916_s1). La amplificación del cDNA se llevó a cabo en el secuenciador ABI Prism 7000, empleando el software ABI Prism 7000 SDS versión 1.1. La amplificación comprende ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión de 95°C, 10min., 95°C, 15 sec., y 60°C, 1min con un total de 40 ciclos. A partir de las gráficas de duplicación de DNA se obtuvo el valor de ciclo umbral (Ct) para cada gen, es decir el ciclo de la reacción de PCR donde en donde todas las muestras alcanzaron una cantidad determinada de DNA dentro de una función lineal, sin limitaciones de sustrato ni saturación de la enzima. En este punto se debe de cumplir con la función:

$$P=T*2^n$$

Donde la cantidad de producto P es igual a la cantidad de templado T que se duplica a cada ciclo n.

Para calcular la abundancia relativa de cada citocromo con respecto a la expresión endógena del gapdh, se empleó el modelo matemático delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak y Schmittgen 2001). La expresión relativa de los citocromos se calculó de la diferencia resultante entre los Ct's del citocromo de interés y el gapdh entre los hígados controles y tratados.

Expresión relativa=

$$\Delta Ct \text{ biotina [Ct(cyp)-Ct(gapdh)]} - \Delta Ct \text{ control [Ct(cyp)-Ct(gapdh)].}$$

10.2.7 RT-PCR en Tiempo Real para evaluar la expresión de los mir-27b, miR 122, miR-328a.

Para evaluar los niveles de los mir-27b, miR 122, miR-328a se extrajo el RNA total y se aislaron los miRNAs a partir de hígados de ratas control (buffer de fosfatos) e hígados de ratas tratadas con biotina (2mg/kg) usando el kits mall RNA isolation (Ambion). Los niveles de expresión de los miRNAs se cuantificaron usando el protocolo mirVana qRT-PCR (Ambion). Los primers se seleccionaron del catálogo en línea de Applied Biosystems usando TaqMan MicroRNA assay, mir-27b (rno-miR-27b* 464436-mat), miR 122(rno-miR-122* 463893-mat), miR-328a (rno-miR-328a* 462041-mat), el miRNA U87 maduro se usó como control de referencia endógena. Cada reacción de PCR se realizó por triplicado en un volumen final de 20 μ L a 95°C, 10min., seguido de 40 ciclos de 95°C, 15sec. y 60°C, 1min en un secuenciador ABI Prism, empleando el software ABI Prism 7000 SDS versión 1.1. (Applied biosystems). Los niveles de miRNAs se cuantificaron usando el método $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen 2001) empleando la fórmula $2^{(Ct \text{ microRNA} - Ct \text{ U87})}$.

10.2.8 Determinación de la actividad enzimática

Para cuantificar la actividad del CYP1A1 y del CYP1A2, se llevó a cabo la reacción de *O*-dealquilación de alcoxirresorufinas. Utilizando la etoxirresorufina como sustrato para el CYP1A1 y metoxirresorufina para el CYP1A2 (Burke et al. 1994). Se preparó una curva de calibración con resorufina utilizando las siguientes concentraciones: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 pmol/mL. La reacción se llevó a cabo en una celda para fluorómetro en la cual se mezcló: el amortiguador de Tris-base 50 mM y $MgCl_2$ 25 mM (930-960 μ L) a pH 7.6, el sustrato disuelto en DMSO (10 μ L de etoxirresorufina 50 μ M o 20 μ L de metoxirresorufina 0.5 mM) y NADPH 50 mM (10 μ L) disuelto en el amortiguador. Todo esto se incubó a 37°C durante 3 min. Una vez terminado este tiempo se agregó el volumen equivalente a 200 μ g de proteína microsomal hepática. La cinética de aparición de la resorufina se evaluó cada 15 segundos durante 3 minutos en un fluorómetro Versa FluorTM de BioRad. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 530 nm y la de emisión de 590 nm.

Para la cuantificación de la actividad de CYP2E la técnica se basa en la medición del formaldehído, producto formado durante la demetilación de la nitrosodimetilamina (NDMA) catalizada por CYP2E1. El medio de reacción contuvo TrisHCl 70mM pH 7.4, semicarbazida 10 mM, $MgCl_2$ 14 mM y KCl 215 mM, 1 mM de NADPH y 4 mM de NDMA en un volumen total de 1 ml. Se agregaron los microsomas (0.4 mg proteína) y se dejó incubar por 30 min a 37° C. Posteriormente se detuvo la reacción con 100 μ l de Sulfato de Zinc 25% y 100 μ l de solución saturada de Hidróxido de Bario. Luego de centrifugar la mezcla por 10 minutos a 2000 rpm se mezcló 0.7 ml del sobrenadante con la misma cantidad de reactivo de Nash. Esta mezcla se calentó a 70° C por 20 min y el formaldehído resultante se midió en el espectrofotómetro a 415 nm (Kleeberg y Klinger 1982).

10.2.9 Electroforesis en gel poliacrilamida e inmunodetección

Se llevó a cabo una electroforesis desnaturante de 10 µg de proteína microsomal en geles de poliacrilamida al 7.5% (SDS-PAGE). Se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (0.45 mm) durante toda una noche y se verificaron las proteínas al teñir con rojo de Ponceau (Towbin et al. 1979). Las membranas se bloquearon durante una hora con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 5% (w/v) en amortiguador de fosfatos (PBS), seguida de lavados con PBS-Tween 20 al 0.3% (v/v); posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpos policlonales de conejo anti-CYP1A1, anti-CYP1A2, anti-CYP1B1, anti-CYP2E1, anti-CYP3A2 y ratón anti-GAPDH según el caso en PBS-BSA al 0.5%) por una hora a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con PBS-Tween 20 (0.3% v/v), se incubó con un segundo anticuerpo de cabra anti-conejo y anticuerpo de conejo anti-ratón según el caso, conjugado con peroxidasa (en PBS-BSA 0.5%) durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante. Después de lavar PBS-Tween 20 (0.3% v/v) y un último lavado con PBS; las membranas se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina y H₂O₂ al 30% (v/v) o con luminol. Los análisis densitométricos de las membranas se realizaron con el programa ID Kodak versión 3.6.3.

10.3 Estudios in Vitro

10.3.1 Interacciones biotina-CYPs

Se determinaron las actividades EROD y MROD en microsomas de ratas tratadas con fenobarbital (60mg/kg i.p. los tres primeros días y 30mg/kg i.p. al cuarto día) y β-naftoflavona (80mg/kg i.p. en el tercer día) en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de biotina con la finalidad de explorar si la vitamina puede interferir con la actividad de estas enzimas. La reacción se llevó a cabo en una celda para fluorómetro en la cual se mezcló: el amortiguador de Tris-base 50

mM y MgCl_2 25 mM (930-960 μL) a pH 7.6, el sustrato disuelto en DMSO (10 μL de etoxirresorufina 50 μM o 20 μL de metoxirresorufina 0.5 mM) y NADPH 50 mM (10 μL) disuelto en el amortiguador. Todo esto se incubó a 37°C durante 3 min. Una vez terminado este tiempo se agregó el volumen equivalente a 200 μg de proteína microsomal hepática al mismo tiempo se adicionaron diferentes concentraciones de biotina (1, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La cinética de aparición de la resorufina se evaluó cada 15 segundos durante 3 minutos en un fluorómetro Versa FluorTM de BioRad. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 530 nm y la de emisión de 590 nm.

10.3.2 Ensayo de Ames

Se realizó el Ensayo de Ames de acuerdo al método y descrito (Maron y Ames 1983). El cultivo bacteriano se obtuvo mediante la inoculación de la cepa TA98 de *S. typhimurium* en caldo nutritivo líquido incubado a 37 ° C con agitación durante toda la noche. Se examinaron las fracciones S9 de hígado de ratas tratadas con biotina (2mg/kg, ip) durante 1, 3, 5 y 7 días y de ratas control. La mezcla consistió en fracción S9 (0.1mL/mL), MgCl_2 (8 mM), KCl (33 mM), glucosa 6-fosfato (5 mM) y NADP^+ (4 mM) en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7,4). El cultivo bacteriano (0,1 mL), BaP (1, 5, 10 y 20 μg por placa) y la mezcla S9 (0,5 mL) se mezclaron con agar blando y se vertieron en placas de Petri que contenían medio mínimo de Vogel-Bonner. Las placas se incubaron durante 48 - 72 horas y se registró el número de colonias revertantes (His^+).

10.4 Estadística

Para comparar los datos entre grupos se realizaron pruebas t-Student con una $p \leq 0.05$ utilizándose el programa GraphPad Prism v 4.0 (La Jolla CA, USA).

11. RESULTADOS

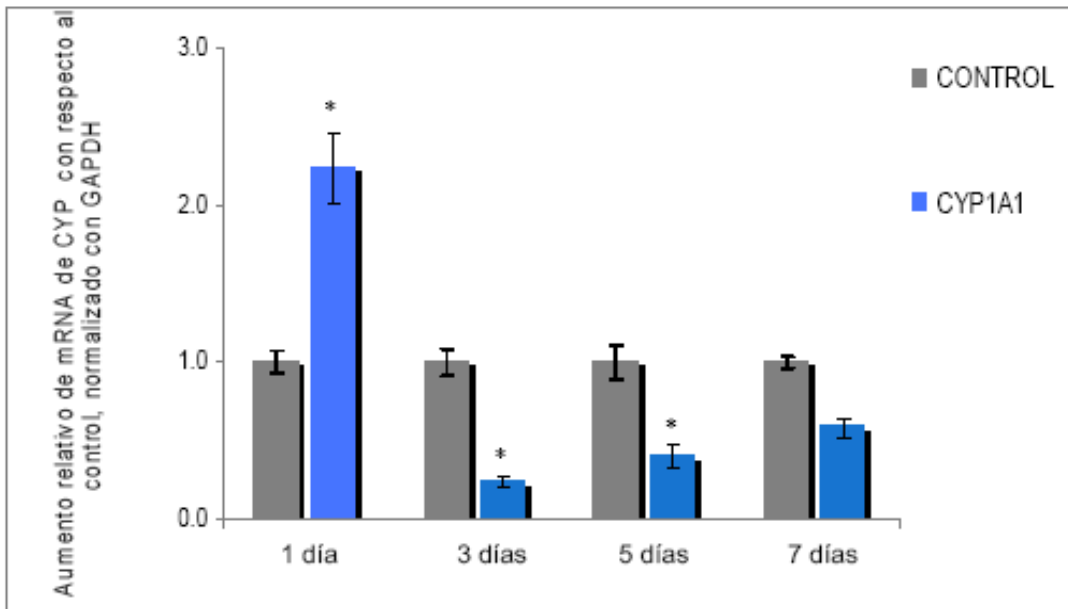
11.1 PCR en Tiempo Real

El objetivo del presente trabajo fue determinar si dosis farmacológicas de biotina modifican la expresión y actividad de citocromos involucrados en el metabolismo de xenobióticos y metabolismo endógeno *in vivo*.

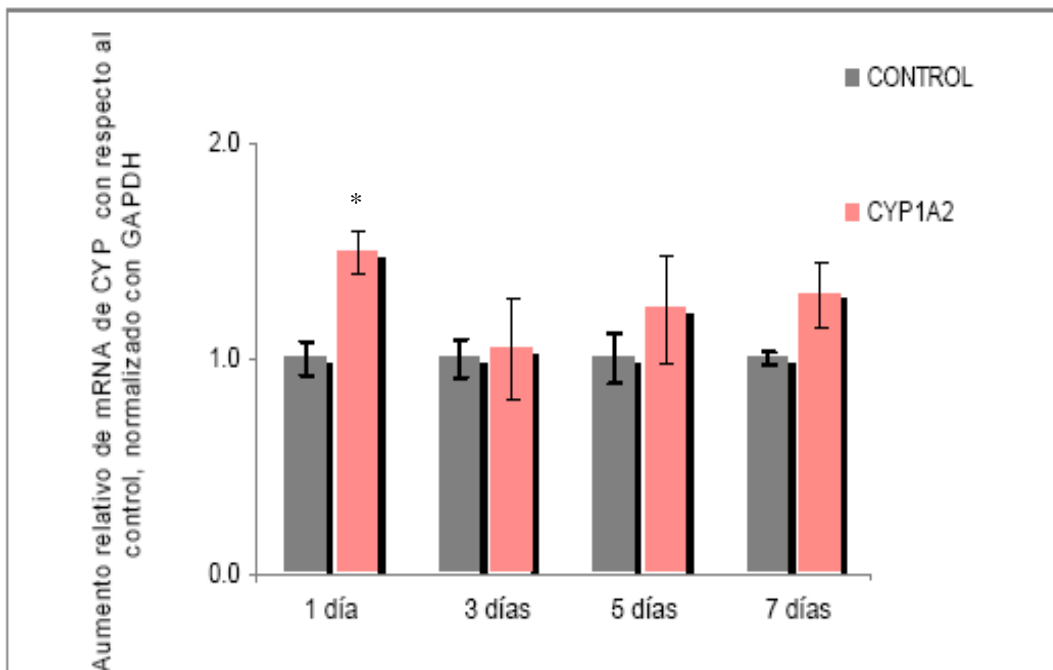
La modificación de CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1 y CYP3A2 *in vivo* se determinó en hígado de ratas control (amortiguador de fosfatos pH=7.4) y en ratas tratadas con biotina (2mg/kg). De acuerdo con los resultados obtenidos podemos decir que esta vitamina es capaz de modificar la expresión específicamente de la familia CYP1A y 1B a nivel transcripcional como se observa en la figura 30 (a-c), observándose un aumento significativo en el nivel de mRNA de CYP1A1 (2.23 ± 0.22), CYP1A2 (1.5 ± 0.10), y CYP1B1 (1.82 ± 0.15), a las 24 horas posteriores a la administración de la vitamina, a diferencia de los citocromos ya descritos no se observaron variaciones en los niveles de mRNA de CYP2E1 (0.90 ± 0.06), y CYP3A2 (0.50 ± 0.25) Figura 30 (d,e).

Posteriormente es interesante el efecto que se observa a los 3 días de administración ya que disminuyen significativamente los niveles de mensajero de CYP1A1 (0.24 ± 0.15) y CYP1B1 (0.14 ± 0.07), evento que será explicado en la discusión. CYP1A2, CYP2E1 y CYP3A2 no se modificaron. A los 5 y 7 días de administración los niveles de mRNA de CYP1A1, CYP1B1 y CYP1A2 van aumentando, respecto a los días anteriores, nuevamente los niveles del mRNA de CYP2E1 y CYP3A2 no se modifican.

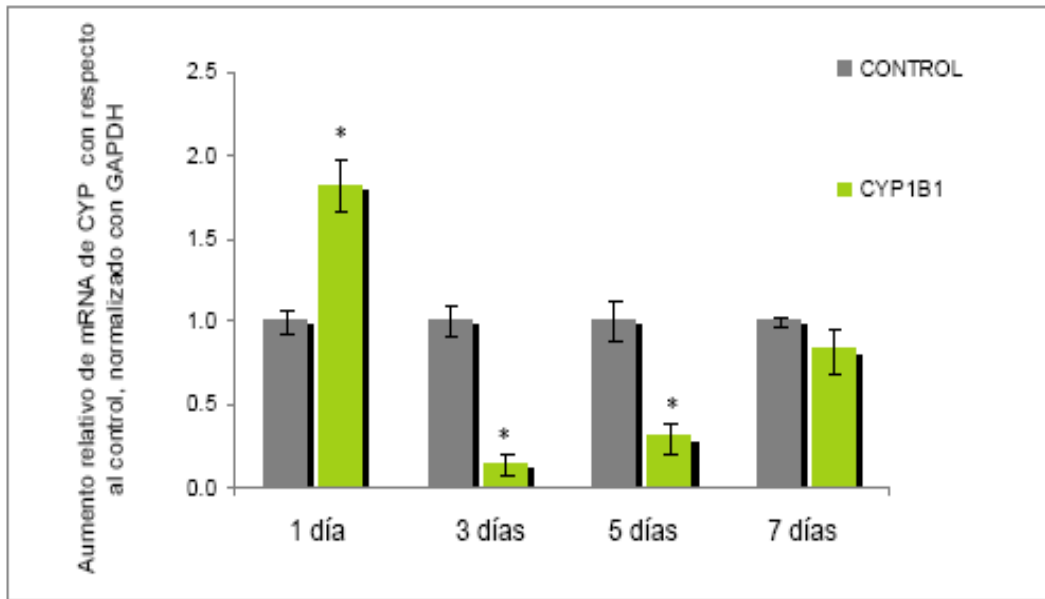
a)



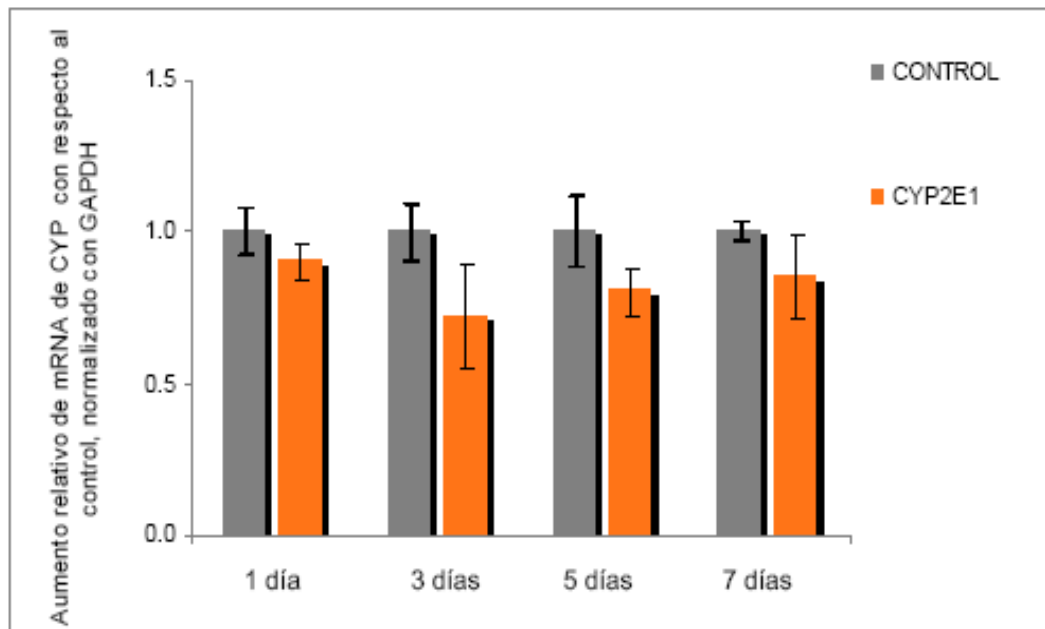
b)



c)



d)



e)

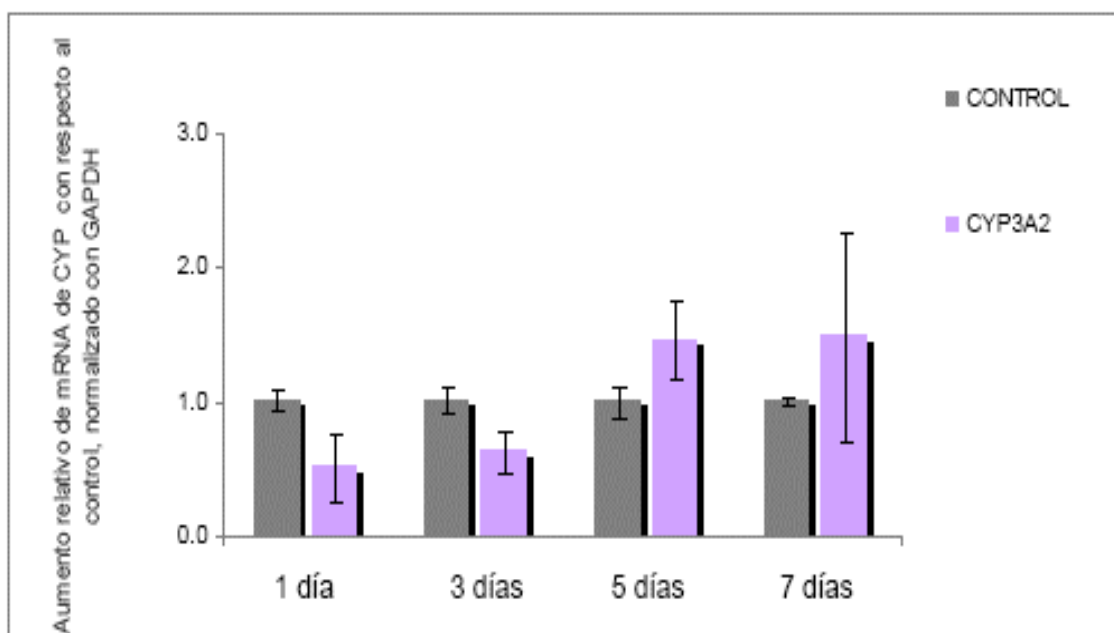


Figura 30. Efecto curso-temporal de la biotina en la abundancia del mRNA de los CYP1A1 (a), CYP1A2 (b), CYP1B1 (c), CYP2E1 (d) y CYP3A2 (e) en hígados de ratas tratadas con biotina. Los datos se expresan en incrementos relativos con respecto a su grupo control. Cada barra corresponde al promedio de 2 experimentos independientes por triplicado cada uno \pm ES, (n=4 ratas por grupo) normalizado con gapdh. *Denota diferencias significativas con el control $P \leq 0.05$.

11.2 Inmunodetección y análisis densitométrico.

Se realizaron ensayos de inmunodetección para los citocromos de interés utilizando microsomas hepáticos de rata control y tratadas con biotina. A las bandas obtenidas se les realizó un análisis densitométrico. Los resultados no muestran cambios (Figuras 31-35), y este es un hecho interesante ya que se ha descrito que el aumento en la actividad suele suceder por la intensificación de la transcripción sin embargo no observamos ese patrón, lo que podría estar hablando de un mecanismo regulación post-transcripcional.

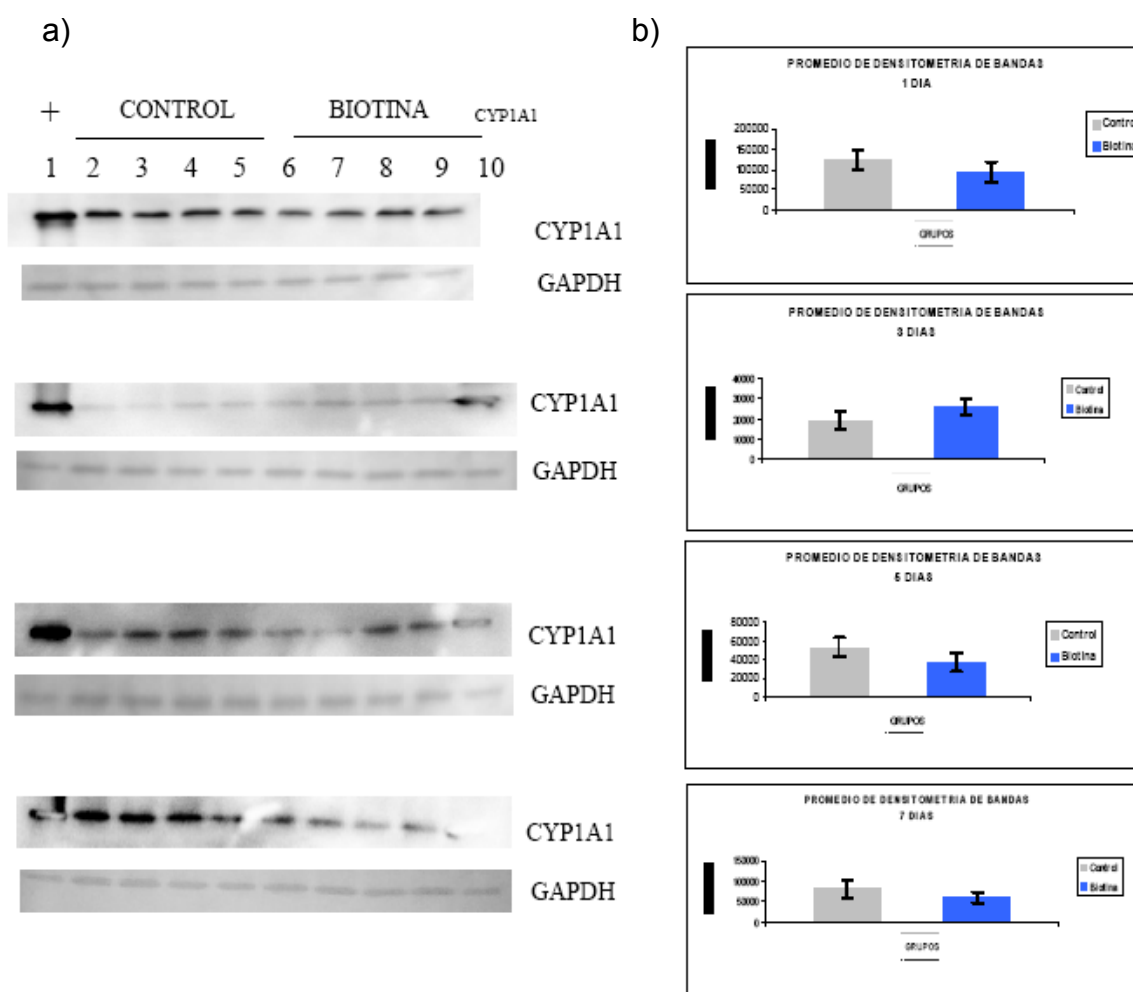


Figura 31. Inmunodetección (a) y análisis densitométrico (b) del CYP1A1 en ratas control (carril 2-4) y ratas tratadas con biotina (carril 6-9). La primera banda del

extremo izquierdo corresponde al control positivo (microsomas hepáticos de ratas tratadas con BaP) y la última banda del extremo derecho corresponde al CYP1A1. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a su grupo control. Cada columna en la gráfica representa el promedio de los valores densitométricos por tratamiento y tiempo de tratamiento del CYP1A1 \pm ES, (n=4 ratas por grupo). * $p \leq 0.05$ indica diferencias significativas.

