



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN A 5'-AZA-2'-DESOXICITIDINA E HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE CYP1A1 Y PROTEÍNAS MODIFICADORAS DE PROCESOS EPIGENÉTICOS EN MODELOS HEPÁTICOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

SITLALI DEL ROSARIO OLGUÍN REYES

DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
Instituto de Investigaciones Biomédicas

DR. LUIS ANTONIO MENDOZA SIERRA
Instituto de Investigaciones Biomédicas

DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México. Abril, 2019



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.

Un estado que no educa y capacita a las mujeres es como una persona que sólo entrena a uno de sus brazos.

Modificado de El mundo de Sofia de Jostein Gaarder

Agradezco la realización y finalización de este trabajo

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por impulsora de la investigación básica en México, en cuyas instalaciones y con su apoyo económico se desarrolló el presente trabajo doctoral.

A la división de Posgrado de Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química y a la plantilla de investigadores catedráticos que lo conforman, por realizar el trabajo administrativo y poner a nuestro alcance los conocimientos teóricos básicos fundamentales para el desarrollo del presente trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, sede del desarrollo del trabajo experimental y teórico de la presente investigación doctoral.

Al Dr. J. Javier Espinosa Aguirre, por aceptarme en su grupo de investigación, guiarme en mi capacitación, ser partícipe y aconsejarme en la realización experimental y escrita del presente trabajo.

A la Bióloga Sandra Luz Hernández Ojeda, por sus enseñanzas técnicas y metodológicas en la realización del proyecto de investigación que se ve realizado en este escrito.

A la Dra. Marina Macías por su amable colaboración durante los inicios del proyecto de investigación, en particular por su amable donación de células y reactivos.

Al CONACyT por proporcionarme apoyo económico y con ello permitir enfocarme únicamente en el desarrollo del presente trabajo doctoral.

Al PAPIIT No. 206212 proporcionado por DGAPA-UNAM por brindar el apoyo económico para que el proyecto de investigación fuera posible.

Al PAEP por el apoyo económico proporcionado para la presentación de este trabajo en congresos nacionales e internacionales.