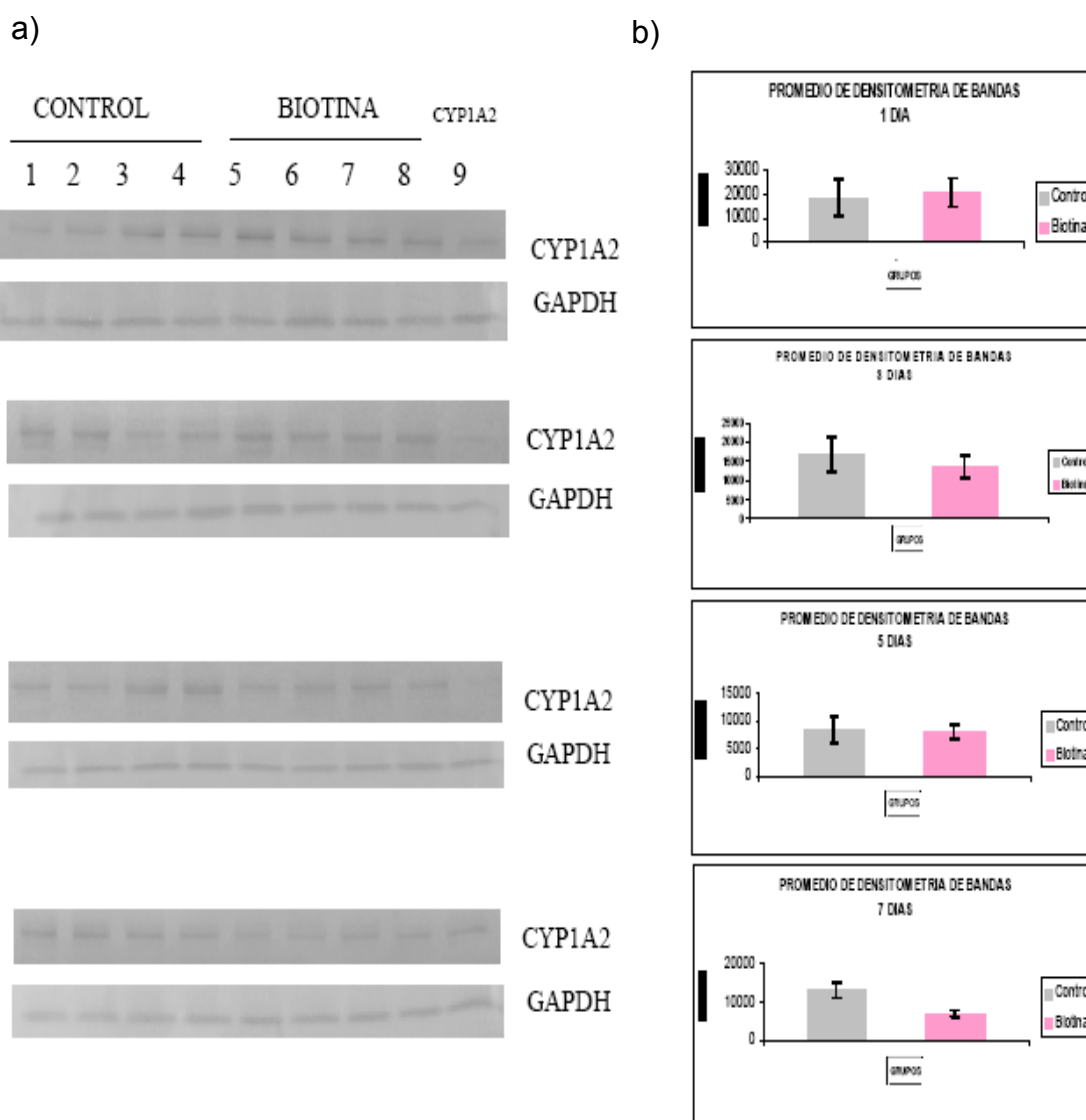
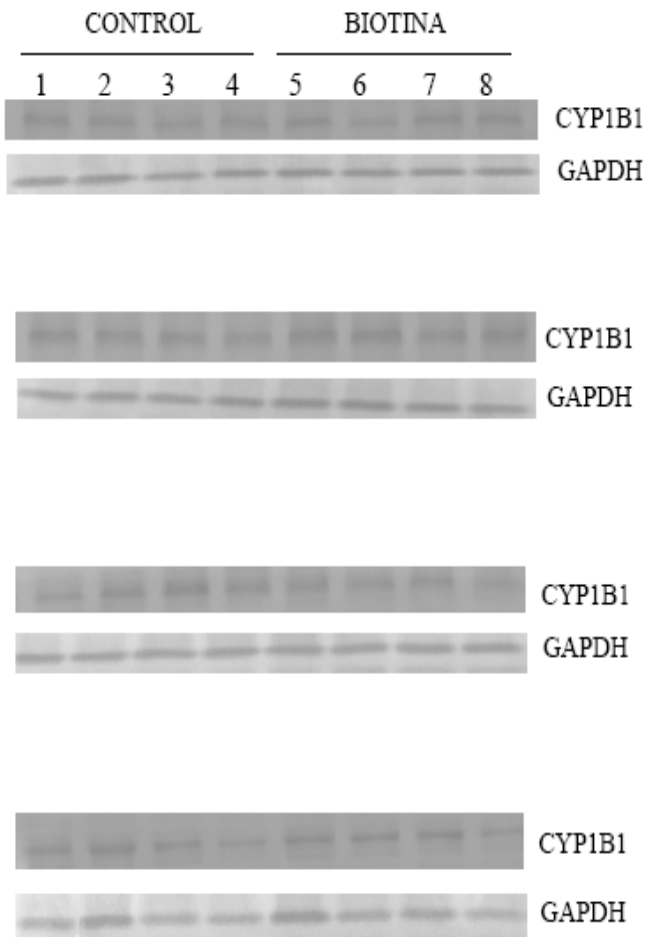


Figura 32. Inmunodetección (a) y análisis densitométrico (b) del CYP1A2 en ratas control (carril 1-4) y ratas tratadas con biotina (carril 5-8), la última banda del extremo derecho corresponde al CYP1A2. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a su grupo control. Cada columna en la gráfica representa el promedio de los valores densitométricos por tratamiento y tiempo de tratamiento del CYP1A2 \pm ES, (n=4 ratas por grupo). * $p \leq 0.05$ indica diferencias significativas.

a)



b)

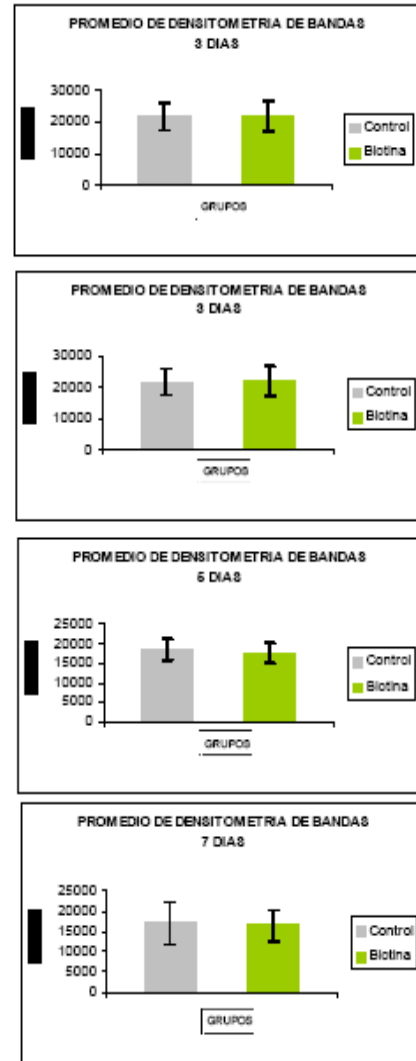


Figura 33. Inmunodetección (a) y análisis densitométrico (b) del CYP1B1 en ratas control (carril 1-4) y ratas tratadas con biotina (carril 5-8). Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a su grupo control. Cada columna en la gráfica representa el promedio de los valores densitométricos por tratamiento y tiempo de tratamiento del CYP1B1 \pm ES, (n=4 ratas por grupo). * $p \leq 0.05$ indica diferencias significativas.

a)



b)

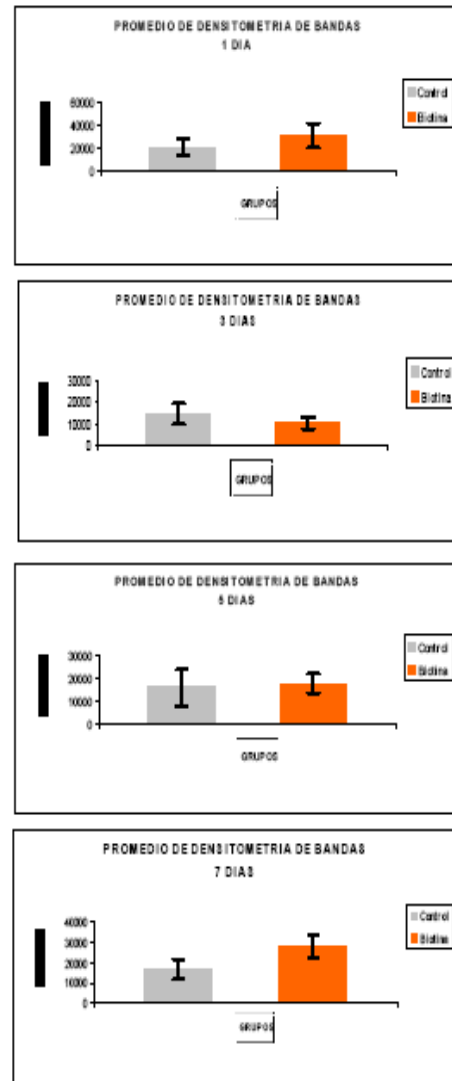


Figura 34. Inmunodetección (a) y análisis densitométrico (b) del CYP2E1 en ratas control (carril 2-5) y ratas tratadas con biotina (carril 6-9). La primera banda del extremo izquierdo corresponde al CYP2E1 y la última banda del extremo derecho corresponde al control positivo (microsomas hepáticos de ratas tratadas con ciclohexanol). Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a su grupo control. Cada columna en la gráfica representa el promedio de los valores densitométricos por tratamiento y tiempo de tratamiento del CYP2E1 \pm ES, (n=4 ratas por grupo). * $p \leq 0.05$ indica diferencias significativas.

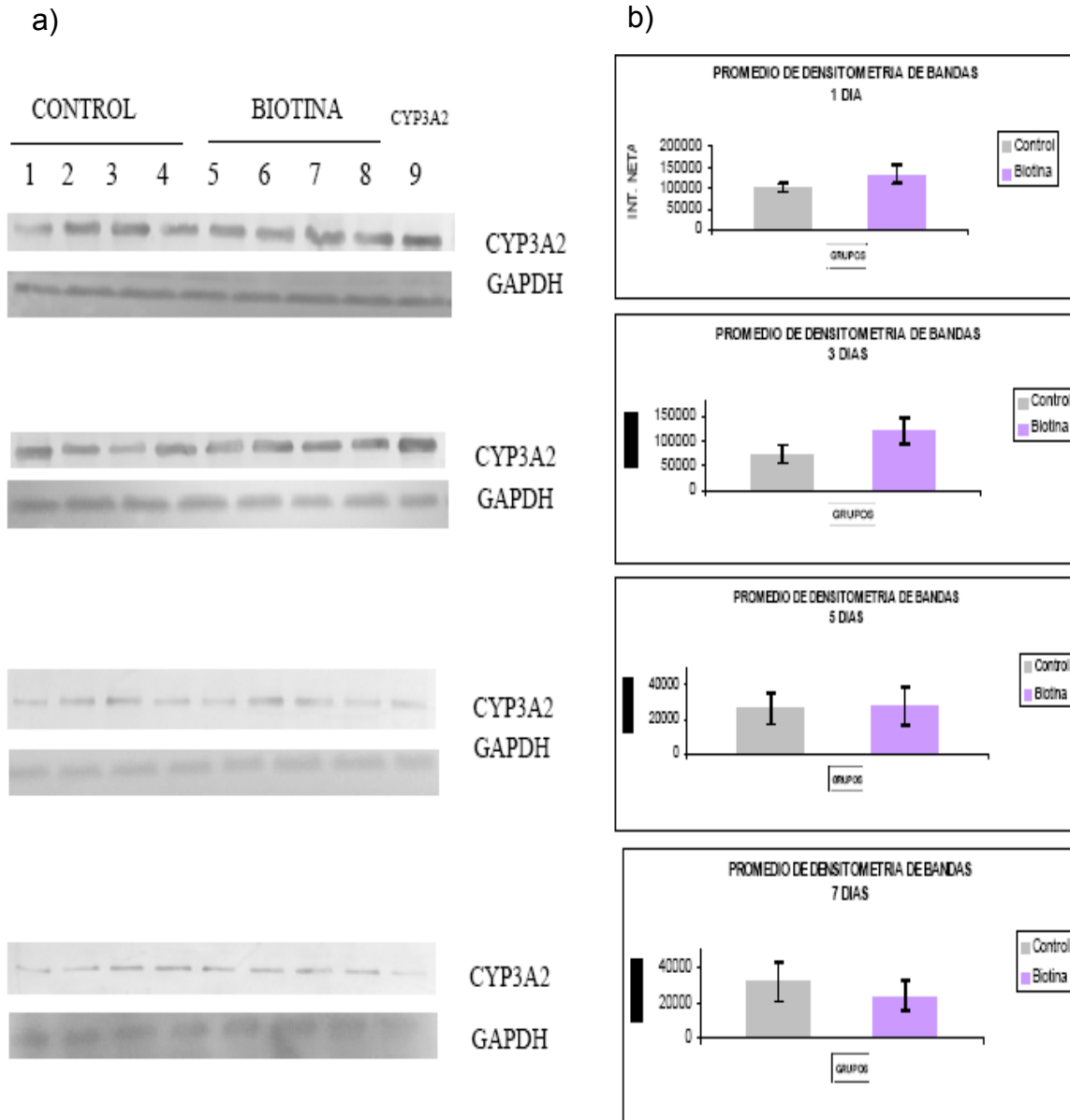
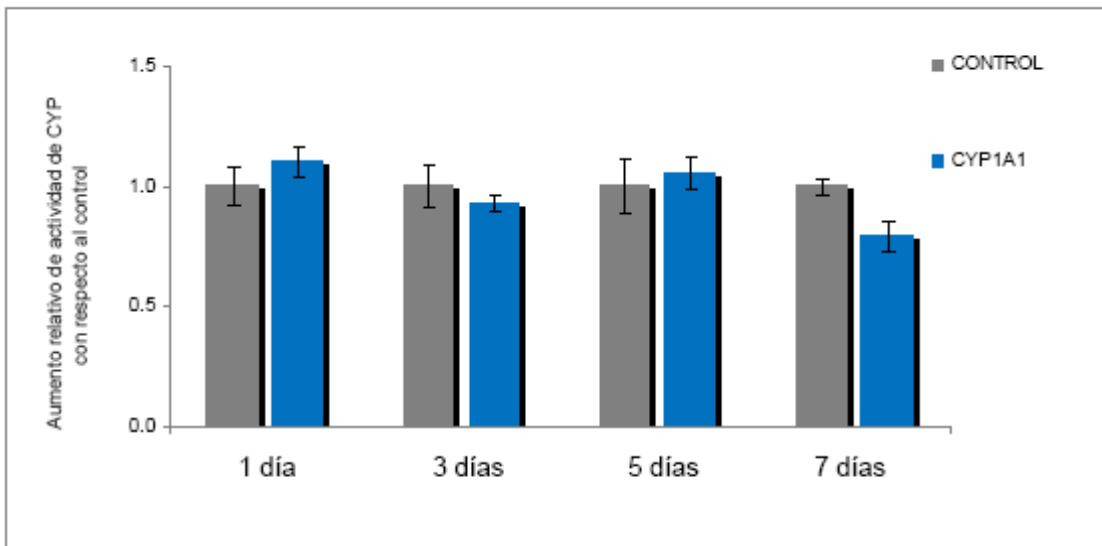


Figura 35. Inmunodetección (a) y análisis densitométrico (b) del CYP3A2 en ratas control (carril 1-4) y ratas tratadas con biotina (carril 5-8) la última banda del extremo derecho corresponde al CYP3A2. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a su grupo control. Cada columna en la gráfica representa el promedio de los valores densitométricos por tratamiento y tiempo de tratamiento del CYP3A2 \pm ES, (n=4 ratas por grupo). * $p \leq 0.05$ indica diferencias significativas.

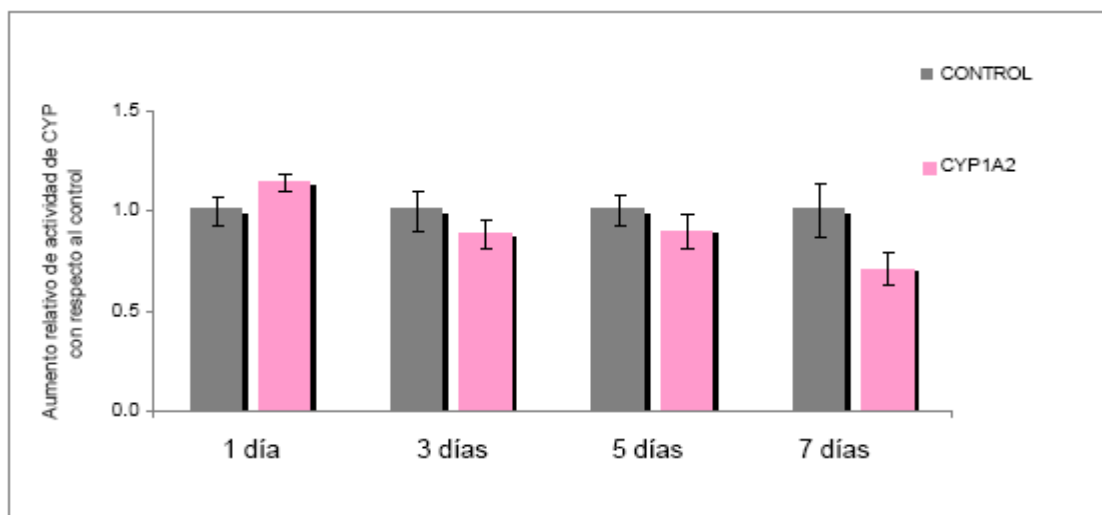
11.3 Determinación de la actividad enzimática

Se ha reportado que la vitamina biotina además de ser un regulador transcripcional también modifica la expresión a nivel postranscripcional (Collins et al. 1988; Stockert y Morell 1990; Stockert et al. 1992; Stockert y Ren 1997; De La Vega 1999; De La Vega and Stockert 2000) por lo cual también evaluamos su efecto a este nivel en microsomas hepáticos de rata.

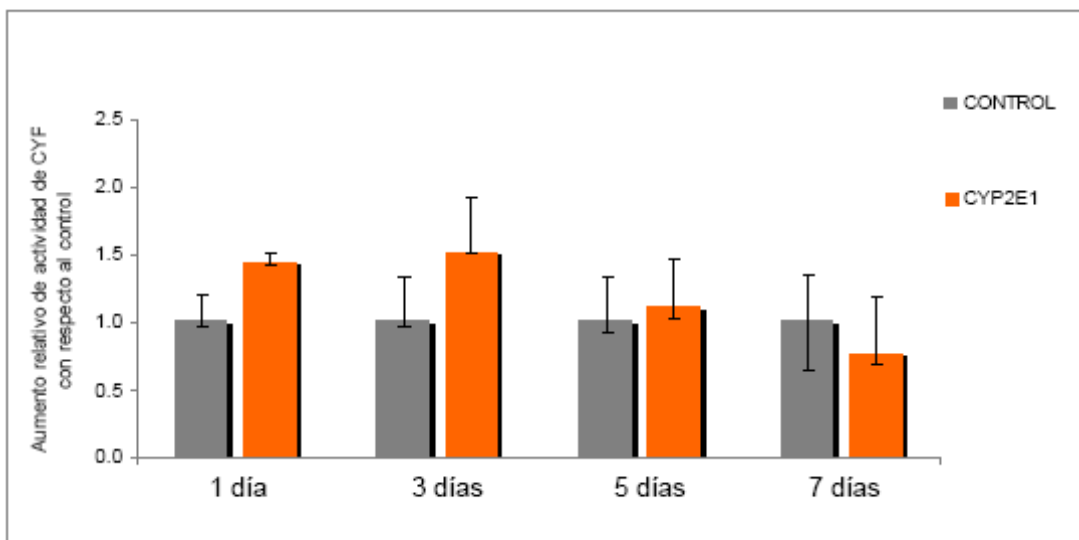
a)



b)



c)



d)

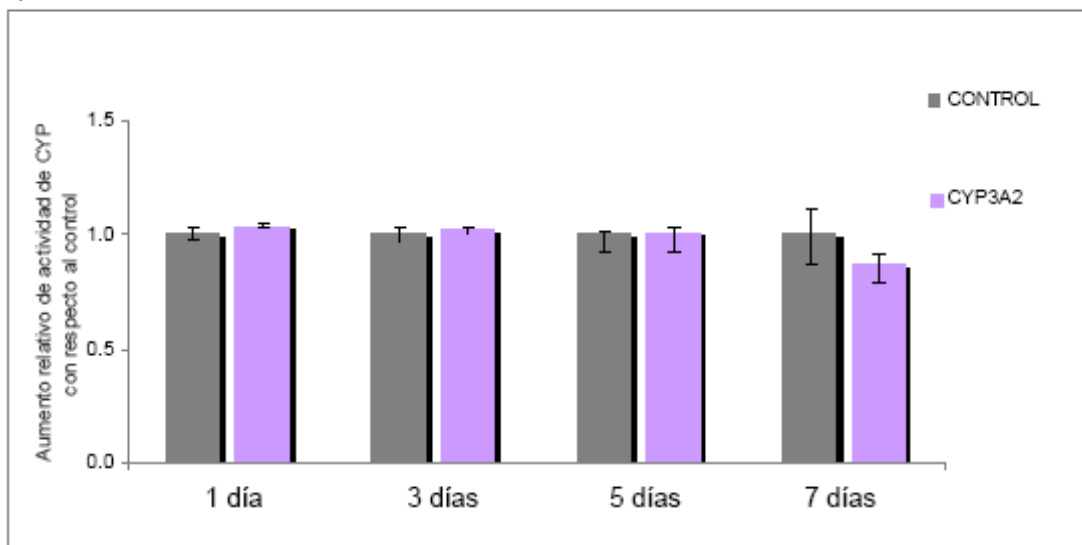


Figura 36. Actividad de CYP1A1 (a), CYP1A2 (b), CYP2E1 (c) y CYP3A2 (d) en microsomas de hígado de ratas en diferentes tiempos de tratamiento. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a su grupo control. Cada barra corresponde al promedio de actividad \pm ES de 4 ratas por grupo. * $p \leq 0.05$ indica diferencias significativas con respecto al control.

11.4 Determinación de los efectos de biotina en la actividad de CYP1A inducida con B(a)P.

Con la finalidad de evaluar si biotina tendría un efecto sinérgico con un inductor de citocromos, se administró conjuntamente biotina con BaP y se midieron las actividades EROD y MROD en microsomas hepáticos de rata. Los resultados muestran que las actividades fueron similares con el inductor solo o en combinación con biotina y también los grupos control comparados con los tratados con biotina.

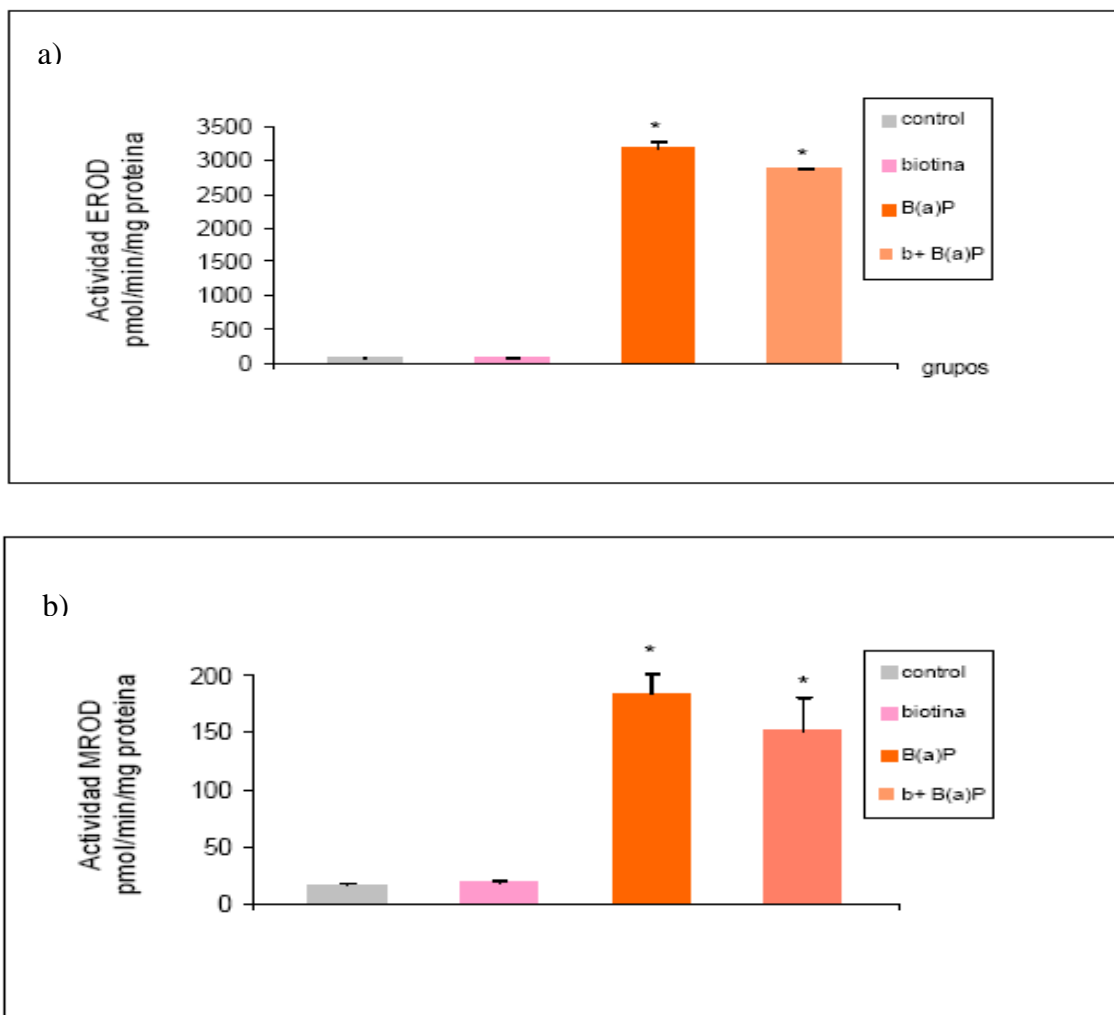


Figura 37. Actividad de CYP1A1 (a) y CYP1A2 (b) en microsomas de hígado de ratas tratadas con PBS1X (control), biotina (2mg/kg), B(a)P (10mg/kg) y biotina +B(a)P(2mg/kg + 10mg/kg respectivamente). Cada barra corresponde al promedio de la actividad \pm ES de 5 ratas por grupo. * $p \leq 0.05$ indica diferencias significativas con respecto al control.

11.5 Determinación de la posible interacción de biotina y las actividades de CYP1A1 y CYP1A2.

Microsomos de ratas tratadas con fenobarbital/ β -naftoflavona se usaron para investigar si biotina podría interferir con la actividad EROD y MROD, adicionando diferentes concentraciones de la vitamina en la mezcla de reacción con etoxiresorrufina y metoxiresorrufina. Los resultados indican que la biotina no interfiere con la actividad de los citocromos evaluados.

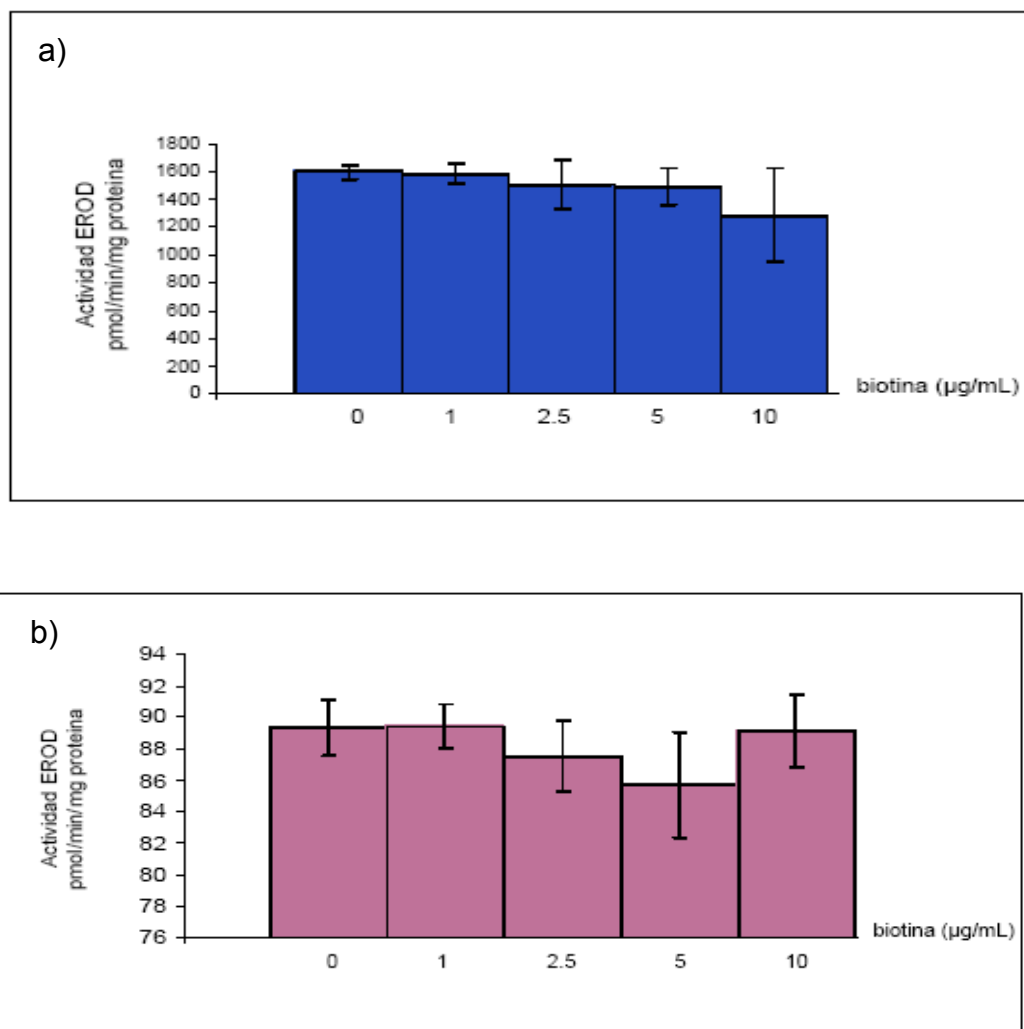


Figura 38. Efectos del tratamiento de biotina en la actividad de EROD (a) y MROD (b) en microsomas de hígado de ratas tratadas simultáneamente con fenobarbital (60mg/kg) y β -naftoflavona (80mg/kg). Concentraciones ascendentes de biotina fueron adicionadas a la mezcla de reacción al medir la actividad enzimática (pmol resorrufina formada / min/ mg proteína). Cada barra corresponde al promedio \pm ES de dos experimentos independientes por triplicado cada uno.

11.6 Ensayo de Ames

La potencia mutagénica de BaP resultante de su activación por la mezcla S9 de ratas tratadas con biotina fue muy similar a las de ratas control, siendo de 57.2 rev/μg cuando es activado con S9 de ratas tratadas con biotina por 24 hrs, comparado con 40.5 rev/μg con S9 de ratas control. La potencia mutagénica de BaP activado por S9 de ratas control y tratadas con biotina por 7 días fue, 16.5 y 15 rev/μg respectivamente. La potencia mutagénica de BaP activado por S9 de ratas tratadas con un inductor de citocromos fue de 62.3 y 37.4 rev/μg después de 1 y 7 días de tratamiento, respectivamente.

TABLA 2: Evaluación de la mutagenicidad de la fracción S9 de ratas tratadas con biotina en el ensayo de Ames.

Día	Químico	Dosis (μg/placa)	No. de revertantes His ⁺ /placa ^(a)		
			B ⁻ ^(b)	B ⁺ ^(c)	Control positivo ^(d)
1	B[a]P	0	23 ± 5	18 ± 1	28 ± 6
		1	55 ± 17	55 ± 8	59 ± 6
		5	229 ± 104	210 ± 59	433 ± 143
		10	215 ± 67	220 ± 61	557 ± 86
		20	304 ± 49	281 ± 30	913 ± 144
		Revertantes inducidas/μg ^(e)	40.5	52.7	62.3
7	B[a]P	0	49 ± 8	62 ± 10	66 ± 7
		1	68 ± 7	66 ± 8	81 ± 27
		5	132 ± 7	137 ± 20	300 ± 29
		10	114 ± 17	128 ± 8	436 ± 99
		20	148 ± 31	159 ± 15	773 ± 127
		Revertantes inducidas/μg ^(e)	16.5	15.0	37.4

^(a) No. de colonias revertantes/placa por triplicado de dos experimentos independientes.

^(b) Fracción S9 de hígado de ratas control.

^(c) Fracción S9 de hígado de ratas tratadas con biotina (2 mg/kg).

^(d) Fracción S9 de hígado de ratas tratadas con fenobarbital (60 mg/kg) y β-naftoflavona (80 mg/kg), usado como control positivo.

^(e) La pendiente en el origen se calculó utilizando el programa de software SALANAL.

11.7 Predicción in silico de la interacción de miRNAs y CYPs

Para evaluar la posible participación de miRNAs en la regulación de CYPs en rata, se buscaron las secuencias de miRNAs que se han reportado regulan la expresión de citocromos (Tsuchiya et al. 2006; Pan et al. 2009; Mohri et al. 2010). Como los resultados de la búsqueda fueron en humano, se buscaron las secuencias homólogas en rata. Con herramientas como BLAST, ENSEMBL y miRBASE se alinearon las secuencias de los pre-mRNAs y miRNAs maduros de rata con las secuencias de CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 de rata.

miRNA-27b RATA

PRECURSOR

>rno-mir-27b MI0000859

ACCUCUCUAACAAGGUGCAGAGCUUAGCUGAUUGGUGAACAGUGAUUGGUUUCCGCUUUGUUCACA
GUGGCUAAGUUCUGCACCUGAAGAGAAGGUG

MADURO

>rno-miR-27b-5p MIMAT0017101

19-AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAACAG-42

ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE Y REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A1 DE RATA CON miR-27b MADURO DE RATA

(La región 3'-UTR esta marcada en negritas y los apareamientos están subrayados).

CATCCTCCCTGGGGTCCTAGAGAACACTCTTCAGTTCAGTCCCTTCCTCACAGCCAAAGCAGCCACC
TAGATCATGCCTTCTGTGTATGGATTCCCAGCCTTCACATCAGCCACAGAGCTGCTCTTGGCCGTC
ACCACATTCTGCCTTGGATTCTGGGTGGTTAGAGTCACAAGAACCTGGGTTCCCAAAGGTCTGAAG
AGTCCACCCGGACCCTGGGGCTTGCCCTTCATGGGGCACGTGCTGACCCTGGGGAAGAACCCACAC
CTGTCACTGACAAAAGTGAAGTCAGCAGTATGGGGACGTGCTGCAGATCCGTATTGGCTCCACACCC
GTGGTGGTGCTGAGCGGCCTGAACACCATCAAGCAGGCCCTGGTGAAACAGGGGGATGACTTCAAA
GGCCGGCCAGACCTCTACAGCTTCACACTTATCGCTAATGGCCAGAGCATGACTTTCAACCCAGAC
TCTGGACCGCTGTGGGCTGCCCGCCGGCGCCTGGCCAGAATGCGCTGAAGAGTTTCTCCATAGCC
TCAGACCCAACACTGGCATCCTCTTGCTACTTGGGAAGAGCACGTGAGCAAAGAGGGCTGAATACTTA
ATCAGCAAGTTCCAGAAGCTGATGGCAGAGGTTGGCCACTTCGACCCTTTCAAGTATTTGGTGGTG
TCAGTGGCCAATGTCATCTGTGCCATATGCTTTGGCAGACGTTATGACCACGATGACCAAGAGCTG
CTCAGCATAGTCAATCTAAGCAATGAGTTTGGGGAGGTTACTGGTTCTGGATAACCAGCTGACTTC

ATTCCCTATCCTCCGTTACCTCCCTAACTCTTCCCTGGATGCCTTCAAGGACTTGAATAAGAAGTTC
TACAGTTTTCATGAAGAAGCTAATCAAAGAGCACTACAGGACATTTGAGAAGGGCCACATCCGGGAC
ATCACAGACAGCCTCATTGAGCATTGTTCAGGACAGGAGGCTGGACGAGAATGCCAATGTCCAGCTC
TCAGATGATAAGGTCATTACGATTGTTTTTGGACCTCTTTGGAGCTGGGTTTTGACACAATCACAAC
GCTATCTCTTGGAGCCTCATGTACCTGGTAACCAACCCTAGGATACAGAGAAAGATCCAGGAGGAG
TTAGACACAGTGATTGGCAGGGATCGGCAGCCCCGGCTTTCTGACAGACCTCAGCTGCCCTATCTG
GAGGCCTTCATCCTGGAGACCTTCGGACATTCATCCTTTGTCCCATTCCACCATCCCCACAGCACC
ATAAGAGATACAAGTCTGAATGGCTTCTATATCCCAAGGGACACTGTGTCTTTGTGAACCAGTGG
CAGGTTAACCATGACCAGGAACCTATGGGGTGATCCAAACGAGTTCGGCCTGAAAGGTTTTCTTACC
TCCAGTGGCACTCTGGACAAACACCTGAGTGAGAAGGTCATTCTCTTTGGTTTTGGGCAAGCGAAAG
TGCATTGGGGAGACCATTGGCCGACTGGAGGTCTTTCTCTTCTGGCCATCCTGCTGCAGCAAATG
GAATTTAATGTGTCACCAGGCGAGAAGGTGGATATGACTCCTGCCTATGGGCTGACTTTAAAACAT
GCCCCGTGTGAGCACTTCCAAGTGCAGATGCGGTCTTCTGGTCTCAGCATCTCCAGGCTTAGACT
GTCTGGATGCTCACCAGACTAGGTGGCTGTTCTTAGGATTCAACTTCAGTCAGAAACACAGACCC
TGGGGCATTGTGCCTGCCTCCTACTTTGGACTTGTCTCTATATGCTGAACACAGACACTGGGCA
CAGCAGAGACCCACAGGAACCTCAGATCCTTCTCAAGTTCAGCATCAACTAGGAGACCTAAAAGGG
TTATGAGATACTGGGCCTCAGAAAACCCCTGAAGAGCTCTCTGGTCTCAGTGGCTGGCTGGTT
TGAAAAATACTTACAACAGGTCATGCTAGGATCTGGCTGGTTACTTTGACAACCGGGAGTAGCCCA
GAATGGAGGGAGAAGAGAACTCAAATACTGGCACGGAGGTGCTCTTGCCATCTGCTGAGGCTCAA
CTGTCTTCCAACATGGGTTTTATGACACTACATGTGGGGGTGTAGCACCTTCATTTACCCTACATAG
AAATAACAAGGTCTCCTTGTCTTGCAAAGCCCATGTTCTGTTTAGGAAGGGCTGAGAGTTGTG
TGTAGAAAGACCTAAGAACATAGGGACAGACTTCTGGGCAGTAAGACCAGGTTTAGAGTAAAGGA
ATGCCTTTTGAGACAGTATTGTGTAGTCCAAGTTGCCTCTGAACTTGCTACCAAGGGTGGCCTTGA
ACTCCTTAATTCTTTTTTCTGCTTTTACCACCTACCAAGTGCTAGGGTACAGTCATGAACCGCTA
CACCAGCTCTTGGTCTCTTGTCTTTACTGTATAAAACGTTTCTTCTTTCTTTTTTTTTTAAAGAA
AATGTTTGTGCATAAGAGTTTTTTATTGTGGCCTGTATTTTGTCTTATGCATTTGTATTAGTCGTAC
TTCAATAGATTTAGATAATTCGCTTAGTGTAATAGAGAAAAATCTAACTCAAGTATCCAGAAATAT
ATAGGAAAAACGTACCTGAGCTAAATAAAAAATATTACCTGG

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A1 DE RATA CON pre-miR-27b DE RATA

Download [Graphics](#) ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Sequence ID: |c||9659 Length: 2615 Number of Matches: 1

Range 1: 1129 to 1139 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

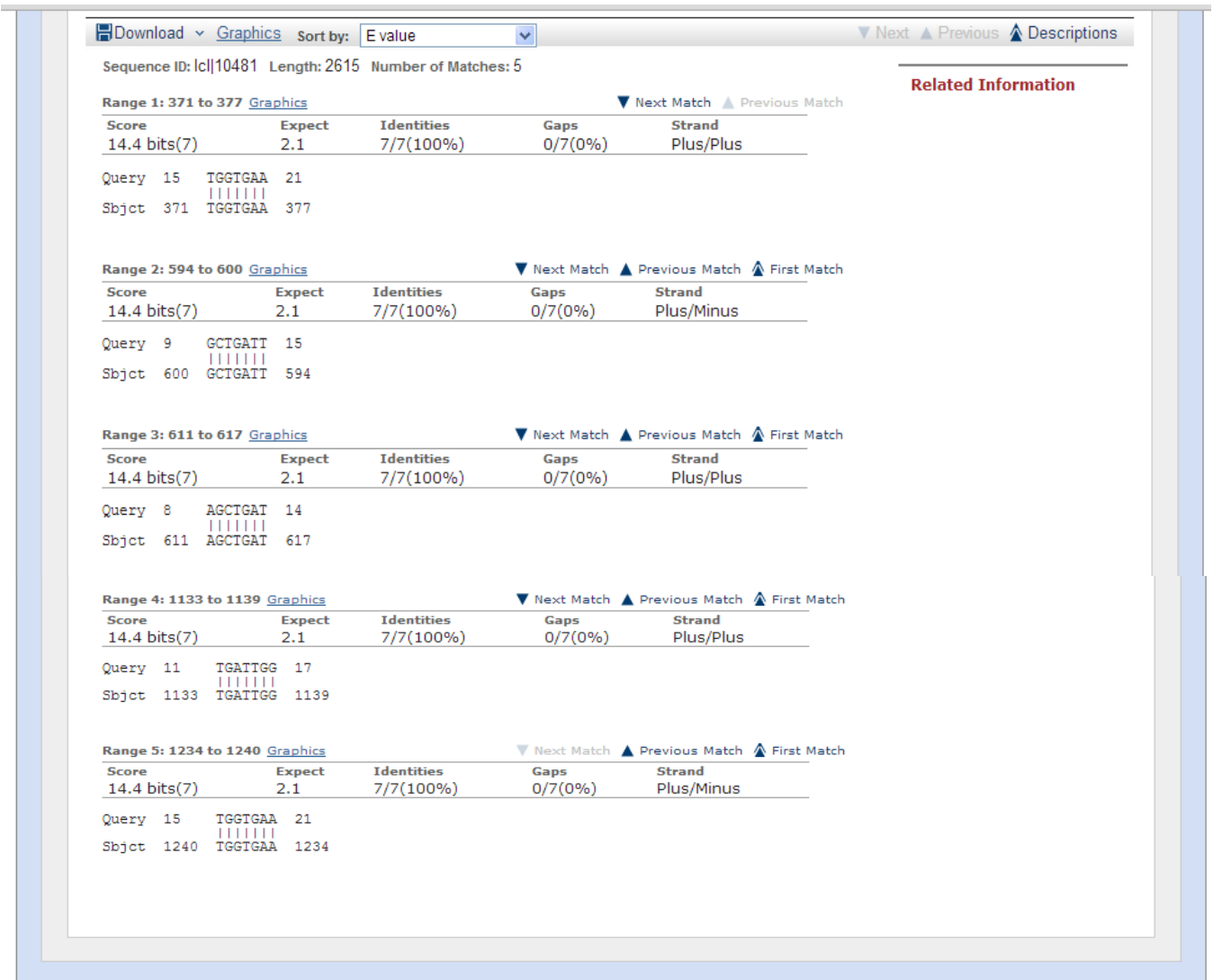
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
21.1 bits(22)	0.097	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus

Query 39 ACAGTGATTGG 49
 | | | | | | | | | |
Sbjct 1129 ACAGTGATTGG 1139

Related Information

RESULTADO DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A1 DE RATA con pre-miR27b DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A1 DE RATA CON miR-27b MADURO DE RATA



RESULTADO DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A1 DE RATA CON miR27b MADURO DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

Figura 39. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A1 de rata con la secuencias del pre-miR-27b y miR-27b maduro de rata.

miRNA-122 RATA

PRECURSOR

>rno-mir-122 MI0000891

CCUUAGCAGAGCUCUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCCAAAACAUCAAAACGCCAUCAUACACAC
UAAACAGCUACUGCUAGGC

MADURO

>rno-miR-122-3p MIMAT0017116

51-AACGCCAUCAUCACACUAA-69

**ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE Y REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A1
RATA CON miR-122 MADURO DE RATA**

(La región 3'-UTR esta marcada en negritas y los apareamientos están subrayados).

CATCCTCCCTGGGGTCCTAGAGAACTCTTCAGTTCAGTCCTTCCTCACAGCCAAAGCAGCCACC
TAGATCATGCCTTCTGTGTATGGATTCCCAGCCTTCACATCAGCCACAGAGCTGCTCTTGGCCGTC
ACCACATTCTGCCTTGGATTCTGGGTGGTTAGAGTCACAAGAACCCTGGGTTCCAAAGGTCTGAAG
AGTCCACCCGGACCCTGGGGCTTGCCCTTCATGGGGCACGTGCTGACCCTGGGGAAGAACCACAC
CTGTCACTGACAAAACCTGAGTCAGCAGTATGGGGACGTGCTGCAGATCCGTATTGGCTCCACACCC
GTGGTGGTGCTGAGCGCCTGAACACCATCAAGCAGGCCCTGGTGAACAGGGGGATGACTTCAA
GGCCGGCCAGACCTCTACAGCTTCACACTTATCGCTAATGGCCAGAGCATGACTTTCAACCCAGAC
TCTGGACCGCTGTGGGCTGCCC GCCGCGCCTGGCCAGAATGCGCTGAAGAGTTTCTCCATAGCC
TCAGACCCAACACTGGCATCCTCTTGCTACTTGGAAGAGCACGTGAGCAAAGAGGCTGAATACTTA
ATCAGCAAGTTCAGAAGCTGATGGCAGAGGTTGGCCACTTCGACCCTTTCAAGTATTTGGTGGTG
TCAGTGGCCAATGTCATCTGTGCCATATGCTTTGGCAGACGTTATGACCACGATGACCAAGAGCTG
CTCAGCATAGTCAATCTAAGCAATGAGTTTGGGGAGGTTACTGGTTCTGGATAACCAGCTGACTTC
ATTCTATCCTCCGTTACCTCCCTAACTCTTCCCTGGATGCCTTCAAGGACTTGAATAAGAAGTTC
TACAGTTTCATGAAGAAGCTAATCAAAGAGCACTACAGGACATTTGAGAAGGGCCACATCCGGGAC
ATCACAGACAGCCTCATTGAGCATTGTCAGGACAGGAGGCTGGACGAGAATGCCAATGTCCAGCTC
TCAGATGATAAAGTCAATTACGATTGTTTTTGGACCTCTTTGGAGCTGGGTTTGGACACAATCACAAC
GCTATCTCTTGGAGCCTCATGTACCTGGTAACCAACCCTAGGATACAGAGAAAAGATCCAGGAGGAG
TTAGACACAGTGATTGGCAGGGATCGGCAGCCCCGGCTTTCTGACAGACCTCAGCTGCCCTATCTG
GAGGCCTTCATCCTGGAGACCTTCCGACATTCATCCTTTGTCCATTCACCATCCCCACAGCACC
ATAAGAGATAAAGTCTGAATGGCTTCTATATCCCAAGGGACACTGTGTCTTTGTGAACCAGTGG
CAGGTTAACCATGACCAGGAACCTATGGGGTGATCCAAACGAGTTCGGCCTGAAAGGTTTCTTACC
TCCAGTGGCACTCTGGACAAACACCTGAGTGAGAAGGTCATTCTCTTTGGTTTGGGCAAGCGAAAG

TGCATTGGGGAGACCATTGGCCGACTGGAGGTCTTTCTCTTCCTGGCCATCCTGCTGCAGCAAATG
GAATTTAATGTGTCACCAGGCGAGAAGGTGGATATGACTCCTGCCTATGGGCTGACTTTAAAAACAT
GCCCCTGTGAGCACTTCCAAGTGCAGATGCGGTCTTCTGGTCCCTCAGCATCTCCAGGCTTAGACT
GTCTGGATGCTCACCAGACTAGGTGGCTGTTCCCTAGGATTCAACTTCAGTCAGAAACACAGACCC
TGGGCGATTGTGCCTGCCTCCTACTTTGGACTTGTTTCTCTATATGCTGAACACAGACACTGGGCA
CAGCAGAGACCCACAGGAACCTCAGATCCTTCTCAAGTTCAGCATCAACTAGGAGACCTAAAAGGG
TTATGAGATACCTGGGCTCAGAAAACCCCTGAAGAGCTCTCTGGTCCCTCCAGTGGCTGGCTGGTT
TGAAAAATACTTACAACAGGTCATGCTAGGATCTGGCTGGTTACTTTGACAACCGGGAGTAGCCCA
GAATGGAGGGAGAAGAGAACTCAAATACTGGCACGGAGGTGCTCTTGCCATCTGCTGAGGCTCAA
CTGTCTTCCAACATGGGTTTATGACACTACATGTGGGGGTGTAGCACCTTCATTTACCCTACATAG
AAATAACAAGGTCTCCTTGTCTTGCAAAGCCCATGTTCTGTTTAGGAAGGGCTGAGAGTTGTG
TGTAGAAAGACCTAAGAACATAGGGACAGACTTCTGGGCAGTAAGACCAGGTTTAGAGTAAAGGA
ATGCCTTTTGAGACAGTATTGTGTAGTCCAAGTTGCCTCTGAACTTGCTACCAAGGGTGGCCTTGA
ACTCCTTAATTCTTTTTTCTGCTTTTACCACCTACCAAGTGCTAGGGTACAGTCATGAACCGCTA
CACCAGCTCTTGGTCTCTTGTCTTTACTGTATAAAACGTTTCTTCTTTCTTTTTTTTTTAAAGAA
AATGTTTGTGCATAAGAGTTTTTTATTGTGGCCTGTATTTTGCTTATGCATTTGTATTAGTCGTAC
TTCAATAGATTTAGATAATTCGCTTAGTGTAATAGAGAAAAATCTAACTCAAGTATCCAGAAATAT
ATAGGAAAAACGTACCTGAGCTAAATAAAAAATATTACCTGG

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A1 DE RATA CON pre-mir -122 DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A1 DE RATA CON pre-mir -122 DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

RESULTADOS DEL ALINAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A1 DE RATA CON miR-122 MADURO DE RATA

Alignments

Download Graphics Sort by: E value Next Previous Descriptions

Sequence ID: lc|56115 Length: 2615 Number of Matches: 4

Range 1: 419 to 425 Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	1.5	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Plus

Query 11 TCACACT 17
 |||||
 Sbjct 419 TCACACT 425

Range 2: 614 to 620 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	1.5	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus

Query 4 GCCATCA 10
 |||||
 Sbjct 620 GCCATCA 614

Range 3: 924 to 930 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	1.5	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Plus

Query 9 CAICACA 15
 |||||
 Sbjct 924 CAICACA 930

Range 4: 2532 to 2538 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	1.5	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus

Query 13 ACACTAA 19
 |||||
 Sbjct 2538 ACACTAA 2532

Related Information

RESULTADO DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A1 DE RATA CON
miR-122 MADURO DE RATA

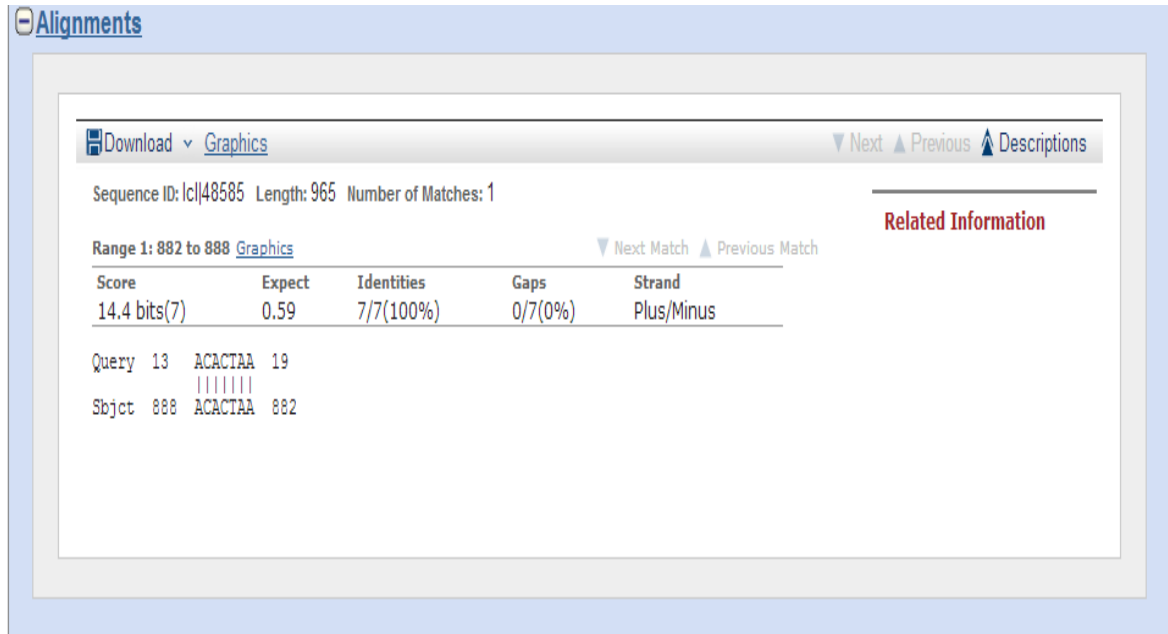


Figura 40. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A1 de rata con la secuencias del pre-miR-122 y miR-122 maduro de rata.

miRNA-328 RATA

PRECURSOR

>rno-mir-328a MI0000602
UGGGGCAGGGGGGCAGGAGGGGCUCAGGGAGAAAGCAUCUACAGCCCCUGGCCUCUCUGCCCUUC
CGUCCCCUGUCCCCAAAU

MADURO

>rno-miR-328a-5p MIMAT0017029
8-GGGGGCAGGAGGGGCUCA-26

ALINAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE Y REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A1 DE RATA CON miR-328a MADURO DE RATA

(La región 3'-UTR esta marcada en negritas y los apareamientos están subrayados).

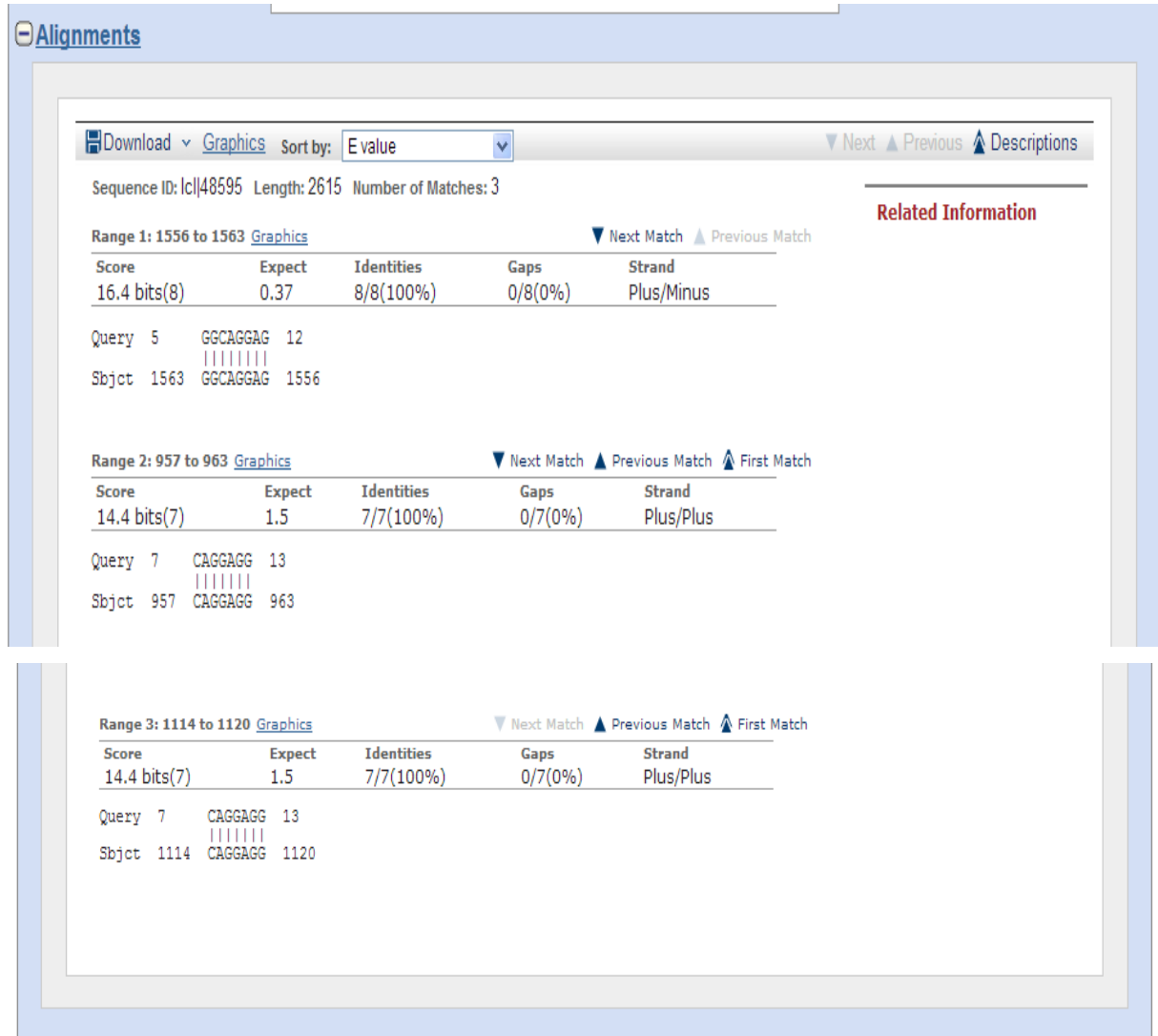
CATCCTCCCTGGGGTCCTAGAGAACACTCTTCAGTTCAGTCCTTCCTCACAGCCAAAGCAGCCACC
TAGATCATGCCTTCTGTGTATGGATTCCCAGCCTTCACATCAGCCACAGAGCTGCTCTTGGCCGTC
ACCACATTCTGCCTTGGATTCTGGGTGGTTAGAGTCACAAGAACCCTGGGTTCCTCAAAGGTCTGAAG
AGTCCACCCGGACCTTGGGGCTTGCCCTTCATGGGGCACGTGCTGACCCTGGGGAAGAACCCACAC
CTGTCACTGACAAAACCTGAGTCAGCAGTATGGGGACGTGCTGCAGATCCGTATTGGCTCCACACCC
GTGGTGGTGCTGAGCGGCCTGAACACCATCAAGCAGGCCCTGGTGAACAGGGGGATGACTTCAAA
GGCCGGCCAGACCTCTACAGCTTCACACTTATCGCTAATGGCCAGAGCATGACTTTC AACCCAGAC
TCTGGACCGCTGTGGGCTGCCC GCCGGCGCCTGGCCCAGAATGCGCTGAAGAGTTTCTCCATAGCC
TCAGACCCAACACTGGCATCCTCTTGCTACTTGGAAGAGCACGTGAGCAAAGAGGCTGAATACTTA
ATCAGCAAGTTCCAGAAGCTGATGGCAGAGGTTGGCCACTTCGACCCTTTC AAGTATTTGGTGGTG
TCAGTGGCCAATGTCATCTGTGCCATATGCTTTGGCAGACGTTATGACCACGATGACCAAGAGCTG
CTCAGCATAGTCAATCTAAGCAATGAGTTTGGGGAGGTTACTGGTTCTGGATAACCAGCTGACTTC
ATTCCATCCTCCGTTACCTCCCTAACTCTTCCCTGGATGCCTTCAAGGACTTGAATAAGAAGTTC
TACAGTTTCATGAAGAAGCTAATCAAAGAGCACTACAGGACATTTGAGAAGGGCCACATCCGGGAC
ATCACAGACAGCCTCATTGAGCATTGTCAGGACAGGAGGCTGGACGAGAATGCCAATGTCCAGCTC
TCAGATGATAAGGTCATTACGATTGTTTTTGGACCTCTTTGGAGCTGGGTTTGGACACAATCACAACT
GCTATCTCTTGGAGCCTCATGTACCTGGTAACCAACCCTAGGATACAGAGAAAAGATCCAGGAGGAG
TTAGACACAGTGATTGGCAGGGATCGGCAGCCCCGGCTTTCTGACAGACCTCAGCTGCCCTATCTG
GAGGCCTTCATCCTGGAGACCTTCGGACATTCATCCTTTGTCCATTCACCATCCCCACAGCACC
ATAAGAGATAACAAGTCTGAATGGCTTCTATATCCCCAAGGGACACTGTGTCTTTGTGAACCAGTGG
CAGGTTAACCATGACCAGGAACCTATGGGGTGATCAAACGAGTTCGGCCTGAAAGGTTTCTTACC
TCCAGTGGCACTCTGGACAAACACCTGAGTGAGAAGGTCATTCTCTTTGGTTTGGGCAAGCGAAAG
TGCATTGGGGAGACCATTGGCCGACTGGAGGTCTTTCTCTTCCCTGGCCATCCTGCTGCAGCAAATG

GAATTTAATGTGTCACCAGGCGAGAAGGTGGATATGACTCCTGCCTATGGGCTGACTTTAAAACAT
GCCCCGTGTGAGCACTTCCAAGTGCAGATGCGGTCTTCTGGTCCCTCAGCATCTCCAGGCTTAGACT
GTCCCTGGATGCTCACCAGACTAGGTGGCTGTTCCCTAGGATTCAACTTCAGTCAGAAACACAGACCC
TGGGGCATTGTGCCTGCCTCCTACTTTGGACTTGTTTCTCTATATGCTGAACACAGACACTGGGCA
CAGCAGAGACCCACAGGAACCTCAGATCCTTCTCAAGTTCAGCATCAACTAGGAGACCTAAAAGGG
TTATGAGATACCTGGGCCTCAGAAAACCCCTGAAGAGCTCTCTGGTCCCTCCAGTGGCTGGCTGGTT
TGAAAAATACTTACAACAGGTCAATGCTAGGATCTGGCTGGTTACTTTGACAACCGGGAGTAGCCCA
GAATGGAGGGAGAAGAGAACTCAAATACTGGCACGGAGGTGCTCTTGCCATCTGCTGAGGCTCAA
CTGTCTTCCAACATGGGTTTATGACACTACATGTGGGGGTGTAGCACCTTCATTTACCCTACATAG
AAATAACAAGGTCTCCTTGTCTTGCAAAGCCATGTTCTGTTTAGGAAGGGCTGAGAGTTGTG
TGTAGAAAGACCTAAGAACATAGGGACAGACTTCTGGGCAGTAAGACCAGGTTTAGAGTAAAGGA
ATGCCTTTTGGAGACAGTATTGTGTAGTCCAAGTTGCCTCTGAACCTTGCTACCAAGGGTGGCCTTGA
ACTCCTTAATTCTTTTTTCTGCTTTTACCACCTACCAAGTGTAGGGTACAGTCATGAACCGCTA
CACCAGCTCTTGGTCTCTTGTCTTTACTGTATAAAACGTTTCTTCTTTCTTTTTTTTTTAAAGAA
AATGTTTGTGCATAAGAGTTTTTTATTGTGGCCTGTATTTTGCTTATGCATTTGTATTAGTCGTAC
TTCAATAGATTTAGATAATTCGCTTAGTGTAATAGAGAAAAATCTAACTCAAGTATCCAGAAATAT
ATAGGAAAACGTACCTGAGCTAAATAAAAATATTACCTGG

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A1 DE RATA CON pre-mir -328a DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

RESULTADOS DEL ALINEAMINETO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A1 DE RATA CON pre- mir -328a DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A1 DE RATA CON miR-328a MADURO DE RATA



RESULTADO DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A1 DE RATA CON miR-328a MADURO DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

Figura 41. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A1 de rata con la secuencias del pre-miR-328a y miR-128a maduro de rata.

miRNA-27b RATA

PRECURSOR

>rno-mir-27b MI0000859

ACCUCUCUAACAAGGUGCAGAGCUUAGCUGAUUGGUGAACAGUGAUUGGUUUCGCUUUGUUCACA
GUGGCUAAGUUCUGCACCUGAAGAGAAGGUG

MADURO

>rno-miR-27b-5p MIMAT0017101

19-AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAACAG-42

ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE Y REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A2 DE RATA CON miR-27b MADURO DE RATA

(La región 3'-UTR esta marcada en negritas y los apareamientos están subrayados).

TGGACTGACTCCTACAACCTCTGCCAGTCTCCAGCCCCTGCCCTTCAGGTATGTCTGTGTG
TCTTTCAGACCATGAAATCCGCTTCTATTTCTAAATACTATTAGAGATGGAGAAACAG
GGACCCACCTTAGCTTCTCTTTTAAACATCCCCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TG
TGTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCCATCAGAACACCAAAGCTTATGTGTGGCTCTCAGAGAC
AACATATTTTCAGGAGTCAGTTCCTTCTTTCTACCACATTGATTCAGGAAGACTTGCCAG
CAAGTGCTTTAACCCTGAGCCATCCATCTCACTAGCCCATTATCTTTAATTAAGCGGTT
TCACCCAGGCTTTTTCTAAGGACAGTTACCTGGAGTGAAGAGGTAGGGAGAGAATACCCA
CCTGACATTGGACAACCCGGGACCTGGCTGTAGCCTACTTTCGGCCTCTAAGCACAGTGCT
AAAATGAAGACTCACTTTTGCAGGAGGTACCTCTGTGGTAGTGATAGAGTTACTGAGAAG
GGTGGATATCACAGGCCATTGATAACCTCCCAGGGAAAGTGGCCTTCTGTTGCTGGCAA
GGGCATCTTCTGTTCTTTGGTATGTAGAGGGAAACCGACAATGTGTTGGACCTCTGTTA
GAAAGTGCAGCAAACACTCTGTTATTGGTGCTCTTGAGGGGCTGCCTTTAGTGTCATTAT
TTTGGAGTGGTCACTGGCATCCACACCAGTCTCAGAATTGGACATGAGAAAGGCAGACAG
AACAGCCTGGGATGGAAATCCAGACACTAAAGTTGTAATGCAAGGCTCCCTTCCAGCCC
TTGGCTCCTGTGACGGGGTTAGGGCAAATCCCCGAAAGAACAAGACACATGCCAGGTAGA
TTCACTTTTCTGATGTGGGGCTGAGGGTCAAACATAGAGTGTATGTCAGCGCTACCGAG
TGAGTGAGCGAAAAAATAAATGGAAGGCTCAGAATCCATCTTCAACCAGTCCATCTCCA
TTTCTCCTGCAGTCGTACAGATGGCGTTCTCCCAGTATATCTCCTTAGCCCCAGAGCTGC
TACTGGCCACTGCCATCTTCTGTTTAGTGTTCTGGGTGTTGAGAGGCACAAGGACCCAGG
TTCCCAAAGGTCTGAAGAGTCTCCCGGACCCCTGGGGCTTGCCCTTCAATTGGGCACATGC
TGACCCCTGGGGAAGAACCACACCTATCTCTGACAAAGCTGAGTCAGCAGTATGGGGACG
TGCTGCAGATCCGCATTGGCTCCACACCCGTGGTGGTGCTGAGCGCCTGAACACCATCA
AGCAGGCCCTAGTGAAGCAGGGGATGACTTCAAAGGCCGGCCAGACCTCTACAGCTTCA
CACTTATCACTAATGGCAAGAGCATGACTTTCAACCCAGACTCTGGACCGGTCTGGGCTG
CCCGCCGGCGCCTGGCCCAGGATGCCCTGAAGAGTTTCTCCATAGCCTCAGACCCACAT
CAGTATCCTCTTGCTACTTGGAGGAGCACGTGAGCAAAGAGGCTAACCATCTAATCAGCA
AGTTCAGAAGCTGATGGCAGAGGTTGGCCACTTCGAACCAGTCAACCAGGTGGTGGAAAT
CGGTGGCTAATGTCATCGGAGCCATGTGTTTTGGGAAGAACTTCCCAGGAAGAGCGAGG
AGATGCTCAACCTCGTGAAGAGCAGCAAGGACTTTGTGGAGAATGTCACCTCAGGGAATG
CTGTGGACTTCTTCCGGTCTGCGCTACCTGCCCAACCCAGCCCTCAAGAGGTTTAAGA

CCTTCAGGAAGGGGCAAGCTCTGTGGTAGGAAGGCTGTCTGTCTGTCCCTTCAGGAAGGG
GCAGGCTCTGTGATAGGAAGGCTGTCTGTCTGTCCCTTCAGGAAGTGCTTATAAGAGGAA
CGCCTCATTGCTAGATAGCCTATTGAAGTGACAAAATTTAGACCCTGTTTCACAACTTC
AGTGTACAGGGAACCTTAAGTATGCGGTGTGGGTGGTAAATGCTTGTAATCCACCCT
ATTGAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTACAAGTTCAAGGCCAGTGTGAACTTCTAGTTGAG
TTTTAGGCTAGCATAGATTCCATATCTGTTGAAAGAGAGAAAAGGAGAGGTAGAGGTAGAG
GTCGAGGTAGGGAAAGAGGGAGGAAGGGAAAGGAATGGGGAGGAAGAAAGGAAGGAAGGA
AGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGGGAAATTAGGAAGTTTC
CTCATATCCCAAGGTTCCAATCTGATAACAAGGATACCCCAAATGATTTATGGGAATCAT
CTAATGACTCCCTTGGGAAAGTCCACTCTAAATTGTAGGTACGAGATCCATCCAAACCAG
GACATACTGAATATGAGAATGCCATCTGTATTTGTATTGTCAACTTTTTAGTCAGAAAAAT
GAGCATGAGCTGAGTGAGCACTGAGCTCCGTGCTACTGGGCTATTGCAAACGGGAGGGAG
AGCAACATGTCTTCCCTCTTTCAATAGCTCGCTGGTAGTATATGTGGTGCAGAAGGCCCT
AGTTCCTAGACCCACATACGAGAAGGAGAGAGCTGATCCTTACAAGTTGTCTCTGTCC
TCCACATGCACATGAGTAAATAAATAAAAAATATGATTTAAAAATTAATAACAATCACAA
TCCACTCTTTTTTTATTCTTCTTATGTATTATATCCAGCTGCAGCCCTCCCTCTCCT
TCCCCAGTCCCTCCCCCTAACTCCCTTCTCCCTCAGATTCCCCCTCAAAGTCCACTC
TCTTTAAAGTTGATCATTTTAGAGAGAATTTTTTTTTTAAAAGTCATTAGTATGGTTGGAG
GTGCAGCTTTGTTGGTAGAGTTGCTCACCAACCTTGCCCAAGGCCCTAGGTTCTATTGGA
AGTACCAGGTGTGATAGCACAGGCTTGTAATCCAGCACGTGGGAGGTTCGAGGCAGAAGG
GTCAGAATGTCACCCAAGGTGACCCTGGGGTTATGAATGGCGTTCAAGGCCAACTTTAGG
TGCATGAGACCCAGTCTCAAAAACCAACACAAAAAGAACAATAACAGAAGGAAATAAACAG
CAACGTTGGTGCCCTCCGCATGCAGCCACCCTTTCCAGAGGCCACACAGCTCAGGTCCCA
TCTGTTCCCTCCACAGGAAGCAGTGGAAGACCCCTTTGTGTTCCGCCCAGAGCGGTTTC
TTACCAATGACAACACGGCCATCGACAAGACCCTGAGTGAGAAGGTGATGCTCTTCGGCT
TGGGAAAGCGCCGGTGCATTGGGGAGATCCCGGCCAAGTGGGAAGTCTTCCCTCTTCTTAG
CCATCCTCCTGCATCAGCTGGAGTTCAGTGTGCCACCGGGCGTGAAGGTGGACCTGACAC
CCAGCTATGGGCTGACCATGAAGCCCAGAACCCTGTGAACACGTCCAGGCCTGGCCACGCT
TCTCCAAGTGAAGATGGCCGAGACATCGGCCGCCACCCTTGTTCCTTTTCTTTCTTTTT
AAATAACAGCTTTTTCAAGATACAATTCCTCCACCATTTAATTCAGCTCCAATCAATTTT
CAATATTGTCTACACTGTTCCCTGCAAACCCATACCCATTAAGATTTATGACTATTCTC
CTACCCTGTTTCGCTTGCTGTGCCACGTGCTAATCTAGTTTTTTGACTCAATAGATTTGCC
AACTCTGGCTGTTTCATATAAATCCAGTGAGTTATGGTC

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A2 DE RATA CON pre-mir -27b DE RATA

Alignments

Download Graphics Next Previous Descriptions

Sequence ID: lc|37577 Length: 6939 Number of Matches: 1

Range 1: 3657 to 3668 Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.9 bits(24)	0.073	12/12(100%)	0/12(0%)	Plus/Plus

Query 11 CAAGGTGCAGAG 22
 | | | | | | | | | | | |
Sbjct 3657 CAAGGTGCAGAG 3668

Related Information

RESULTADOS DEL ALINEAMINETO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A1 DE RATA CON pre- mir -27b DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

RESULTADOS DEL ALINAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A2 DE RATA CON miR-27b MADURO DE RATA

Alignments

Download [Graphics](#) Sort by: E value ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Sequence ID: lcl|1641 Length: 6939 Number of Matches: 17

Related Information

Range 1: 2248 to 2255 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
16.4 bits(8)	1.3	8/8(100%)	0/8(0%)	Plus/Minus

Query 16 GGTGAACA 23
 Sbjct 2255 GGTGAACA 2248

Range 2: 129 to 135 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Plus

Query 5 CTTAGCT 11
 Sbjct 129 CTTAGCT 135

Range 3: 744 to 750 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Plus

Query 13 AITGGIG 19
 Sbjct 744 AITGGIG 750

Range 4: 1613 to 1619 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus

Query 9 GCTGAI 15
 Sbjct 1619 GCTGAI 1613

Range 5: 1630 to 1636 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Plus

Query 8 AGCTGAI 14
 Sbjct 1630 AGCTGAI 1636

Range 6: 2215 to 2221 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus

Query 2 GAGCITA 8
 Sbjct 2221 GAGCITA 2215

Range 7: 2518 to 2524 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus

Query 18 TGAACAG 24
 Sbjct 2524 TGAACAG 2518

Range 8: 3032 to 3038 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus

```
Query 2 GAGCTTA 8
      |||
Sbjct 3038 GAGCTTA 3032
```

Range 9: 3963 to 3969 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Plus

```
Query 11 IGAITGG 17
      |||
Sbjct 3963 IGAITGG 3969
```

Range 10: 4064 to 4070 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus

```
Query 15 TGGTGAA 21
      |||
Sbjct 4070 TGGTGAA 4064
```

Range 11: 4498 to 4504 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Plus

```
Query 10 CTGATIG 16
      |||
Sbjct 4498 CTGATIG 4504
```

Range 12: 4996 to 5002 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus

```
Query 1 AGAGCTT 7
      |||
Sbjct 5002 AGAGCTT 4996
```

Range 13: 5792 to 5798 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Plus

```
Query 8 AGCTGAT 14
      |||
Sbjct 5792 AGCTGAT 5798
```

Range 14: 6085 to 6091 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus

```
Query 14 ITGGTGA 20
      |||
Sbjct 6091 ITGGTGA 6085
```

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus
Query 8	AGCTGAT	14		
Sbjct 6559	AGCTGAT	6553		

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Plus
Query 17	GIGAACA	23		
Sbjct 6634	GIGAACA	6640		

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	5.2	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus
Query 11	TGATTGG	17		
Sbjct 6775	TGATTGG	6769		

RESULTADO DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A2 DE RATA CON miR-27b MADURO DE RATA

Alignments

Download Graphics Next Previous Descriptions

Sequence ID: lcl|18799 Length: 268 Number of Matches: 1

Range 1: 98 to 104 Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	0.22	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus
Query 11	TGATTGG	17		
Sbjct 104	TGATTGG	98		

Related Information

Figura 42. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A2 de rata con la secuencias del pre-miR-27b y miR-27b maduro de rata.

miRNA-122 RATA

PRECURSOR

>rno-mir-122 MI0000891

CCUUAGCAGAGCUCUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCCAAAACAUCAAAACGCCAUCaucacac
UAAACAGCUACUGCUAGGC

MADURO

>rno-miR-122-3p MIMAT0017116

51-AACGCCAUCaucacacuaa-69

ALINAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE Y REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A2 RATA CON miR-122 MADURO DE RATA

(La región 3'-UTR esta marcada en negritas y los apareamientos están subrayados).

TGGACTGACTCCTACAACCTCTGCCAGTCTCCAGCCCCTGCCCTTCAGGTATGTCTGTGTG
TCTTTCAGACCATGAAATCCGCTTCTATTTCTAAATACTATTAGAGATGGAGAAACAG
GGACCCACCTTAGCTTCTCTTTTAAACATCCCCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TG
TGTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCCATCAGAACACCAAAGCTTATGTGTGGCTCTCAGAGAC
AACATATTTTCAGGAGTCAGTTCCTTCTTTCTACCACATTGATTCCAGGAAGACTTGCCAG
CAAGTGCTTTAACCCTGAGCCATCCATCTCACTAGCCATTATCTTTAATTAAGCGGTT
TCACCCAGGCTTTTCTAAGGACAGTTACCTGGAGTGAAGAGGTAGGGAGAGAATACCCA
CCTGACATTGGACAACCCGGGACCTGGCTGTAGCCTACTTCGGCCTCTAAGCACAGTGCT
AAAATGAAGACTCACTTTTGCAGGAGGTACCTCTGTGGTAGTGATAGAGTTACTGAGAAG
GGTGGATATCACAGGCCATTGATAACCTCCCAGGGAAAGTGGCCTTCTGTTGCTGGCAA
GGGGCATCTTCTGTTCTTTGGTATGTAGAGGGAACCGACAATGTGTTGGACCTCTGTTA
GAAAGTGCAGCAAACACTCTGTTATTGGTGCTCTTGAGGGGCTGCCTTTAGTGTCATTAT
TTTGGAGTGGTCACTGGCATCCACACCAGTCTCAGAATTGGACATGAGAAAGGCAGACAG
AACAGCCTGGGATGGAAATCCAGACACTAAAGTTGTAATGCAAGGCTCCCTTCCAGCCC
TTGGCTCCTGTGACGGGGTTAGGGCAAATCCCCGAAAGAACAAGACACATGCCAGGTAGA
TTCACTTTTCTGATGTGGGGCTGAGGGTCAAACATAGAGTGTATGTCAGCGCTACCGAG
TGAGTGAGCGAAAAAATAAATGGAAGGCTCAGAATCCATCTTCAACCAGTCCATCTCCA
TTTCTCCTGCAGTCGTACAGATGGCGTTCTCCCAGTATATCTCCTTAGCCCCAGAGCTGC
TACTGGCCACTGCCATCTTCTGTTTAGTGTCTGGGTGTTGAGAGGCACAAGGACCCAGG
TTCCCAAAGGTCTGAAGAGTCCCTCCCGACCCCTGGGGCTTGCCCTTCAATGGGCACATGC
TGACCCTGGGGAAGAACCACACCTATCTCTGACAAAGCTGAGTCAGCAGTATGGGGACG
TGCTGCAGATCCGCATTGGCTCCACACCCGTGGTGGTGTGCTGAGCGGCCTGAACACCATCA
AGCAGGCCCTAGTGAAGCAGGGGGATGACTTCAAAGGCCGGCCAGACCTCTACAGCTTCA
CACTTATCACTAATGGCAAGAGCATGACTTTCAACCCAGACTCTGGACCGGTCTGGGCTG
CCCGCCGGCGCCTGGCCCAGGATGCCCTGAAGAGTTTCTCCATAGCCTCAGACCCACAT
CAGTATCCTCTTGCTACTTGGAGGAGCACGTGAGCAAAGAGGCTAACCATCTAATCAGCA
AGTTCAGAAGCTGATGGCAGAGGTTGGCCACTTCGAACCAGTCAACCAGGTGGTGGAAAT
CGGTGGCTAATGTCATCGGAGCCATGTGTTTTGGGAAGAACTTCCCAGGAAGAGCGAGG
AGATGCTCAACCTCGTGAAGAGCAGCAAGGACTTTGTGGAGAAATGTCACCTCAGGGAATG
CTGTGGACTTCTTTCCGGTCTGCGTACCTGCCCAACCCAGCCCTCAAGAGGTTTAAAGA
ACTTCAATGATAACTTTGTGCTGTTTCTGCAGAAAACAGTCCAGGAACACTATCAAGACT

GCAGGCTCTGTGATAGGAAGGCTGTCTGTCTGTCCCTTCAGGAAGTGCTTATAAGAGGAA
CGCCTCATTGCTAGATAGCCTATTGAAGTGACAAAATTTAGACCCTGTTTCACAACTTC
AGTGTACAGGGAACCTTAAGTATGCGGTGTGGGTGGTAAATGCTTGTAATCCACCCT
ATTGAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTACAAGTTCAAGGCCAGTGTGAACCTTAGTTGAG
TTTTAGGCTAGCATAGATTCCATATCTGTTGAAAGAGAGAAAAGGAGAGGTAGAGGTAGAG
GTCGAGGTAGGGAAAGAGGGAGGAAGGGAAAGGAATGGGGAGGAAGAAAGGAAGGAAGGA
AGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGGGAAATTAGGAAGTTTC
CTCATATCCCAAGTTCCAATCTGATAACAAGGATACCCCAAATGATTTATGGGAATCAT
CTAATGACTCCCTTGGGAAAGTCCACTCTAAATTGTAGGTACGAGATCCATCCAAACCAG
GACATACTGAATATGAGAATGCCATCTGTATTTGTATTGTCAACTTTTTAGTCAGAAAAAT
GAGCATGAGCTGAGTGAGCACTGAGCTCCGTGCTACTGGGCTATTGCAAACGGGAGGGAG
AGCAACATGTCTTCCCTCTTTCAATAGCTCGCTGGTAGTATATGTGGTGAGAAGGCCCT
AGTTCCTAGACCCACATACGAGAAGGAGAGAGCTGATCCTTACAAGTTGTCTCTGTCC
TCCACATGCACATGAGTAAATAAATAAAAATATGATTTAAAAATTAATAACAATCACAA
TCCACTCTTTTTTTATTCTTCTTATGTATTATATCCCAGCTGCAGCCCTCCCTCTCCT
TCCCCAGTCCCTCCCCCTAACTCCCTTCTCCCTCAGATTCCCTCCTCAAAGTCCACTC
TCTTTAAAGTTGATCATTTTAGAGAGAATTTTTTTTTTAAAAGTCATTAGTATGGTTGGAG
GTGCAGCTTTGTTGGTAGAGTTGCTCACCAACCTTGCCCAAGGCCCTAGGTTCTATTGGA
AGTACCAGGTGTGATAGCACAGGCTTGTAATCCCAGCACGTGGGAGGTGAGGCAGAAGG
GTCAGAATGTCACCCAAGGTGACCCTGGGGTTATGAATGGCGTTCAAGGCCAACTTTAGG
TGCATGAGACCCAGTCTCAAAACCAACACAAAAAGAACAATAACAGAAGGAAAATAACAG
CAACGTTGGTGCCCTCCGCATGCAGCCACCCTTTCCAGAGGCCACACAGCTCAGGTCCCA
TCTGTTCCCTCCACAGGAAGCAGTGGAAGACCCCTTTGTGTTCCGCCCAGAGCGGTTTC
TTACCAATGACAACACGGCCATCGACAAGACCTGAGTGAGAAGGTGATGCTCTTCGGCT
TGGGAAAGCGCCGGTGCATTGGGGAGATCCCGGCCAAGTGGGAAGTCTTCCTCTTCTTAG
CCATCCTCCTGCATCAGCTGGAGTTCACTGTGCCACCGGGCGTGAAGGTGGACCTGACAC
CCAGCTATGGGCTGACCATGAAGCCCAGAACCCTGTGAACACGTCCAGGCCTGGCCACGCT
TCTCCAAGTGAAGATGGCCGAGACATCGGCCGCCACCCTTGTTCTTTTTCTTTCTTTTT
AAATAACAGCTTTTTCAAGATACAATTCCTCCACCATTTAATTCAGCTCCAATCAATTTT
CAATATTGTCTACACTGTTCCCTGCAAACCCATACCCATTAAGATTTATGACTATTCCTC
CTACCCTGTTTCGCTTGCTGTGCCACGTGCTAATCTAGTTTTTTGACTCAATAGATTTGCC
AACTCTGGCTGTTTCATATAAATCCAGTGAGTTATGGTC

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A2 DE RATA CON pre-mir -122 DE RATA

Alignments

Download Graphics Sort by: E value

Sequence ID: lcl|33843 Length: 6671 Number of Matches: 1

Range 1: 1160 to 1170 Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
21.1 bits(22)	0.21	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Minus

Query 63 ACACCTAAACAG 73
 |||
 Sbjct 1170 ACACCTAAACAG 1160

Related Information

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A2 DE RATA CON pre- mir -122 DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A2 DE RATA CON miR-122 MADURO DE RATA

Alignments

Download Graphics Sort by: E value

Sequence ID: lcl|6331 Length: 6671 Number of Matches: 10

Range 1: 1100 to 1108 Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
18.3 bits(9)	0.22	9/9(100%)	0/9(0%)	Plus/Minus

Query 1 AACGCCATC 9
 |||
 Sbjct 1108 AACGCCATC 1100

Range 2: 6217 to 6224 Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
16.4 bits(8)	0.88	8/8(100%)	0/8(0%)	Plus/Minus

Query 1 AACGCCAT 8
 |||
 Sbjct 6224 AACGCCAT 6217

Range 3: 768 to 774 Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	3.5	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus

Query 13 ACACCTAA 19
 |||
 Sbjct 774 ACACCTAA 768

Related Information



RESULTADO DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A2 DE RATA CON miR-122 MADURO DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

Figura 43. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A2 de rata con la secuencias del pre-miR-122 y miR-122 maduro de rata.

ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE Y REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A2
RATA CON miR-328a MADURO DE RATA
(La región 3'-UTR esta marcada en negritas y los apareamientos están subrayados).

TGGACTGACTCCTACAACCTCTGCCAGTCTCCAGCCCTGCCCTTCAGGTATGTCTGTGTG
TCTTCCAGACCATGAAATCCGCTTCTATTTCTAAATACTATTAGAGATGGAGAAACAG
GGACCCACCTTAGCTTCTCTTTTAAACATCCCCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATATGTTTGTGTGTGTATCTCTGTTTCTGTGTGTG
TGTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCCATCAGAACACCAAAGCTTATGTGTGGCTCTCAGAGAC
AACATATTTCAGGAGTCAGTTCCTTCTTTCTACCACATTGATTCCAGGAAGACTTGCCAG
CAAGTGCTTTAACCCTGAGCCATCCATCTCACTAGCCATTATCTTTAATTAAGCGGTT
TCACCCAGGCTTTTTCTAAGGACAGTTACCTGGAGTGAAGAGGTAGGGAGAGAATACCCA
CCTGACATTGGACAACCCGGGACCTGGCTGTAGCCTACTTCGGCCTCTAAGCACAGTGCT
AAAATGAAGACTCACTTTTGCAGGAGGTACCTCTGTGGTAGTGATAGAGTTACTGAGAAG
GGTGGATATCACAGGCCATTGATAACCTCCCAGGGAAAGTGGCCTTCTGTTGCTGGCAA
GGGCATCTTCTGTTCTTTGGTATGTAGAGGGAACCGACAATGTGTTGGACCTCTGTTA
GAAAGTGCAGCAAACACTCTGTTATTGGTGTCTTTGAGGGGCTGCCTTTAGTGTCATTAT
TTTGGAGTGGTCACTGGCATCCACACCAGTCTCAGAATTGGACATGAGAAAGGCAGACAG
AACAGCCTGGGATGGAAATCCAGACACTAAAGTTGTAATGCAAGGCTCCCTTCCAGCCC
TTGGCTCCTGTGACGGGGTTAGGGCAAATCCCCGAAAGAACAAGACACATGCCAGGTAGA
TTCATTTTTCTGATGTGGGGCTGAGGGTCAAACATAGAGTGTATGTCAGCGCTACCGAG
TGAGTGAGCGAAAAAATAAATGGAAGGCTCAGAATCCATCTTCAACCAGTCCATCTCCA
TTTTCTCCTGCAGTCGTACAGATGGCGTTCTCCCAGTATATCTCCTTAGCCCCAGAGCTGC
TACTGGCCACTGCCATCTTCTGTTTAGTGTTCTGGGTGTTGAGAGGCACAAGGACCCAGG
TTCCCAAAGGTCTGAAGAGTCTCCCGGACCTGGGGCTTGCCCTTCAATTGGGCACATGC
TGACCTGGGGAAGAACCACACCTATCTCTGACAAAGCTGAGTCAGCAGTATGGGGACG
TGCTGCAGATCCGCATTGGCTCCACACCCGTGGTGGTGCTGAGCGCCTGAACACCATCA
AGCAGGCCCTAGTGAAGCAGGGGATGACTTCAAAGGCCGGCCAGACCTCTACAGCTTCA
CACTTATCACTAATGGCAAGAGCATGACTTTCAACCCAGACTCTGGACCGGTCTGGGCTG
CCCGCCGGCGCCTGGCCCAGGATGCCCTGAAGAGTTTCTCCATAGCCTCAGACCCACAT
CAGTATCCTCTTGCTACTTTGGAGGAGCACGTGAGCAAAGAGGCTAACCATCTAATCAGCA
AGTTCAGAAGCTGATGGCAGAGGTTGGCCACTTTCGAACCAGTCAACCAGGTGGTGAAT
CGGTGGCTAATGTCATCGGAGCCATGTGTTTTGGGAAGAACTTCCCAGGAAGAGCGAGG
AGATGCTCAACCTCGTGAAGAGCAGCAAGGACTTTGTGGAGAATGTCACCTCAGGGAATG
CTGTGGACTTCTTCCGGTCTGCGTACCTGCCAACCAGCCCTCAAGAGGTTTAAGA
ACTTCAATGATAACTTTGTGCTGTTTCTGCAGAAAACAGTCCAGGAACACTATCAAGACT
TCAACAAGGTGAGACTGAGAGGCAGACTGTGATTGCACTGCCACCAGAGAACTCCCAGGT
ACTCCCGGGTGCTGCCATGTGCTGCCAAGACCTTGAAGGCTCTGGGCTACTTAGCAACT
GTAGGACCTGAAGCCTTCTTACAGCTCGCCTCTGGGGACTGTTCCAAGCCCCAGAAAG
CAAAGGCATGTCAACGGAGCCTTGGCAGAACTTTGCAATATGGGGTGGGGGTGGTGTAC
TAATTTAAAGGCTATTTATTGTTCTTTCAGGAAATGAACCTCAACAAAACCTAAGTAAGCT
CCAGCTTCATGTCAGTTTTCTTCCCTGTGTTACCCTATCTCTTCTCCTCTGAAACCTG
AGCCCTGGGGTTATGGGAAAGAAGGGTCCGGGACACATGAAATGACTATGCTCTGTTTAG
CTCTGATGCTAGTTCAAAAATCTGAGCTCCAGCCAGGGCCTGGAGGCCAAGGCAGTTCT
CAGGCCCCCAAGGGTATATCAAATGGGATGGGCGAGGTTGGGCATTGGGCACCGAAGTGC
CTAAATTTCTTTAACTTGTGTGCTCCTAGAACAGTATCCAGGACATCACAGGCGCCCTG
TTCAAGCACAGTGAGAACTACAAAGACAACGGTGGTCTCATCCCTCAGGAGAAGATTGTC
AACATTGTCAATGACATCTTTGGAGCTGGTAGGAGCCACATTCTACCTCTCCATTTACC
AACTGCTATTACCCACACCCAACCTATCAGCCATTTCATCAACAATGTGAGGGGACACT

TCCACATGCACATGAGTAAATAAATAAAAATATGATTTAAAAATTTAAATACAATCACAA
TCCACTCTTTTTTTTATTCTTCTTATGTATTATATCCCAGCTGCAGCCCTCCCTCTCCT
TCCCCAGTCTTCCCCCTAACTCCCTTCTCCCTCAGATTCCCCTCCTCAAAGTCCACTC
TCTTTAAAGTTGATCATTTTATAGAGAGAATTTTTTTTTTAAAAGTCATTAGTATGGTTGGAG
GTGCAGCTTTGTTGGTAGAGTTGCTCACCAACCTTGCCCAAGGCCCTAGGTTCTATTGGA
AGTACCAGGTGTGATAGCACAGGCTTGTAATCCAGCACGTGGGAGGTCGAGGCAGAAGG
GTCAGAATGTCACCCAAGGTGACCCTGGGGTTATGAATGGCGTTCAAGGCCAACTTTAGG
TGCATGAGACCCAGTCTCAAAAACCAACACAAAAAGAACAATAACAGAAGGAAAATAACAG
CAACGTTGGTGCCCTCCGCATGCAGCCACCCTTTCCAGAGGCCACACAGCTCAGTCCCA
TCTGTTCCCTCCACAGGAAGCAGTGAAAGACCCCTTTGTGTTCCGCCCAGAGCGGTTTC
TTACCAATGACAACACGGCCATCGACAAGACCTGAGTGAGAAGGTGATGCTCTTCGGCT
TGGGAAAGCGCCGGTGCATTGGGGAGATCCCGGCCAAGTGGGAAGTCTTCTCTTCTTAG
CCATCCTCCTGCATCAGCTGGAGTTCAGTGTGCCACCGGGCGTGAAGGTGGACCTGACAC
CCAGCTATGGGCTGACCATGAAGCCCAGAACCCTGTGAACACGTCCAGGCCTGGCCACGCT
TCTCCAAGTGAAGATGGCCGAGACATCGGCCGCCACCCTTGTTTCCTTTTCTTTT
AAATAACAGCTTTTCAAGATACAATTCCTCCACCATTTAATTCAGCTCCAATCAATTTT
CAATATTGTCTACACTGTTCCCTGCAAACCCATACCCATTAAGATTTATGACTATTCCTC
CTACCCTGTTTCGCTTGCTGTGCCACGTGCTAATCTAGTTTTTGACTCAATAGATTTGCC
AACTCTGGCTGTTTCATATAAATCCAGTGAGTTATGGTC

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A2 DE RATA CON pre-mir -328a DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A1 DE RATA CON pre- mir -328a DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

RESULTADOS DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE CYP1A2 DE RATA CON miR-328a MADURO DE RATA

Alignments

Download Graphics Sort by: E value Next Previous Descriptions

Sequence ID: Icl|17429 Length: 6671 Number of Matches: 17

Range 1: 3893 to 3901 Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
18.3 bits(9)	0.22	9/9(100%)	0/9(0%)	Plus/Plus

Query 6 GCAGGAGGG 14
Sbjct 3893 GCAGGAGGG 3901

Range 2: 560 to 567 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
16.4 bits(8)	0.88	8/8(100%)	0/8(0%)	Plus/Plus

Query 6 GCAGGAGG 13
Sbjct 560 GCAGGAGG 567

Range 3: 756 to 763 Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
16.4 bits(8)	0.88	8/8(100%)	0/8(0%)	Plus/Plus

Query 10 GAGGGGCT 17
Sbjct 756 GAGGGGCT 763

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	3.5	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus
Query 11	AGGGGCT 17			
Sbjct 4205	AGGGGCT 4199			

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	3.5	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Minus
Query 3	GGGGCAG 9			
Sbjct 4618	GGGGCAG 4612			

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
14.4 bits(7)	3.5	7/7(100%)	0/7(0%)	Plus/Plus
Query 4	GGGCAGG 10			
Sbjct 4945	GGGCAGG 4951			

RESULTADO DEL ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 3'-UTR DE CYP1A2 DE RATA CON miR-328a MADURO DE RATA: NO HAY ALINEAMIENTOS

Figura 44. Alineamiento de la región codificante y región 3'-UTR de CYP1A2 de rata con la secuencias del pre-miR-328a y miR-328a maduro de rata.

11.8 Expresión de mirnas en hígados de ratas tratadas con biotina

Para evaluar las predicciones de los alineamientos se midió la expresión de los miRNAs -27b, -328a y -122 en hígados de ratas tratadas con biotina por PCR en Tiempo Real.

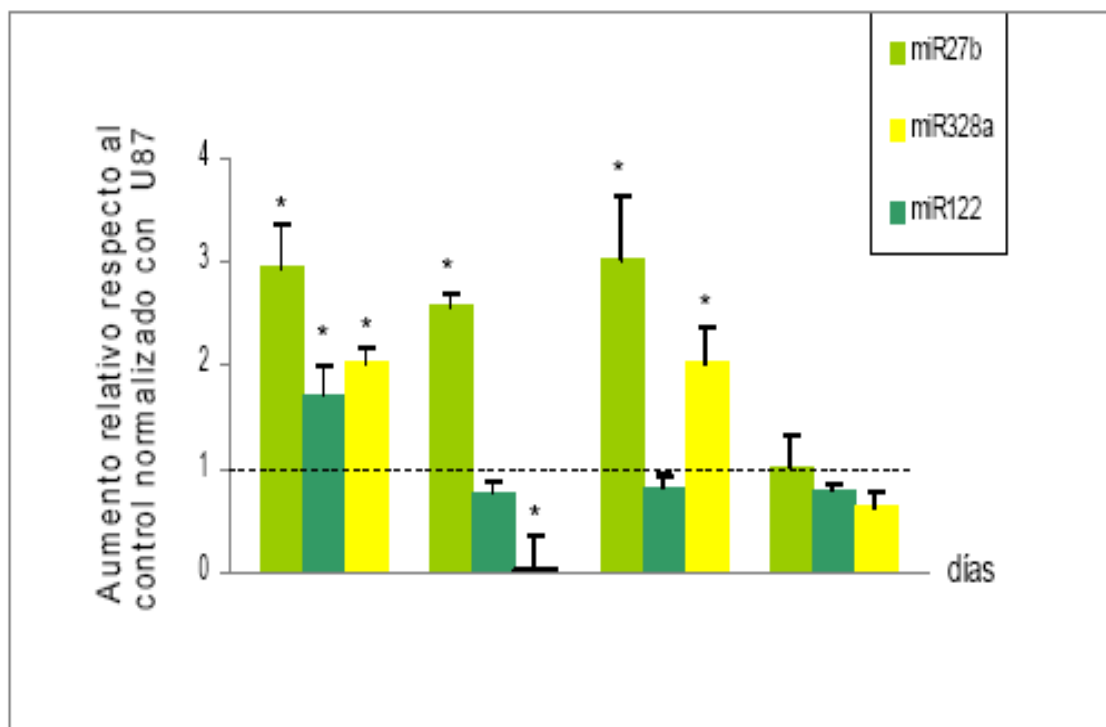


Figura 45. Expresión de los miR-27b, miR-122, miR-328a en hígado de ratas tratadas con biotina (2mg/kg, i.p.) después de 1, 3, 5 y 7 días de tratamiento. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a su grupo control (línea punteada). Cada barra corresponde al promedio de 2 experimentos independientes \pm ES de 4 ratas por grupo normalizado con U87. *Denota diferencias significativas con respecto al control $p \leq 0.05$.

12. DISCUSIÓN

Pocos estudios han evaluado la toxicidad de biotina (SRI- 1979; Hayes et al. 1984; Ma et al. 1984; Fiume 2001) y no existen estudios relacionados con aspectos toxicológicos desde el punto de vista de su efecto sobre la regulación de CYP450 in vivo y sus posibles consecuencias; además, existen en el mercado a la venta libre suplementos que la contienen en concentraciones por encima de los niveles requeridos (Innis y Allardyce 1983; Yates et al. 1998). En este trabajo, se analizaron los efectos de la vitamina biotina (2 mg / kg vía intraperitoneal) en la expresión y la actividad de algunos miembros de la familia de CYP450 que están involucrados en el metabolismo de xenobióticos, fármacos de uso habitual y compuestos endógenos. La dosis de 2 mg/kg de peso corporal se escogió ya que esta dosis induce la expresión de genes que están relacionados con el metabolismo de la glucosa (Dakshinamurti y Cheah-Tan 1968; Dakshinamurti et al. 1970; Larrieta et al. 2010). Esta concentración esta dentro del intervalo usado en medicamentos y suplementos disponibles comercialmente. En nuestros experimentos, se administró 2mg/Kg en ratas de aproximadamente 250 g de peso, por lo que la administración fue de 0,5 mg / rata. Medicamentos y suplementos comercialmente disponibles contienen un rango entre 2-20 mg, por lo que en humanos que pesen 50 kg esto representa 0,04-0,4 mg / kg. Subiendo a 100 kg la cantidad de biotina es de 0.02-0.2 mg / kg. También equivale a una dosis supra-fisiológica ya que revasa los requerimientos nutricionales (Innis y Allardyce 1983; Yates et al. 1998).

Nuestros resultados revelaron que la administración de biotina modifica la expresión de CYP1A y CYP1B a nivel de mRNA confirmando que la biotina tiene un rol en la expresión del RNAm y que ha sido descrito para diversos genes (Chauhan y Dakshinamurti 1991; Dakshinamurti y Li 1994; Borboni et al. 1996; Romero-Navarro et al. 1999; Rodriguez-Melendez et al. 2001; Manthey et al. 2002; Solorzano-Vargas et al. 2002; Rodriguez-Melendez et al. 2003; Scheerger y Zemleni 2003; Wiedmann et al. 2004). Este último resultado correlaciona con el mismo efecto ya observado en este gen por J. Zemleni et al., en células linfoides Jurkat evaluado hasta los 21 días de administración de biotina (Rodriguez-Melendez et al. 2004). No se observaron cambios en los mensajeros de CYP2E Y CYP3A.

Los análisis densitométricos de las bandas obtenidas por la inmunodetección no revelaron cambios en ninguna de las isoformas evaluadas al igual que lo observado en las actividades enzimáticas.

La modificación de la expresión y actividad de CYP450 es de gran relevancia biológica dada la función que desempeñan en el organismo y las posibles consecuencias que esto tendría. Por ejemplo el CYP1A1 metaboliza hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), que son compuestos ubicuos que se encuentran en el petróleo y las emisiones que se producen durante la combustión de combustibles fósiles, en la carne carbonizada y el pescado que se han cocinado directamente sobre un fuego, en el humo del tabaco y en varios otros productos que son el resultado de la combustión incompleta de la materia orgánica (Shou et al. 1996). Sin embargo, los metabolitos que se forman por su interacción con CYP1A1 generan aductos con el DNA aumentando la susceptibilidad de desarrollar procesos mutagénicos y aberraciones cromosómicas que pueden contribuir al proceso carcinogénico (Cancino-Badias et al. 2003), el CYP1A2 implicado en el metabolismo de numerosos medicamentos, incluyendo clozapina, teofilina, tacrina y verapamil, entre otros (Zhou et al.). Por lo tanto, las alteraciones de la actividad basal de CYP1A2 pueden tener repercusiones clínicamente importantes como interacciones entre medicamentos y alimentos (Jeffy et al. 2002; Hu, Yang et al. 2005), el CYP3A4 es la enzima más importante de la metabolización de fármacos (Watanabe et al.; Klein y Zanger 2013) y su modulación puede tener diversas repercusiones. La inhibición del metabolismo de fármacos como la competencia de dos fármacos metabolizados por el mismo CYP puede resultar en concentraciones elevadas en el plasma del fármaco resultando en niveles tóxicos que conlleven a su retiro del mercado (Kudo et al. 1997; Ferslew et al. 1998). Por otra parte la inducción de este CYP podría resultar en un aumento del metabolismo del fármaco, atenuando su efecto farmacológico por aumento de su eliminación y disminución de sus concentraciones plasmáticas y por lo tanto sea necesario un reajuste de la dosis.

El hallazgo de que la administración de biotina no afectó las actividades de las enzimas evaluadas sugiere que existe una baja probabilidad de interacciones farmacológicas derivadas de la co-administración de biotina con fármacos que se metabolizan por

estos CYPs y apoya la idea de que la exposición de biotina a dosis farmacológicas es inofensiva.

Adicionalmente se investigó más a fondo la posible función de la biotina en la modificación de miembros de la subfamilia CYP1A, para lo cual exploramos su efecto con un inductor y sustrato típico de estas enzimas, el BaP. No se detectaron diferencias en las actividades de CYP1A1 o CYP1A2 en microsomas hepáticos obtenidos de ratas que habían sido tratados con la combinación de biotina + B(a)P o solo con B(a)P (figura 35). Además, la biotina no interfirió con las actividades de CYP1A1 o CYP1A2 o cuando se adicionaron cantidades crecientes de biotina a las mezclas de reacción que contenían EROD como un sustrato de CYP1A1 o MROD como un sustrato de CYP1A2 (figura 36), lo que indica que la biotina no actúa como un inductor o inhibidor para los miembros de la subfamilia CYP1A.

La evidencia adicional que apoya la idea de que la biotina no modifica la actividad de éstas enzimas se obtuvo mediante el ensayo de Ames (Maron y Ames 1983). Este ensayo ha sido utilizado para estimar la importancia biológica de la modulación de citocromos, donde la producción de metabolitos mutagénicos depende de la actividad de CYPs en la fracción S9 (Cancino-Badía et al. 2003). La mezcla S9 que se preparó a partir de hígados de ratas que habían sido tratados con biotina activa al BaP en niveles similares a la de la mezcla S9 que se había preparado a partir de los hígados de las ratas de control (Tabla 2). Este resultado indicó que la exposición a la biotina no alteró la capacidad de CYP1A1 para metabolizar otros sustratos. Por lo tanto, la biotina no puede influir en el metabolismo mediado por CYP1A, apoyando aún más su uso como un fármaco terapéutico.

En contraste con el incremento observado a nivel transcripcional de CYP1A y CYP1B, los niveles de proteína y actividad enzimática no se vieron afectados. Estas discrepancias pueden explicarse por el hecho de que varios estudios han encontrado que la abundancia de proteínas no fue acompañado por la abundancia de sus mRNA (Aguilera-Mendez y Fernandez-Mejia; Rodriguez-Melendez et al. 2005). Además, no podemos descartar que otros mecanismos post-transcripcionales se lleven a cabo. Existe evidencia de que además de afectar la transcripción de genes, la biotina influye

tanto la síntesis como la degradación de proteínas. Este efecto se observó para la piruvato carboxilasa, una enzima dependiente de biotina (Rodríguez-Fuentes et al. 2007), así como en otras proteínas, tales como el receptor de asialoglicoproteína (Collins et al. 1988; De La Vega y Stockert 1999). El procesamiento de mRNA y/o su estabilidad también podrían estar relacionados.

Uno de los posibles mecanismos que expliquen la regulación post-transcripcional observada podría ser mediada por acción de microRNAs; los microRNAs (miRNAs), son pequeños RNAs no codificantes que regulan la expresión a través de la represión transcripcional y post-transcripcional de diversos genes (Chen y Rajewsky 2007). En este proceso no todos los mensajeros se traducen inmediatamente, ya que algunos se mantiene en un estado de represión traduccional y se pueden transportar a un sitio específico en el citoplasma denominados “cuerpos P”, para su almacenamiento o su degradación (Chan y Slack 2006) o reactivación de la traducción (Eulalio et al. 2007), ya que recientemente se ha asociado la participación de éstos en la regulación de algunas enzimas P450 (Tsuchiya et al. 2006; Pan et al. 2009; Mohri et al. 2010).

Para evaluar la posible participación de miRNAs en la regulación de las enzimas de interés se realizaron alineamientos de las secuencias de microRNAs reportadas y las secuencias de citocromos de interés ambos en rata, usando herramientas informáticas tales como BLAST, ENSEMBL y miRBase.

Los resultados muestran que existen diversos sitios de complementariedad. Cabe mencionar que no todos se alinearon en la región 3'-UTR sino en la región codificante de los citocromos y los segmentos de apareamiento son cortos (fig. 39-44); sin embargo, no podemos excluir el efecto final y considerar que probablemente ocurra el bloqueo de la transcripción.

Adicionalmente se midieron las concentraciones de miRNAs en hígados de ratas tratadas con biotina y se observaron aumentos significativos a las 24hrs de los tres miRNAs evaluados (miR-27b, miR-122 y miR-328a). El patrón de expresión del miR-122 se correlaciona con el patrón de expresión observado de CYP1A.

Como se mencionaba anteriormente se ha descrito que los miRNAs pueden provocar el almacenamiento del mRNA lo que explicaría el aumento observado a las 24 hrs. Sin embargo, se sabe que estos mensajeros posteriormente son degradados, lo que puede explicar la disminución observada a los 3 y 5 días posteriores a la administración de la vitamina.

Se propone que los cambios observados a nivel transcripcional sobre la subfamilia CYP1A pueden ser ocasionados directamente por biotina o muy probablemente sean un efecto por los productos de las reacciones que desencadena biotina pleiotrópicamente en la célula y que a su vez estos cambios producen un aumento o activación de pequeños RNAs regulatorios como pueden ser miRNAs que silencian la posterior traducción de los citocromos (figura 46).

Estas ideas se deben probar en estudios futuros.

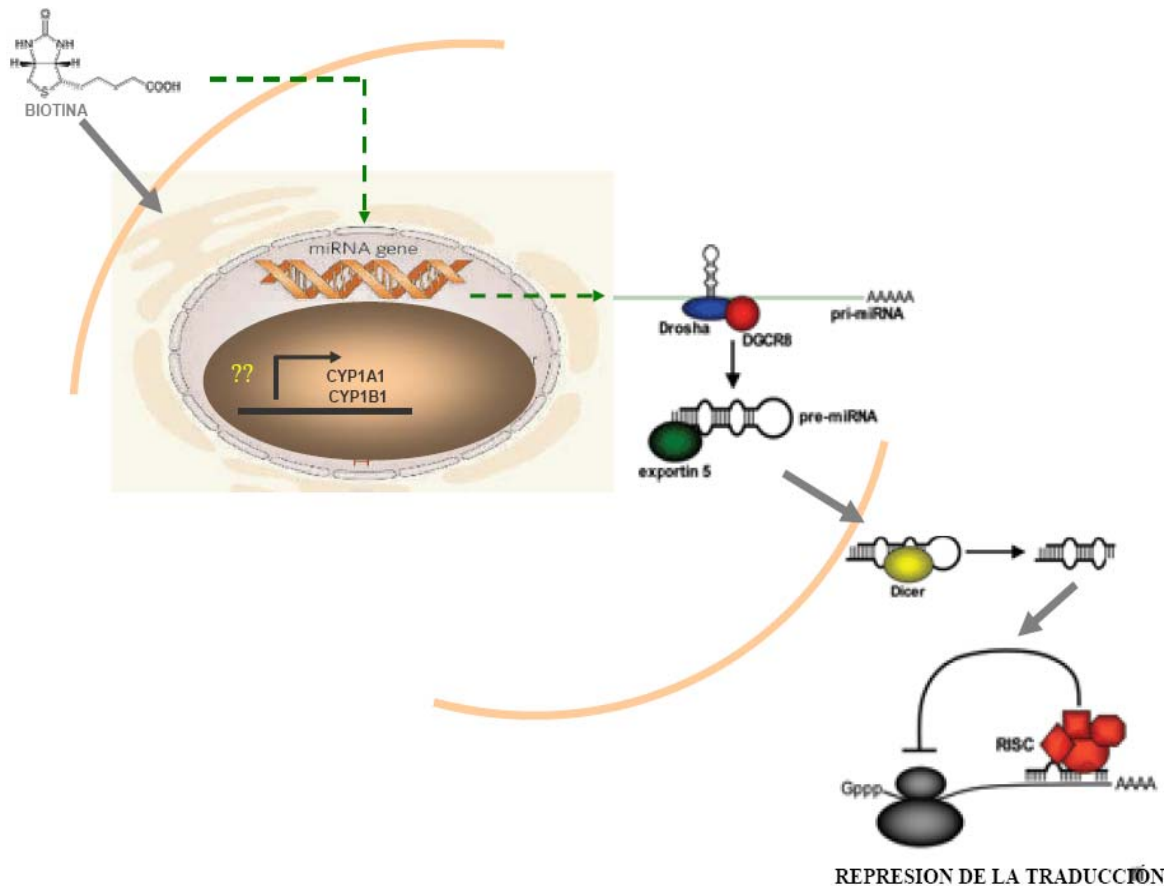


Figura 46. La biotina por un mecanismo aún desconocido activa la transcripción de la familia 1A y 1B de los P450, a su vez también activa pequeños RNAs regulatorios que actúan a nivel post-transcripcional sobre estas enzimas bloqueando su traducción.

Los mecanismos por los cuales concentración farmacológica de biotina afectan la expresión de genes, han sido poco estudiados. Se ha reportado que diversos componentes de la dieta, tales como aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos y vitaminas afectan la expresión y función de miRNAs (García-Segura et al.; Drummond et al. 2009; Komagata et al. 2009).

Adicionalmente suponemos que los dos únicos mecanismos moleculares por los cuales biotina regula la expresión de genes pueden estar relacionados: la biotinilación de histonas (Stanley et al. 2001; Kothapalli et al. 2005; Hassan y Zemleni 2006; Hassan y Zemleni 2008) y la cascada de transducción de

señales mediada por la guanilato ciclasa soluble (Vesely 1982; De La Vega y Stockert 2000; Solorzano-Vargas et al. 2002; Vilches-Flores et al. 2009). Recientemente se ha informado que los compuestos que aumentan GMPc tales como, péptidos natriuréticos y el óxido nítrico, aumentan de la expresión de miRNAs (Kotlo et al). Además se encontró que la expresión de la enzima holocarboxilasa sintetasa responsable de la unión de biotina a las carboxilasas es regulado por miR-539 y miR-153 (Bao et al. 2010; Bao et al. 2011). Las redes reguladoras de genes que interactúan con los compuestos bioactivos de los alimentos y miRNAs apenas comienzan a surgir (Haygood, Fedrigo et al. 2007; Gaedicke et al. 2008).

13.- CONCLUSIONES

- ❖ La administración de biotina aumentó el mRNA de CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 a las 24 hrs de administración, confirmando su papel como inductor transcripcional.
- ❖ La inducción del mRNA por biotina no provocó cambios ni en la actividad ni en la concentración de proteína de los CYP's sugiriendo una regulación post-transcripcional.
- ❖ Se evaluó la posible participación de microRNAs mediante su cuantificación por PCR Tiempo Real, y se observó un aumento en la presencia de biotina.
- ❖ Los efectos de la biotina sobre la actividad de CYP1A fueron confirmados por diferentes estrategias indicando que la biotina no interfiere con la actividad de CYP1A, por lo tanto sugerimos que la administración de esta vitamina no influye en el metabolismo mediado por esta enzima, apoyando aún más su uso terapéutico.

14.- PERSPECTIVAS

- ❖ El papel de los miRNAs propuesto en el presente trabajo requiere mayor investigación para lo cual se propone realizar ensayos de funcionalización que consisten en introducir los miRNAs in vivo o in vitro y medir la expresión de los CYP's. Lo que se espera es que ésta se vea disminuida, debido al efecto causado por estos RNAs regulatorios.
- ❖ Los hallazgos de que la biotina no modifica la actividad de citocromo involucrados en el metabolismo de fármacos apoyan aun más la idea de su uso terapéutico, sin embargo sugerimos reforzar esta idea con estudios de farmacocinética y farmacodinamia de medicamentos de acción hipoglucemiante y su interacción con esta vitamina.

15. ARTICULO PUBLICADO

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2013, Article ID 627907, 9 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/627907>



Research Article

Modulation of the Rat Hepatic Cytochrome P4501A Subfamily Using Biotin Supplementation

M. D. Ronquillo-Sánchez, R. Camacho-Carranza, C. Fernandez-Mejia, S. Hernández-Ojeda, M. Elinos-Baez, and J. J. Espinosa-Aguirre

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70228, 04510 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to J. J. Espinosa-Aguirre; jjea99@gmail.com

Received 14 April 2013; Accepted 2 July 2013

Academic Editor: Anastasia Kotanidou

Copyright © 2013 M. D. Ronquillo-Sánchez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Studies have found that biotin favors glucose and lipid metabolism, and medications containing biotin have been developed. Despite the use of biotin as a pharmacological agent, few studies have addressed toxicity aspects including the possible interaction with cytochrome P450 enzyme family. This study analyzed the effects of pharmacological doses of biotin on the expression and activity of the cytochrome P4501A subfamily involved in the metabolism of xenobiotics. Wistar rats were treated daily with biotin (2 mg/kg, i.p.), while the control groups were treated with saline. All of the rats were sacrificed by cervical dislocation after 1, 3, 5, or 7 days of treatment. CYP1A1 and CYP1A2 mRNAs were modified by biotin while enzyme activity and protein concentration were not affected. The lack of an effect of biotin on CYP1A activity was confirmed using other experimental strategies, including (i) cotreatment of the animals with biotin and a known CYP1A inducer; (ii) the addition of biotin to the reaction mixtures for the measurement of CYP1A1 and CYP1A2 activities; and (iii) the use of an S9 mixture that was prepared from control and biotin-treated rats to analyze the activation of benzo[a]pyrene (BaP) into mutagenic metabolites using the Ames test. The results suggest that biotin does not influence the CYP1A-mediated metabolism of xenobiotics.

1. Introduction

The vitamin biotin acts as a covalently bound coenzyme of carboxylases. Unrelated to this role, biotin supplementation modifies gene expression [1–5] and displays a wide repertoire of effects on systemic processes [6]. DNA microarray studies and high-throughput immunoblotting studies have aided in the identification of thousands of genes whose expression levels are modified by biotin at both the transcriptional and the posttranscriptional levels [5, 7]. Biotin supplementation modifies the expression of critical genes that are involved in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism [8–14]. In agreement with these findings, several observations have indicated that biotin supplementation improves glucose and triglyceride homeostasis [15–19], which has led to the development of commercially available medications containing pharmacologically relevant amounts of biotin (2 mg/day) in combination with chromium picolinate [20, 21].

Despite its use as a pharmacological agent, few studies have addressed the toxicity of biotin [22–25]. DNA microarray studies have provided evidence that biotin supplementation increases the levels of mRNA encoding cytochrome P450 (CYP)1B1 in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* [5]. In addition, the transcriptional activation of this gene was associated with the increased activity of CYP1B1 in human lymphoid cells and with the increased frequency of single-stranded DNA breaks [26].

CYP enzymes are a superfamily of hemoproteins that metabolize endogenous compounds and foreign substances (xenobiotics) in several organisms, including mammals [27]. The CYP1 family members are particularly important due to their capacity to “activate” a broad variety of procarcinogens and some drugs, leading to the formation of highly reactive metabolites that can react with macromolecules, including proteins, lipids, and nucleic acids [28, 29]. Additionally, CYP expression is further subject to chemical induction or inhibition that results in quantitative variations in

metabolic activity. The modulation of CYP expression is implicated in at least two scenarios: (i) drug-drug interactions, leading to adverse health effects and (ii) inhibition of mutagenic/carcinogenic compound metabolism, leading to antimutagenic/anticarcinogenic effects. Therefore, the evaluation of the capacity of any new compound that is intended for human use to interact with the CYP enzymes that are involved in xenobiotic metabolism is mandatory.

Although biotin consumption is considered to be safe [22], studies evaluating its toxicity at high doses need to be carefully conducted, as biotin supplementation affects gene expression and physiological functions. In this study, we analyzed the effects of pharmacological doses of biotin on the expression and activity of members of the CYP1A subfamily that are involved in the metabolism of procarcinogens and some drugs.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals. Biotin, ethoxyresorufin (ER), methoxyresorufin (MR), resorufin, dimethyl sulfoxide (DMSO), benzo[a]pyrene (BaP), and NADPH were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Rabbit polyclonal anti-rat CYP1A1 and rabbit polyclonal anti-rat CYP1A2 were both purchased from Chemicon International Inc. (Atlanta, GA, USA). Mouse polyclonal anti-rat GAPDH was obtained from Millipore (Billerica, MA, USA). Rabbit anti-mouse peroxidase and goat anti rabbit peroxidase were obtained from Invitrogen Life Technologies (CA, USA). The chemicals that were used for electrophoresis and the nitrocellulose membranes were purchased from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Trizol reagent, M-MLV reverse transcriptase, and oligo dT primers were purchased from Invitrogen Life Technologies (CA, USA). Taq Man universal PCR master mix, unlabeled PCR primers, and TaqMan MGB probes were purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

2.2. Animals. This study was approved by the Ethical Committee for Experimentation of the Biomedical Research Institute of the National Autonomous University of Mexico. Male Wistar rats (200–250 g body weight) were obtained from the animal facility at the Biomedical Research Institute of the National Autonomous University of Mexico and were handled according to the standard procedures that were established by the Ethical Committee for Experimentation at the same institute. Animals were maintained under a 12/12-hr light/dark cycle and were allowed to consume water and food *ad libitum* throughout the experimental periods, with the exception of the fasting period prior to sacrifice.

2.3. In Vivo Studies

2.3.1. Animals Treated with Biotin. Thirty-two rats were divided into eight groups: four control groups and four experimental groups (each group contained four animals). The control groups were treated daily with saline (phosphate-buffered, i.p.), and the experimental groups were treated daily

with biotin (2 mg/kg, i.p.) at doses that were equivalent to pharmacological doses of biotin. All of the rats were sacrificed by cervical dislocation after 1, 3, 5, or 7 days of treatment.

2.3.2. Animals Treated with Biotin and Benzo[a]pyrene. We examined the effects of treatment with biotin in combination with BaP, a well-known CYP inducer, to examine the possible additive effects of these agents. Twenty rats were divided into four groups (five animals per group): control (saline), biotin treated (2 mg/kg, i.p.), BaP treated (15 mg/kg, i.p.), and biotin + BaP treated (2 mg/kg of biotin and 15 mg/kg of BaP). All of the rats were sacrificed by cervical dislocation after 24 hrs of treatment. Liver microsomes were prepared to measure the ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and methoxyresorufin O-demethylase (MROD) activities.

2.3.3. Preparation of the Liver S9 and Microsomal Fractions of Treated Animals. Liver S9 fractions were prepared according to the procedure described by Maron and Ames [30]. The rats were sacrificed by cervical dislocation, after which point their livers were rapidly removed, weighed, and washed in a 0.15 M KCl solution and minced. Each sample was separately homogenized in the same solution (3 mL/g liver). The homogenates were centrifuged at 9,000 ×g for 10 min, and the supernatants were stored at –80°C. A portion of this supernatant fraction was centrifuged at 105,000 ×g for 60 min aseptically at 4°C. The microsomal pellet was resuspended in a phosphate-buffered solution (67.5 mM K₂HPO₄ and 32.5 mM KH₂PO₄, pH = 7.4) and centrifuged again. Finally, the microsomes were stored in the same phosphate-buffered solution containing 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, and 20% glycerol, aliquoted into a series of labeled vials, and frozen at –80°C. The protein content of each sample was determined using the method outlined by Bradford [31].

2.3.4. RNA Isolation and Quantitative Real-Time RT-PCR Expression Analysis of the Cytochrome P450 Enzymes. Total RNA was extracted from frozen liver tissues using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). The RNA concentration was determined by measuring the optical density at 260 nm, and the purity was determined by calculating the OD₂₆₀/OD₂₈₀ absorption ratio (all ratios were ensured to be >1.8). RNA integrity was confirmed by electrophoresis on a 1% denaturing agarose gel. The chemicals that were used for reverse transcription were purchased from Invitrogen Life Technologies (CA, USA). The isolated RNA was reverse-transcribed using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT). Briefly, the RNA was denatured by heating it at 65° for 5 min, cooled on ice, and incubated in a reverse transcriptase reaction mixture. The standard mixture contained 1 µg of total RNA, 40 units/µL of RNaseOUT recombinant ribonuclease inhibitor, 10 mM concentrations of each of the dNTPs, 1 µL of oligo (dT)_{12–18}, 4 µL of 5X first-strand buffer, 2 µL of 0.1 M DTT, and 200 U of M-MLV reverse transcriptase in a total volume of 20 µL. For reverse transcription, the tubes were incubated at 37° for 50 min, followed by rapid cooling.

PCR was performed using an ABI PRISM 7500 sequence detection system (Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) using melting, annealing, and extension cycling conditions of 95° for 15 sec, 50° for 2 min, and 60° for 1 min. All amplifications were repeated for 40 cycles. Taq-Man Gene expression primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used to detect CYP1A1 (Rn 00487218_m1), CYP1A2 (Rn 00561082_m1), and GAPDH (Rn 99999916_s1). The quantitative expression levels of the genes were calculated based on the cycle threshold (CT) value of each sample at the linear part of the curve using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ relative quantification method [32]. All of the samples were assayed in triplicate. The values for each gene were normalized to the value of the housekeeping gene, GAPDH.

2.3.5. Quantitative Real-Time RT-PCR Analyses of miR-27b, miR-122, and miR-328a Expression. To evaluate the concentrations of miR-27b, miR-122, and miR-328a, we performed quantitative real-time reverse transcription PCR assays in rat liver samples. The total RNA and miRNA fractions were isolated from the livers of control and biotin-supplemented rats using a small RNA isolation kit (Ambion, CA, USA). The miRNA expression levels were quantified using the mirVana qRT-PCR miRNA detection protocol (Ambion, CA, USA). The primers used were obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) to detect miR-27b (rno-miR-27b* 464436.mat), miR-122 (rno-mir-122* 463893.mat), and miR-328a (rno-mir-328a* 462041.mat). Mature miRNA U87 was used as internal reference to normalize the RNA levels of the genes being studied. Each PCR reaction was performed in triplicate in a 20 μ L volume using TaqMan MicroRNA assays (Applied Biosystems) for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 60 s in an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The miRNA levels were quantified using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ relative quantification method [32] using the following formula: $2^{(CT_{\text{microRNA}} - CT_{\text{U87}})}$.

2.3.6. CYP1A1 and CYP1A2 Activities. The formation of resorufin after *O*-dealkylation of 7-ethoxyresorufin and 7-methoxyresorufin, which are metabolic probes for the activity of CYP1A1 and CYP1A2, respectively, was measured spectrofluorometrically according to the procedure outlined by Burke et al. [33]. The catalytic activities were calculated from a standard curve of resorufin (5–500 pmol/mL). The excitation and emission wavelengths were set at 530 and 590 nm, respectively.

2.3.7. Western Blot Analyses. Hepatic microsomes were used for the determination of CYP activity. Ten micrograms of the microsomal proteins from individual animals were separated using 7.5% SDS-PAGE and were transferred to 0.45 mm nitrocellulose sheets overnight [34]. The nitrocellulose membranes were blocked for 1 hr with 5% nonfat dry milk in phosphate-buffered saline at 4°C [35]. After a 10 min wash

with PBS containing 0.3% Tween-20, the membranes were incubated with the corresponding anti-rat primary antibodies, anti-CYP1A1 (1:10000), and anti-CYP1A2 (1:10000), at room temperature for 1 hr. The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG secondary antibodies at room temperature for 1 hr (1:6400). To confirm equal loading in each lane, the protein levels of the CYP enzymes were normalized to the GAPDH protein levels. The proteins of interest were revealed using Luminol. Relative increases in band intensity over the controls for each CYP isoform were determined using ID Kodak 3.6.3 v computer software.

2.4. In Vitro Studies

2.4.1. Biotin-CYP Interactions. We determined both the EROD and MROD activities in the microsomes of rats that had been treated with phenobarbital (60 mg/kg, i.p., for the first three days and 30 mg/kg, i.p., on day four) and β -naphthoflavone (80 mg/kg, i.p., on day three) in the presence or absence of different concentrations of biotin to explore whether this vitamin could interfere with these enzyme activities. Buffer (50 mM Tris-HCl and 25 mM MgCl₂, pH = 7.6), the substrate (dissolved in DMSO), and NADPH were incubated at 37°C for 3 min in a fluorometry cuvette. The enzymatic reactions were initiated by adding total microsomal proteins (200 μ g) at the same time that we added different concentrations of biotin (1, 2.5, 5, and 10 μ g/mL). The reactions were followed for 3 min, and the fluorescence was recorded every 15 s. The catalytic activities were calculated from a standard curve of resorufin (5–500 pmol/mL). The excitation and emission wavelengths were set at 530 and 590 nm, respectively.

2.4.2. Ames Test. The *Salmonella* mutagenicity plate incorporation test was performed according to the method described by Maron and Ames [30]. Bacterial cultures were obtained by the inoculation of a liquid nutrient broth with the *S. typhimurium* strain TA98 and were incubated at 37°C with shaking overnight. We examined the liver S9 fractions from both control rats and rats that had been treated with biotin (2 mg/kg, i.p.) for 1, 3, 5, and 7 days. The S9 mixture consisted of the S9 fraction (0.1 mL/mL of S9), MgCl₂ (8 mM), KCl (33 mM), glucose 6-phosphate (5 mM), and NADP⁺ (4 mM) in 50 mM phosphate buffer (pH = 7.4). The bacterial cultures (0.1 mL), BaP (1, 5, 10, and 20 μ g per plate), and the S9 mixture (0.5 mL) were mixed with soft agar and poured onto Petri dishes containing Vogel-Bonner minimal medium. The plates were incubated for 48–72 hrs, and the numbers of revertant colonies (His⁺) were recorded.

2.5. Statistical Analyses. All statistical analyses were performed using commercially available GraphPad Prism v 4.0 (La Jolla, CA, USA) software. The data were expressed as the means \pm SEM. Statistical significance was assessed using Student's *t*-test, with the levels of significance set at $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of Biotin on P450 mRNA Levels. To evaluate whether pharmacological concentrations of biotin can modulate CYP1A expression in *in vivo* studies, we examined mRNA levels in the livers of rats that had been treated with biotin (2 mg/kg) at different times after administration. The results demonstrated that biotin significantly increased CYP1A1 and CYP1A2 mRNA levels (by 2.23 ± 0.22 and 1.50 ± 0.10 folds, resp.) after 24 hrs of biotin treatment, as shown in Figures 1(a) and 2(a). It is interesting to note that the increase in CYP1A1 decreased after 3 days (0.24 ± 0.01 fold decrease) compared with the control. At 5 and 7 days after biotin treatment, CYP1A1 and CYP1A2 began to return to control levels.

3.2. Analysis of CYP Protein Expression. CYP protein expression in the rat livers was evaluated using Western blot (Figures 1(b) and 2(b)). Densitometric analyses of the bands revealed that the protein concentrations were not affected by biotin treatment on different days ($P \leq 0.05$).

3.3. Effects of Biotin on CYP Activities. The levels of CYP1A1 and CYP1A2 activities were slightly higher than those in the controls at day 1, but the differences were not statistically significant ($P \leq 0.05$). No changes were noted after 3, 5, and 7 days of biotin treatment (Figures 1(a) and 2(a)). These results corresponded to the effects that were observed at the protein level. The same microsomal samples that were used for the immunoblots were used for the enzymatic activity determinations.

3.4. Effects of Biotin on BaP-Induced CYP Activity. Biotin was administered to rats in combination with BaP, a typical inducer of members of the CYP1A subfamily, to analyze whether the vitamin potentiated the capacity of BaP to increase CYP1A activity. The hepatic microsomal EROD and MROD activities were similar in animals that had been treated with either BaP alone or both biotin and BaP (Figure 3).

3.5. Determination of the Possible Interactions between Biotin and the Catalytic Activities of CYP1A1 and CYP1A2. To investigate whether biotin could interfere with the EROD and MROD activities, we used phenobarbital/ β -naphthoflavone-induced rat liver microsomes. Different concentrations of biotin were added to the reaction mixtures with ER or MR. Biotin did not interfere with the activities of the CYP enzymes studied (Figure 4).

3.6. Ames Test. The mutagenic potencies of BaP resulting from its activation by S9 mixtures that were prepared from either the livers of biotin-treated rats or those prepared from the livers of control animals were very similar (Table 1). BaP had a mutagenic potency of $57.2 \text{ rev}/\mu\text{g}$ when activated by S9 mixtures that had been prepared from the livers of rats after 24 hrs of biotin treatment and a potency of $40.5 \text{ rev}/\mu\text{g}$ when activated by S9 mixtures that had been prepared from the livers of control rats. The mutagenic potencies of BaP that had

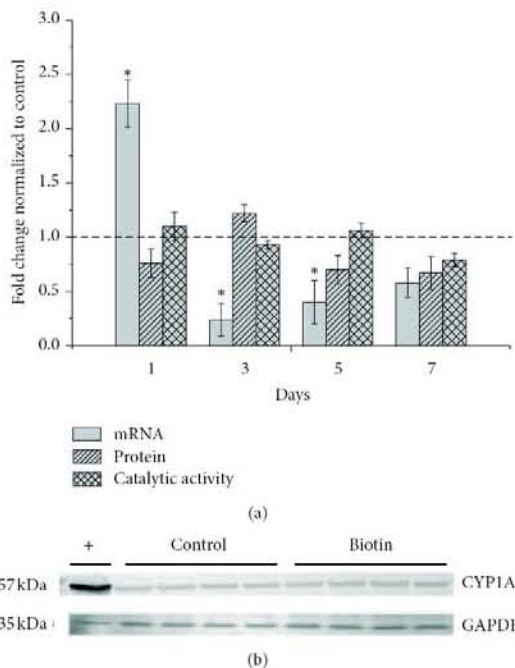


FIGURE 1: Relative CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity levels after 1, 3, 5, and 7 days of biotin treatment (2 mg/kg, i.p.). The data are expressed as fold changes relative to the control group (dashed line). The data represent the means \pm SEM of 4 rats per group from two independent experiments. *Significantly different from the controls ($P \leq 0.05$), as assessed using Student's *t*-test (a). Representative CYP1A1 immunoblot (24 hrs after biotin treatment). The intensities of the bands were normalized to GAPDH. The values are expressed as fold changes relative to the control group (dashed line). The (+) band corresponds to liver microsomes that were prepared from rats that had been treated with BaP (10 mg/kg), bands 2-5 are from control rats, and bands 6-9 correspond to biotin-treated rats (2 mg/kg). The molecular weights of the bands are indicated on the left: 57 kDa for CYP1A1 and 35 kDa for GAPDH. Four animals were used per group, and the data represent the results of two independent experiments (b).

been activated by hepatic S9 from rats that had been treated with biotin for 7 days and S9 that had been prepared from the control animals were 15.0 and $16.5 \text{ rev}/\mu\text{g}$, respectively. In contrast, the mutagenic potencies of BaP that had been activated by S9 mixtures that had been prepared from rats that had been pretreated with a combination of known CYP inducers ranged from 37.4 to $62.3 \text{ rev}/\mu\text{g}$.

3.7. Expression of miRNAs. We also evaluated the levels of miR-27b, miR-122, and miR-328a in rat liver at different times after biotin treatment (2 mg/kg). The expression levels of the three miRNAs studied were increased after 24 hrs of biotin treatment. The levels of miR-27b remained increased after 3 and 5 days of biotin treatment, and the levels of the three

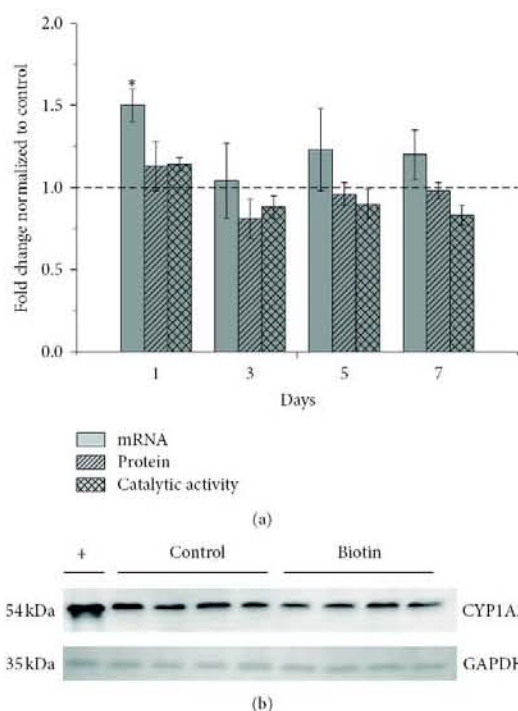


FIGURE 2: Relative CYPIA2 mRNA, protein, and catalytic activity levels after 1, 3, 5, and 7 days of biotin treatment (2 mg/kg, i.p.). The data are expressed as fold changes relative to the control group (dashed line). The data represent the means \pm SEM of 4 rats per group from two independent experiments. *Significantly different from the controls ($P \leq 0.05$), as assessed using Student's *t*-test (a). Representative CYPIA2 immunoblot (24 hrs after biotin treatment). The intensities of the bands were normalized to GAPDH. The values are expressed as fold changes relative to the control group (dashed line). The (+) band corresponds to liver microsomes that were prepared from rats that had been treated with BaP (10 mg/kg), bands 2-5 are from control rats, and bands 6-9 correspond to biotin-treated rats (2 mg/kg). The molecular weights are indicated on the left: 54 kDa for CYPIA2 and 35 kDa for GAPDH. Four animals were used per group, and the data represent the results of two independent experiments (b).

miRNAs that were studied had returned to control levels after 7 days of treatment (Figure 5).

4. Discussion

Few studies have evaluated the toxicity of biotin [22-25]. Furthermore, studies that evaluated the toxicity of concentrations above normal levels need to be carefully readdressed given that the number of commercially available supplements that contain pharmacological amounts of the vitamin has increased [20]. In this work, we analyzed the effects of i.p. doses of 2 mg/kg of biotin on the expression and activity of members of the CYPIA subfamily that are involved in drug

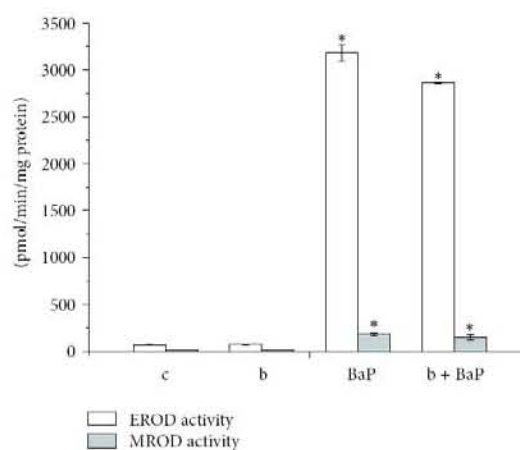


FIGURE 3: Effects of biotin treatment on EROD and MROD levels in the hepatic tissues of rats that were treated with a single i.p. dose of PBS IX (control), biotin (2 mg/kg), BaP (10 mg/kg), or biotin + BaP (2 mg/kg of biotin plus 10 mg/kg of BaP). EROD activity: (pmol of resorufin formed/min/mg of protein); MROD activity: (pmol of resorufin formed/min/mg of protein). The results represent the means \pm SEM. $n = 5$ rats per group. A $P \leq 0.05$ was considered to be significantly different from the control group using Student's *t*-test.

and xenobiotic metabolism. This dose of biotin is known to induce the expression of genes that are related to glucose metabolism [36].

Our results revealed that biotin administration modified CYPIA expression but did not alter the activity or protein concentrations of CYPIA (Figures 1 and 2). The finding that biotin administration did not affect CYPIA2 activity is of clinical interest because this enzyme is involved in the metabolism of numerous drugs, including clozapine, theophylline, tacrine, and verapamil, among others [37]. Therefore, alterations of the basal activity of CYPIA2 may cause clinically important drug-drug and food-drug interactions [38, 39]. These findings suggest that there is a low probability of drug-drug interactions resulting from the coadministration of biotin with drugs that are metabolized by CYPIA2. Additionally, CYPIA1 metabolizes polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are ubiquitous compounds that are found in petroleum and emissions that are produced during the combustion of fossil fuels, in charred meat and fish that have been cooked directly over a fire, in tobacco smoke, and in several other products that are the result of the incomplete combustion of organic matter [40]. The metabolites that are formed from the interaction of CYPIA1 and PAHs are well known to generate DNA adducts leading to mutagenic events and chromosome aberrations that can contribute to the carcinogenic process [41]. Therefore, the lack of effect of biotin on CYPIA1 activity that was observed in this work supports the idea that exposure to biotin at pharmacologically relevant concentrations is harmless.

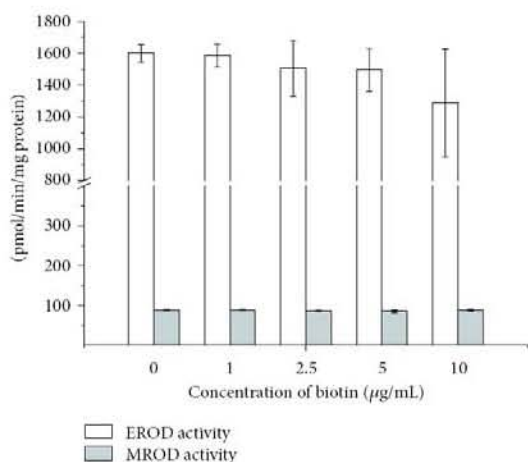


FIGURE 4: Effects of biotin treatment on EROD and MROD levels in the hepatic tissues of rats that were simultaneously treated with phenobarbital (60 mg/kg) and β -naphthoflavone (80 mg/kg). Increasing biotin concentrations were added to the reaction mixtures when measuring the enzymatic activity: (pmol of resorufin formed/min/mg of protein). The results represent the means \pm SEM of two independent experiments that were conducted in triplicate. A $P \leq 0.05$ was considered to be significantly different from the control group using Student's *t*-test.

To further investigate the possible role of biotin in the modulation of members of the CYP1A subfamily, we explored the effects of biotin administration along with the known CYP inducer BaP, a typical substrate and inducer of these enzymes. No differences were detected in the activities of either CYP1A1 or CYP1A2 in hepatic microsomes that were obtained from rats that had been treated with the combination of biotin + BaP or BaP alone (Figure 3). Furthermore, biotin did not interfere with the activities of CYP1A1 or CYP1A2 when it was added to the reaction mixtures containing ER as a CYP1A1 substrate or MR as a CYP1A2 substrate, indicating that biotin does not act as an inhibitor for members of the CYP1A subfamily (Figure 4).

Additional evidence supporting the notion that biotin does not modulate the activity of the CYP enzymes studied was obtained using the Ames test [30]. This assay has been used to estimate the biological significance of CYP modulation, as the production of mutagenic metabolites from a known promutagen is dependent upon the CYP activity in the S9 mixture [42]. The S9 mixture that was prepared from rat livers that had been treated with biotin activated BaP at similar levels to that of the S9 mixture that had been prepared from the livers of control rats (Table 1). This result indicated that exposure to biotin did not alter the capacity of CYP1A1 to metabolize other substrates. Therefore, biotin may not influence CYP1A-mediated metabolism, further supporting its use as a therapeutic drug.

In contrast to the observed mRNA upregulation, CYP1A expression and enzyme activity were not significantly

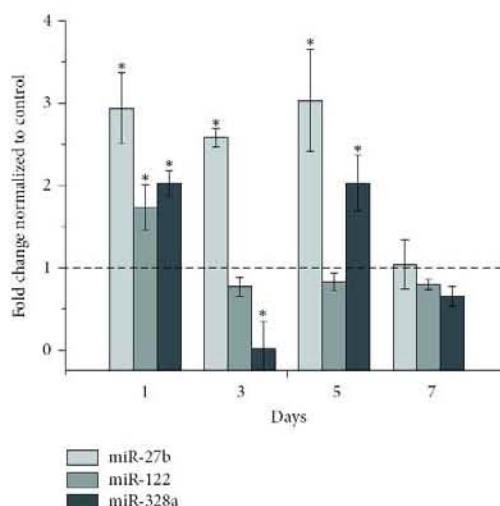


FIGURE 5: miR-27b, miR-122, and miR-328a levels after 1, 3, 5, and 7 days of biotin treatment (2 mg/kg, i.p.) in rat liver. The data are expressed as fold changes relative to the control (defined as 1, dashed line). The data represent the means \pm SEM of 4 rats per group from two independent experiments. *Significantly different from the controls ($P \leq 0.05$), as assessed using Student's *t*-test.

affected. These discrepancies may be explained by the fact that several studies have found that the abundance of selected proteins was not paralleled by the abundance of their mRNAs [7, 43]. In addition, pyruvate carboxylase apoenzyme expression is regulated by biotin at the posttranscriptional level, thereby influencing both protein synthesis and degradation [44]. Taken together, our observations suggest that biotin-based posttranscriptional effects may also influence CYP1A expression.

One possible explanation for our results could be post-transcriptional regulation that is mediated by the presence of miRNAs, which are small noncoding RNAs that regulate transcriptional and posttranscriptional gene expression [45]. In this process, not all of the mRNAs are translated immediately. Some of the mRNAs are maintained in a translationally repressed state and may be transported to a specific cytoplasmic location where translation is activated [46]. Recent studies have provided evidence that mRNAs that are silenced by miRNAs are localized in P-bodies for storage or degradation [47]. miR-27b, miR-122, and miR328a have been recently reported to be associated with the regulation of CYP enzymes [48–50]. Using *in silico* tools, such as BLAST and miRBASE, we identified target sequences for these miRNAs in the CYP1A subfamily. Our results (Figure 5) support the idea that the upregulation of these miRNAs by biotin could be implicated in the posttranscriptional regulation of CYP1A, although we cannot rule out that other posttranscriptional mechanisms may participate, given that biotin influences both protein synthesis and degradation [44]. Therefore, we

TABLE 1: Evaluation of the mutagenicity of the S9 fraction that was obtained from rats that were treated with biotin in the Ames test.

Day	Chemical	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of His ⁺ revertants/plate ^(a)		
			B ⁻ ^(b)	B ⁺ ^(c)	Positive control ^(d)
1	B[a]P	0	23 \pm 5	18 \pm 1	28 \pm 6
		1	55 \pm 17	55 \pm 8	59 \pm 6
		5	229 \pm 104	210 \pm 59	433 \pm 143
		10	215 \pm 67	220 \pm 61	557 \pm 86
		20	304 \pm 49	281 \pm 30	913 \pm 144
		Induced revertants/ μg ^(e)	40.5	52.7	62.3*
7	B[a]P	0	49 \pm 8	62 \pm 10	66 \pm 7
		1	68 \pm 7	66 \pm 8	81 \pm 27
		5	132 \pm 7	137 \pm 20	300 \pm 29
		10	114 \pm 17	128 \pm 8	436 \pm 99
		20	148 \pm 31	159 \pm 15	773 \pm 127
		Induced revertants/ μg ^(e)	16.5	15.0	37.4*

^(a)The mean number of revertant colonies identified in three replicates in two independent experiments.

^(b)The liver S9 fraction from control rats.

^(c)The liver S9 fraction from biotin-treated rats (2 mg/kg).

^(d)The liver S9 fraction from phenobarbital-treated rats (60 mg/kg). β -naphthoflavone (80 mg/kg) was used as a positive control.

^(e)The slope at the origin was calculated using the SALANAL software program.

*Significantly different from B⁻ and B⁺ ($P \leq 0.05$), as assessed using Student's *t*-test.

propose that the observed changes to the CYPIA subfamily at the posttranscriptional level may have been directly produced by biotin or derived from a pleiotropic response that was triggered by biotin in the cell and that these changes cause an increase in small regulatory RNAs, such as miRNAs, which silence the subsequent translation of CYP1 mRNA. This hypothesis is currently being tested in experiments that are underway in our laboratory.

In conclusion, biotin administration affected the mRNA expression levels of CYP1A1 and CYP1A2. CYP1 mRNA induction had no effects at the protein or enzyme activity levels, suggesting that posttranscriptional regulation had occurred. The effects of biotin on CYP1A activity were confirmed using several different strategies. These results indicate that biotin does not interfere with CYP1A activity and suggest that biotin administration does not influence CYP1A1- and CYP1A2-mediated drug metabolism.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

This study was performed in partial fulfilment of the requirements for the Ph.D. degree in Biomedical Sciences of M. D. Ronquillo-Sánchez (Universidad Nacional Autónoma de México), who was supported by CONACYT fellowship and Fundación Miguel Alemán, A.C. The technical assistance that was provided by Dr. Miguel Tapia is greatly appreciated.

References

- [1] K. Dakshinamurti, "Biotin—a regulator of gene expression," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 16, no. 7, pp. 419–423, 2005.
- [2] J. Zemleni, "Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin," *Annual Review of Nutrition*, vol. 25, pp. 175–196, 2005.
- [3] R. Rodriguez-Melendez and J. Zemleni, "Regulation of gene expression by biotin (review)," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 14, no. 12, pp. 680–690, 2003.
- [4] S. Wiedmann, J. D. Eudy, and J. Zemleni, "Biotin supplementation increases expression of genes encoding interferon- γ , interleukin-1 β , and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, and decreases expression of the gene encoding interleukin-4 in human peripheral blood mononuclear cells," *Journal of Nutrition*, vol. 133, no. 3, pp. 716–719, 2003.
- [5] S. Wiedmann, R. Rodriguez-Melendez, D. Ortega-Cuellar, and J. Zemleni, "Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 15, no. 7, pp. 433–439, 2004.
- [6] C. Fernández-Mejía, "A new panorama for understanding the molecular connections between obesity and type 2 diabetes mellitus," *Revista de Investigacion Clinica*, vol. 53, no. 3, pp. 209–211, 2001.
- [7] R. Rodriguez-Melendez, J. B. Griffin, J. Zemleni, and G. Sarath, "High-throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells," *Journal of Nutrition*, vol. 135, no. 7, pp. 1659–1666, 2005.
- [8] J. Chauhan and K. Dakshinamurti, "Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 16, pp. 10035–10038, 1991.
- [9] L. A. de la Vega and R. J. Stockert, "Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein

- kinase," *American Journal of Physiology*, vol. 279, no. 6, pp. C2037–C2042, 2000.
- [10] K. Dakshinamurti and W. Li, "Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 132, no. 2, pp. 127–132, 1994.
- [11] A. Vilches-Flores, A. R. Tovar, A. Marin-Hernandez, A. Rojas-Ochoa, and C. Fernandez-Mejia, "Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 21, no. 7, pp. 606–612, 2010.
- [12] G. Romero-Navarro, G. Cabrera-Valladares, M. S. German et al., "Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats," *Endocrinology*, vol. 140, no. 10, pp. 4595–4600, 1999.
- [13] Y. Sugita, H. Shirakawa, R. Sugimoto, Y. Furukawa, and M. Komai, "Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 72, no. 5, pp. 1290–1298, 2008.
- [14] E. Larrieta, F. Velasco, P. Vital et al., "Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes," *European Journal of Pharmacology*, vol. 644, no. 1–3, pp. 263–268, 2010.
- [15] J. C. Coggeshall, J. P. Heggors, M. C. Robson et al., "Biotin status and plasma glucose in diabetics," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 447, pp. 389–392, 1985.
- [16] M. Maebashi, Y. Makino, Y. Furukawa et al., "Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus," *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 14, pp. 211–218, 1993.
- [17] D. Koutsikos, C. Fourtounas, A. Kapetanaki et al., "Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients," *Renal Failure*, vol. 18, no. 1, pp. 131–137, 1996.
- [18] O. K. Dokusova and I. V. Krivoruchenko, "The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia," *Kardiologiya*, vol. 12, no. 12, p. 113, 1972.
- [19] C. Revilla-Monsalve, I. Zendejas-Ruiz, S. Islas-Andrade et al., "Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 60, no. 4, pp. 182–185, 2006.
- [20] C. Albarracin, B. Fuqua, J. Geohas et al., "Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus," *Diabetes Care*, vol. 54, pp. 428–433, 2005.
- [21] G. M. Singer and J. Geohas, "The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial," *Diabetes Technology and Therapeutics*, vol. 8, no. 6, pp. 636–643, 2006.
- [22] M. Z. Fiume, "Final report on the safety assessment of biotin," *International Journal of Toxicology*, vol. 20, supplement 4, pp. 1–12, 2001.
- [23] S. Hayes, A. Gordon, I. Sadowski, and C. Hayes, "RK bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: short-term forward selection assay," *Mutation Research*, vol. 130, no. 2, pp. 97–106, 1984.
- [24] T. H. Ma, M. M. Harris, and V. A. Anderson, "Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents," *Mutation Research*, vol. 138, no. 2-3, pp. 157–167, 1984.
- [25] SRI-International, "Microbial mutagenesis testing of substances compound report:F76-041, D-Biotin," Tech. Rep. PB89-169072, National Technical Information Service, 1979.
- [26] R. Rodriguez-Melendez, J. B. Griffin, and J. Zemleni, "Biotin supplementation increases expression of the cytochrome P450 1B1 gene in Jurkat cells, increasing the occurrence of single-stranded DNA breaks," *Journal of Nutrition*, vol. 134, no. 9, pp. 2222–2228, 2004.
- [27] Y. Fujii-Kuriyama and K. Kawajiri, "Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli," *Proceedings of the Japan Academy B*, vol. 86, no. 1, pp. 40–53, 2010.
- [28] D. W. Nebert, "The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects," *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 20, no. 3, pp. 153–174, 1989.
- [29] S. Rendic, "Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 34, no. 1-2, pp. 83–448, 2002.
- [30] D. M. Maron and B. N. Ames, "Revised methods for the Salmonella mutagenicity test," *Mutation Research*, vol. 113, no. 3-4, pp. 173–215, 1983.
- [31] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248–254, 1976.
- [32] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [33] M. D. Burke, S. Thompson, R. J. Weaver, C. R. Wolf, and R. T. Mayer, "Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver," *Biochemical Pharmacology*, vol. 48, no. 5, pp. 923–936, 1994.
- [34] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76, no. 9, pp. 4350–4354, 1979.
- [35] F. P. Guengerich, P. Wang, and N. K. Davidson, "Estimation of isozymes of microsomal cytochrome P-450 in rats, rabbits, and humans using immunochemical staining coupled with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis," *Biochemistry*, vol. 21, no. 7, pp. 1698–1706, 1982.
- [36] K. Dakshinamurti, L. Tarrago-Litvak, and H. C. Hong, "Biotin and glucose metabolism," *Canadian Journal of Biochemistry*, vol. 48, no. 4, pp. 493–500, 1970.
- [37] S. E. Zhou, B. Wang, L. P. Yang, and J. P. Liu, "Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 42, no. 2, pp. 268–354, 2010.
- [38] M. T. Granfors, J. T. Backman, M. Neuvonen, and P. J. Neuvonen, "Ciprofloxacin greatly increases concentrations and hypotensive effect of tizanidine by inhibiting its cytochrome P450 1A2-mediated presystemic metabolism," *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 76, no. 6, pp. 598–606, 2004.
- [39] Z. Hu, X. Yang, P. C. L. Ho et al., "Herb-drug interactions: a literature review," *Drugs*, vol. 65, no. 9, pp. 1239–1282, 2005.

- [40] B. D. Jeffy, R. B. Chirnomas, and D. F. Romagnolo, "Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 39, no. 2-3, pp. 235-244, 2002.
- [41] M. Shou, K. W. Krausz, E. J. Gonzalez, and H. V. Gelboin, "Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene by human recombinant cytochromes P450, lung and liver microsomes," *Carcinogenesis*, vol. 17, no. 11, pp. 2429-2433, 1996.
- [42] L. Cancino-Badías, R. E. Reyes, R. Nosti et al., "Modulation of rat liver cytochrome P450 by protein restriction assessed by biochemical and bacterial mutagenicity methods," *Mutagenesis*, vol. 18, no. 1, pp. 95-100, 2003.
- [43] A. Aguilera-Méndez and C. Fernández-Mejía, "The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation," *Biofactors*, vol. 38, no. 5, pp. 387-395, 2012.
- [44] N. Rodríguez-Fuentes, I. López-Rosas, G. Román-Cisneros, and A. Velázquez-Arellano, "Biotin deficiency affects both synthesis and degradation of pyruvate carboxylase in rat primary hepatocyte cultures," *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 92, no. 3, pp. 222-228, 2007.
- [45] K. Chen and N. Rajewsky, "The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs," *Nature Reviews Genetics*, vol. 8, no. 2, pp. 93-103, 2007.
- [46] A. Eulalio, I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde, "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 1, pp. 9-22, 2007.
- [47] S. P. Chan and F. J. Slack, "microRNA-mediated silencing inside P-bodies," *RNA Biology*, vol. 3, no. 3, pp. 97-100, 2006.
- [48] Y. Z. Pan, W. Gao, and A. M. Yu, "MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting," *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 37, no. 10, pp. 2112-2117, 2009.
- [49] Y. Tsuchiya, M. Nakajima, S. Takagi, T. Taniya, and T. Yokoi, "MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1," *Cancer Research*, vol. 66, no. 18, pp. 9090-9098, 2006.
- [50] T. Mohri, M. Nakajima, T. Fukami, M. Takamiya, Y. Aoki, and T. Yokoi, "Human CYP2E1 is regulated by miR-378," *Biochemical Pharmacology*, vol. 79, no. 7, pp. 1045-1052, 2010.

16.- REFERENCIAS

- Aguilera-Mendez, A. and C. Fernandez-Mejia "The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation." Biofactors **38**(5): 387-94.
- Albarracin, C., B. Fuqua, et al. (2005). "Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus" Diabetes care **54**:A428.33.
- Baez-Saldana, A., G. Diaz, et al. (1998). "Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice." Am J Clin Nutr **67**(3): 431-7.
- Bailey, L. M., R. A. Ivanov, et al. (2008). "Artificial detection of biotin on histones by streptavidin." Anal Biochem **373**(1): 71-7.
- Bao, B., R. Rodriguez-Melendez, et al. (2010). "Biotin regulates the expression of holocarboxylase synthetase in the miR-539 pathway in HEK-293 cells." J Nutr **140**(9): 1546-51.
- Bao, B., R. Rodriguez-Melendez, et al. (2011). "Cytosine methylation in miR-153 gene promoters increases the expression of holocarboxylase synthetase, thereby increasing the abundance of histone H4 biotinylation marks in HEK-293 human kidney cells." J Nutr Biochem **23**(6): 635-9.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-33.
- Baumgartner, E. R. and T. Suormala (1997). "Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism." Int J Vitam Nutr Res **67**(5): 377-84.
- Berezikov, E., E. Cuppen, et al. (2006). "Approaches to microRNA discovery." Nat Genet **38** Suppl: S2-7.
- Berka, K., Palocycova M (2013). " Behavior of Human Cytochromes P450 on Lipid Membranes." J Phys Chem **117**(39): 11556-11564.
- Bertilsson, G., J. Heidrich, et al. (1998). "Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12208-13.
- Bhullar, R. P. and K. Dakshinamurti (1985). "The effect of biotin on cellular functions in HeLa cells." J Cell Physiol **123**(3): 425-30.
- Blumberg, B., W. Sabbagh, Jr., et al. (1998). "SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor." Genes Dev **12**(20): 3195-205.
- Boas, M. A. (1927). "The Effect of Desiccation upon the Nutritive Properties of Egg-white." Biochem J **21**(3): 712-724 1.
- Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, et al. (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." RNA **10**(2): 185-91.
- Bonjour, J. (1991). "Biotin. in Handbook of vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects." ed. Machlin, L. **403**(Marcel Dekker, New York).
- Borboni, P., R. Magnaterra, et al. (1996). "Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells." Acta Diabetol **33**(2): 154-8.
- Bracht, J., S. Hunter, et al. (2004). "Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts." RNA **10**(10): 1586-94.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.

- Brauze, D., M. Widerak, et al. (2006). "The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AhR, AhRR, ARNT, Hif1alpha, CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver." Toxicol Lett **167**(3): 212-20.
- Burke, M. D., S. Thompson, et al. (1994). "Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver." Biochem Pharmacol **48**(5): 923-36.
- Bushati, N. and S. M. Cohen (2007). "microRNA functions." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 175-205.
- Cai, X., C. H. Hagedorn, et al. (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." RNA **10**(12): 1957-66.
- Cancino-Badias, L., R. E. Reyes, et al. (2003). "Modulation of rat liver cytochrome P450 by protein restriction assessed by biochemical and bacterial mutagenicity methods [corrected]." Mutagenesis **18**(1): 95-100.
- Capdevila, J. H., R. C. Harris, et al. (2002). "Microsomal cytochrome P450 and eicosanoid metabolism." Cell Mol Life Sci **59**(5): 780-9.
- Carnahan, V. E. and M. R. Redinbo (2005). "Structure and function of the human nuclear xenobiotic receptor PXR." Curr Drug Metab **6**(4): 357-67.
- Coggeshall, J. C., J. P. Heggors, et al. (1985). "Biotin Status and Plasma Glucose in Diabetics." Ann NY Acad Sci. **447**(389-92).
- Collins, J. C., E. Paietta, et al. (1988). "Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2." J Biol Chem **263**(23): 11280-3.
- Committee, N. R. N. (1999). "A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily." Cell **97**: 161-163.
- Coon, M. J., X. X. Ding, et al. (1992). "Cytochrome P450: progress and predictions." FASEB J **6**(2): 669-73.
- Chan, S. P. and F. J. Slack (2006). "microRNA-mediated silencing inside P-bodies." RNA Biol **3**(3): 97-100.
- Chapman-Smith, A. and J. E. Cronan, Jr. (1999). "Molecular biology of biotin attachment to proteins." J Nutr **129**(2S Suppl): 477S-484S.
- Chapple, C. (1998). "Molecular-Genetic Analysis of Plant Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **49**: 311-343.
- Chauhan, J. and K. Dakshinamurti (1991). "Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats." J Biol Chem **266**(16): 10035-8.
- Chen, K. and N. Rajewsky (2007). "The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs." Nat Rev Genet **8**(2): 93-103.
- Dakshinamurti, K. (2005). "Biotin--a regulator of gene expression." J Nutr Biochem **16**(7): 419-23.
- Dakshinamurti, K. and J. Chauhan (1988). "Regulation of biotin enzymes." Annu Rev Nutr **8**: 211-33.
- Dakshinamurti, K. and J. Chauhan (1989). "Biotin." Vitam Horm **45**: 337-84.
- Dakshinamurti, K., J. Chauhan, et al. (1987). "Intestinal absorption of biotin and biocytin in the rat." Biosci Rep **7**(8): 667-73.
- Dakshinamurti, K. and C. Cheah-Tan (1968). "Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat." Arch Biochem Biophys **127**(1): 17-21.
- Dakshinamurti, K. and W. Li (1994). "Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats." Mol Cell Biochem **132**(2): 127-32.
- Dakshinamurti, K. and S. Litvak (1970). "Biotin and protein synthesis in rat liver." J Biol Chem **245**(21): 5600-5.

- Dakshinamurti, K., L. Tarrago-Litvak, et al. (1970). "Biotin and glucose metabolism." Can J Biochem **48**(4): 493-500.
- De La Vega, L. A. and R. J. Stockert (1999). "The cytoplasmic coatomer protein COPI. A potential translational regulator." J Biol Chem **274**(44): 31135-8.
- De La Vega, L. A. and R. J. Stockert (2000). "Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase." Am J Physiol Cell Physiol **279**(6): C2037-42.
- Delescluse C, L. G., de Sousa G, Rahmani R. (2000). "Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway?" Toxicology **153**(1-3): 73-82.
- Denli, A. M., B. B. Tops, et al. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." Nature **432**(7014): 231-5.
- Ding, X. and L. S. Kaminsky (2003). "Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 149-73.
- Dokusova, O. K. and I. V. Krivoruchenko (1972). "[The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia]." Kardiologija **12**(12): 113.
- Donato, M. T. (2004). "¿Qué es el citocromo P450, y cómo funciona?" Anales de la Real Academia de Nacional de Farmacia: 32-43.
- Drocourt, L., J. M. Pascussi, et al. (2001). "Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes." Drug Metab Dispos **29**(10): 1325-31.
- Drummond, M. J., E. L. Glynn, et al. (2009). "Essential amino acids increase microRNA-499, -208b, and -23a and downregulate myostatin and myocyte enhancer factor 2C mRNA expression in human skeletal muscle." J Nutr **139**(12): 2279-84.
- Eliasson, E., I. Johansson, et al. (1988). "Ligand-dependent maintenance of ethanol-inducible cytochrome P-450 in primary rat hepatocyte cell cultures." Biochem Biophys Res Commun **150**(1): 436-43.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, et al. (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 9-22.
- Fernandez-Mejia, C. (2005). "Pharmacological effects of biotin." J Nutr Biochem **16**(7): 424-7.
- Ferslew, K. E., A. N. Hagardorn, et al. (1998). "A fatal drug interaction between clozapine and fluoxetine." J Forensic Sci **43**(5): 1082-5.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, et al. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nat Rev Genet **9**(2): 102-14.
- Fiume, M. Z. (2001). "Final report on the safety assessment of biotin." Int J Toxicol **20 Suppl 4**: 1-12.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, et al. (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." Genome Res **19**(1): 92-105.
- Fujii-Kuriyama, Y. and J. Mimura (2005). "Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 311-7.
- Garcia-Segura, L., M. Perez-Andrade, et al. "The emerging role of MicroRNAs in the regulation of gene expression by nutrients." J Nutrigenet Nutrigenomics **6**(1): 16-31.
- Germain, P., B. Staels, et al. (2006). "Overview of nomenclature of nuclear receptors." Pharmacol Rev **58**(4): 685-704.
- Ghildiyal, M. and P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." Nat Rev Genet **10**(2): 94-108.

- Goasduff, T. and A. I. Cederbaum (2000). "CYP2E1 degradation by in vitro reconstituted systems: role of the molecular chaperone hsp90." Arch Biochem Biophys **379**(2): 321-30.
- Goeptar, A. R., H. Scheerens, et al. (1995). "Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450." Crit Rev Toxicol **25**(1): 25-65.
- Gonzalez-Jasso, E., T. Lopez, et al. (2003). "CYP2E1 regulation by benzene and other small organic chemicals in rat liver and peripheral lymphocytes." Toxicol Lett **144**(1): 55-67.
- Gonzalez, F. J., S. Y. Liu, et al. (1993). "Regulation of cytochrome P450 genes: molecular mechanisms." Pharmacogenetics **3**(1): 51-7.
- Gotoh, O. (1992). "Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences." J Biol Chem **267**(1): 83-90.
- Gregory, R. I., T. P. Chendrimada, et al. (2005). "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing." Cell **123**(4): 631-40.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, et al. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." Nature **432**(7014): 235-40.
- Guengerich, F. P. (1995). "Cytochromes P450 of human liver. Classification and activity profiles of the major enzymes. In: Advances in drug metabolism in man." Pacifici GM & Fracchia GN (eds) European Commission. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg: 179-231.
- Gustafsson, J. A. (1999). "Seeking ligands for lonely orphan receptors." Science **284**(5418): 1285-6.
- Han, J., Y. Lee, et al. (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." Genes Dev **18**(24): 3016-27.
- Hassan, Y. I. and J. Zemleni (2006). "Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin." J Nutr **136**(7): 1763-5.
- Hassan, Y. I. and J. Zemleni (2008). "A novel, enigmatic histone modification: biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase." Nutr Rev **66**(12): 721-5.
- Hayes, S., A. Gordon, et al. (1984). "RK bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: short-term forward selection assay." Mutat Res **130**(2): 97-106.
- Healy, S., B. Perez-Cadahia, et al. (2009). "Biotin is not a natural histone modification." Biochim Biophys Acta **1789**(11-12): 719-33.
- Hewitt, N. J., E. L. Lecluyse, et al. (2007). "Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: methods, mechanisms, recommendations, and in vitro-in vivo correlations." Xenobiotica **37**(10-11): 1196-224.
- Hu, Z., X. Yang, et al. (2005). "Herb-drug interactions: a literature review." Drugs **65**(9): 1239-82.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, et al. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-8.
- Hymes, J., K. Fleischhauer, et al. (1995). "Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency." Biochem Mol Med **56**(1): 76-83.
- Innis, S. M. and D. B. Allardyce (1983). "Possible biotin deficiency in adults receiving long-term total parenteral nutrition." Am J Clin Nutr **37**(2): 185-7.
- Jeffy, B. D., R. B. Chirnomas, et al. (2002). "Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors." Environ Mol Mutagen **39**(2-3): 235-44.

- Joel Griffith Hardman, L. E. L., Alfred G. Gilman (2006). "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics." Mc Graw Hill.
- Kalscheuer, S., X. Zhang, et al. (2008). "Differential expression of microRNAs in early-stage neoplastic transformation in the lungs of F344 rats chronically treated with the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone." Carcinogenesis **29**(12): 2394-9.
- Kawajiri, K. and Y. Fujii-Kuriyama (2007). "Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor." Arch Biochem Biophys **464**(2): 207-12.
- Kim, S. G. and R. F. Novak (1990). "Induction of rat hepatic P450IIE1 (CYP 2E1) by pyridine: evidence for a role of protein synthesis in the absence of transcriptional activation." Biochem Biophys Res Commun **166**(3): 1072-9.
- Kininis, M., B. S. Chen, et al. (2007). "Genomic analyses of transcription factor binding, histone acetylation, and gene expression reveal mechanistically distinct classes of estrogen-regulated promoters." Mol Cell Biol **27**(14): 5090-104.
- Kleeberg, U. and W. Klinger (1982). "Age course and inducibility of dimethylnitrosamine N-demethylation in rat liver." Acta Biol Med Ger **41**(7-8): 675-87.
- Kleeberg, U. and W. Klinger (1982). "Sensitive formaldehyde determination with Nash's reagent and a 'tryptophan reaction'." J Pharmacol Methods **8**(1): 19-31.
- Klein, K. and U. M. Zanger (2013). "Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the "Missing Heritability" Problem." Front Genet **4**: 12.
- Kliwer, S. A., J. M. Lehmann, et al. (1999). "Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse." Science **284**(5415): 757-60.
- Klingenberg, M. (1958). "Pigments of rat liver microsomes." Arch Biochem Biophys **75**(2): 376-86.
- Kodama, S. and M. Negishi "PXR cross-talks with internal and external signals in physiological and pathophysiological responses." Drug Metab Rev.
- Kogl, F., Tonnis, B. (1932). "Über das Bios-Problem. Darstellung von krystallisiertem Biotin aus Elgelb. Z." Physiol. Chem. **242**: 43-73.
- Komagata, S., M. Nakajima, et al. (2009). "Human CYP24 catalyzing the inactivation of calcitriol is post-transcriptionally regulated by miR-125b." Mol Pharmacol **76**(4): 702-9.
- Koop, D. R. and D. J. Tierney (1990). "Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1." Bioessays **12**(9): 429-35.
- Kothapalli, N., G. Camporeale, et al. (2005). "Biological functions of biotinylated histones." J Nutr Biochem **16**(7): 446-8.
- Kotlo, K. U., B. Hesabi, et al. "Implication of microRNAs in atrial natriuretic peptide and nitric oxide signaling in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **301**(4): C929-37.
- Koutsikos, D., C. Fourtounas, et al. (1996). "Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients." Ren Fail **18**(1): 131-7.
- Kudo, K., T. Imamura, et al. (1997). "Death attributed to the toxic interaction of triazolam, amitriptyline and other psychotropic drugs." Forensic Sci Int **86**(1-2): 35-41.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science **294**(5543): 853-8.
- Landthaler, M., A. Yalcin, et al. (2004). "The human Di George syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis." Curr Biol **14**(23): 2162-7.
- Lanska, D. J. (2012). "The discovery of niacin, biotin, and pantothenic acid." Ann Nutr Metab **61**(3): 246-53.

- Larrieta, E., F. Velasco, et al. (2010). "Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes." Eur J Pharmacol **644**(1-3): 263-8.
- Lau, N. C., L. P. Lim, et al. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**(5543): 858-62.
- Laudet, V. a. G., H (2002). "The Nuclear Receptors factsbook." London: Academic Press.
- Lee, R. C. and V. Ambros (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**(5543): 862-4.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-54.
- Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-9.
- Lee, Y., M. Kim, et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23**(20): 4051-60.
- Lee, Y. C., M. G. Hayes, et al. (1970). "Microsomal oxidation of alpha-thiocarboxylic acids to sulfoxides." Biochem Pharmacol **19**(11): 2825-32.
- Li, W., P. A. Harper, et al. (1998). "Regulation of cytochrome P450 enzymes by aryl hydrocarbon receptor in human cells: CYP1A2 expression in the LS180 colon carcinoma cell line after treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or 3-methylcholanthrene." Biochem Pharmacol **56**(5): 599-612.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Lund, E., S. Guttinger, et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-8.
- Ma, Q. (2007). "Aryl hydrocarbon receptor degradation-promoting factor (ADPF) and the control of the xenobiotic response." Mol Interv **7**(3): 133-7.
- Ma, T. H., M. M. Harris, et al. (1984). "Tradescantia-Micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents." Mutat Res **138**(2-3): 157-67.
- Maebashi, M., Y. Makino, et al. (1993). "Therapeutic Evaluation of the Effect of Biotin on Hyperglycemia in Patients with Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus" J Clin Biochem Nutr **14**(211-18).
- Maniataki, E. and Z. Mourelatos (2005). "A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA." Genes Dev **19**(24): 2979-90.
- Manthey, K. C., J. B. Griffin, et al. (2002). "Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells." J Nutr **132**(5): 887-92.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983). "Revised methods for the Salmonella mutagenicity test." Mutat Res **113**(3-4): 173-215.
- Martinez, J. and T. Tuschl (2004). "RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease." Genes Dev **18**(9): 975-80.
- McMahon, R. J. (2002). "Biotin in metabolism and molecular biology." Annu Rev Nutr **22**: 221-39.
- Medical (2011). "Biotin." The Free Medical Dictionary **10**: 10.
- Melo V., C., O. (2004). "Bioquímica de los procesos metabólicos." México, Reverté-UAM.
- Mock, D. M., Shils M.E., Olson J.A., Shike M. (1999). "Biotin In " Modern Nutrition in Health and Disease Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA: 459-466.
- Mohri, T., M. Nakajima, et al. (2010). "Human CYP2E1 is regulated by miR-378." Biochem Pharmacol **79**(7): 1045-52.
- Molnar, F., J. Kublbeck, et al. "An update on the constitutive androstane receptor (CAR)." Drug Metabol Drug Interact **28**(2): 79-93.

- Montellano, O. d. (1995). "Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry " Plenum Press, New York 2nd Ed.
- Nebert, D. W., M. Adesnik, et al. (1987). "The P450 gene superfamily: recommended nomenclature." DNA **6**(1): 1-11.
- Nelson, D. R., L. Koymans, et al. (1996). "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." Pharmacogenetics **6**(1): 1-42.
- Nelson, D. R., D. C. Zeldin, et al. (2004). "Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants." Pharmacogenetics **14**(1): 1-18.
- Novak, R. F. and K. J. Woodcroft (2000). "The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (CYP 2E1): role in toxicology and regulation of expression." Arch Pharm Res **23**(4): 267-82.
- Omura, T. and R. Sato (1964). "The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties." J Biol Chem **239**: 2379-85.
- Pacheco-Alvarez, D., R. S. Solorzano-Vargas, et al. (2002). "Biotin in metabolism and its relationship to human disease." Arch Med Res **33**(5): 439-47.
- Pan, Y. Z., W. Gao, et al. (2009). "MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting." Drug Metab Dispos **37**(10): 2112-7.
- Paul, P. K., P. N. Duttagupta, et al. (1973). "Effects of an acute dose of biotin on the reproductive organs of the female rat." Curr Sci **42**(6): 206-8.
- Paul, P. K., P. N. Duttagupta, et al. (1973). "Letter: Antifertility effect of biotin and its amelioration by estrogen in the female rat." Curr Sci **42**(17): 613-5.
- Raffalli-Mathieu, F., T. Glisovic, et al. (2002). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and regulation of the xenobiotic-inducible gene Cyp2a5." Mol Pharmacol **61**(4): 795-9.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, et al. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature **403**(6772): 901-6.
- Revilla-Monsalve, C., I. Zendejas-Ruiz, et al. (2006). "Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia." Biomed Pharmacother **60**(4): 182-5.
- Roberts, B. J., B. J. Song, et al. (1995). "Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1." J Biol Chem **270**(50): 29632-5.
- Rodriguez-Fuentes, N., I. Lopez-Rosas, et al. (2007). "Biotin deficiency affects both synthesis and degradation of pyruvate carboxylase in rat primary hepatocyte cultures." Mol Genet Metab **92**(3): 222-8.
- Rodriguez-Melendez, R., G. Camporeale, et al. (2003). "Interleukin-2 receptor-gamma - dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells." Am J Physiol Cell Physiol **284**(2): C415-21.
- Rodriguez-Melendez, R., S. Cano, et al. (2001). "Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats." J Nutr **131**(7): 1909-13.
- Rodriguez-Melendez, R., J. B. Griffin, et al. (2005). "High-throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells." J Nutr **135**(7): 1659-66.
- Rodriguez-Melendez, R., J. B. Griffin, et al. (2004). "Biotin supplementation increases expression of the cytochrome P450 1B1 gene in Jurkat cells, increasing the occurrence of single-stranded DNA breaks." J Nutr **134**(9): 2222-8.

- Rodriguez-Melendez, R. and J. Zempleni (2003). "Regulation of gene expression by biotin (review)." J Nutr Biochem **14**(12): 680-90.
- Romero-Navarro, G., G. Cabrera-Valladares, et al. (1999). "Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats." Endocrinology **140**(10): 4595-600.
- Ruby, J. G., C. Jan, et al. (2006). "Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*." Cell **127**(6): 1193-207.
- Ruvkun, G. (2001). "Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world." Science **294**(5543): 797-9.
- Ryan, D. E., L. Ramanathan, et al. (1985). "Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid." J Biol Chem **260**(10): 6385-93.
- Said, H. M. "Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects." Subcell Biochem **56**: 1-19.
- Said, H. M. (2009). "Cell and molecular aspects of human intestinal biotin absorption." J Nutr **139**(1): 158-62.
- Said, H. M. (2012). "Biotin: Biochemical, Physiological and Clinical Aspects." In Water Soluble Vitamins. Clinical Research and Future Applications (ed. Stanger, O.) (Springer, London, UK): 1-20.
- Savas, U., K. J. Griffin, et al. (1999). "Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: An expanded role for nuclear hormone receptors." Mol Pharmacol **56**(5): 851-7.
- Scheerger, S. B. and J. Zempleni (2003). "Expression of oncogenes depends on biotin in human small cell lung cancer cells NCI-H69." Int J Vitam Nutr Res **73**(6): 461-7.
- Schmidt, J. V. and C. A. Bradfield (1996). "Ah receptor signaling pathways." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 55-89.
- Shou, M., K. W. Krausz, et al. (1996). "Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene by human recombinant cytochromes P450, lung and liver microsomes." Carcinogenesis **17**(11): 2429-33.
- Singer, G. M. and J. Geohas (2006). "The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial." Diabetes Technol Ther **8**(6): 636-43.
- Solorzano-Vargas, R. S., D. Pacheco-Alvarez, et al. (2002). "Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5325-30.
- Song, B. J., T. Matsunaga, et al. (1987). "Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat." Mol Endocrinol **1**(8): 542-7.
- Spence, J. T. and A. P. Koudelka (1984). "Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes." J Biol Chem **259**(10): 6393-6.
- SRI-, I. (1979). "Microbial mutagenesis testing of substances compound report:F76-041, D-Biotin." **NTIS Report No. PB89-169072**: 120,1.
- Standart, N. and R. J. Jackson (2007). "MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation." Genes Dev **21**(16): 1975-82.
- Stanley, J. S., J. B. Griffin, et al. (2001). "Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation." Eur J Biochem **268**(20): 5424-9.

- Stockert, R. J., E. Paietta, et al. (1992). "Posttranscriptional regulation of the asialoglycoprotein receptor by cGMP." J Biol Chem **267**(1): 56-9.
- Stockert, R. J. and Q. Ren (1997). "Cytoplasmic protein mRNA interaction mediates cGMP-modulated translational control of the asialoglycoprotein receptor." J Biol Chem **272**(14): 9161-5.
- Su, T. and X. Ding (2004). "Regulation of the cytochrome P450 2A genes." Toxicol Appl Pharmacol **199**(3): 285-94.
- Sugita, Y., H. Shirakawa, et al. (2008). "Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats." Biosci Biotechnol Biochem **72**(5): 1290-8.
- Suormala, T., B. Fowler, et al. (1997). "Five patients with a biotin-responsive defect in holocarboxylase formation: evaluation of responsiveness to biotin therapy in vivo and comparative biochemical studies in vitro." Pediatr Res **41**(5): 666-73.
- Takagi, S., M. Nakajima, et al. (2008). "Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4." J Biol Chem **283**(15): 9674-80.
- Tian, Y. (2013). "Epigenetic regulation of pregnane X receptor activity." Drug Metab Rev **45**(2): 166-72.
- Tirona, R. G., W. Lee, et al. (2003). "The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4." Nat Med **9**(2): 220-4.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tsuchiya, Y., M. Nakajima, et al. (2006). "MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1." Cancer Res **66**(18): 9090-8.
- Vesely, D. L. (1982). "Biotin enhances guanylate cyclase activity." Science **216**(4552): 1329-30.
- Vilches-Flores, A., A. R. Tovar, et al. (2009). "Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets." J Nutr Biochem **21**(7): 606-12.
- Wang, Y., Y. Li, et al. (2006). "Investigations into the analysis and modeling of the cytochrome P450 cycle." J Phys Chem B **110**(20): 10139-43.
- Watanabe, K., K. Sakurai, et al. "Dual roles of nuclear receptor liver X receptor alpha (LXRalpha) in the CYP3A4 expression in human hepatocytes as a positive and negative regulator." Biochem Pharmacol **86**(3): 428-436.
- Watanabe, T. (1996). "Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice." Experientia **52**(2): 149-54.
- Watanabe, T., K. Dakshinamurti, et al. (1995). "Biotin influences palatal development of mouse embryos in organ culture." J Nutr **125**(8): 2114-21.
- Watanabe, T. and A. Endo (1990). "Teratogenic effects of maternal biotin deficiency on mouse embryos examined at midgestation." Teratology **42**(3): 295-300.
- Watkins, R. E., G. B. Wisely, et al. (2001). "The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity." Science **292**(5525): 2329-33.
- Whitlock, J. P., Jr. (1999). "Induction of cytochrome P4501A1." Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**: 103-25.
- Wiedmann, S., R. Rodriguez-Melendez, et al. (2004). "Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells." J Nutr Biochem **15**(7): 433-9.
- Wightman, B., I. Ha, et al. (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." Cell **75**(5): 855-62.

- Williams, P. A., J. Cosme, et al. (2000). "Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity." Mol Cell **5**(1): 121-31.
- Xiu-Fen Yang, N.-P. W. (2008). "Small Interfering RNA and MicroRNA: Are Cytochrome P-450 Enzymes Their Targets?" Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics **8**(8): 31-35.
- Yates, A. A., S. A. Schlicker, et al. (1998). "Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline." J Am Diet Assoc **98**(6): 699-706.
- Zangar, R. C., D. L. Springer, et al. (1993). "Alterations in cytochrome P-450 levels in adult rats following neonatal exposure to xenobiotics." J Toxicol Environ Health **38**(1): 43-55.
- Zempleni, J. (2005). "Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin." Annu Rev Nutr **25**: 175-96.
- Zempleni, J., D. B. McCormick, et al. (1997). "Identification of biotin sulfone, bisnorbiotin methyl ketone, and tetranorbiotin-I-sulfoxide in human urine." Am J Clin Nutr **65**(2): 508-11.
- Zempleni, J. and D. M. Mock (1999). "Biotin biochemistry and human requirements." J Nutr Biochem **10**(3): 128-38.
- Zempleni, J., S. S. Wijeratne, et al. (2009). "Biotin." Biofactors **35**(1): 36-46.
- Zhou, S. F., B. Wang, et al. "Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2." Drug Metab Rev **42**(2): 268-354.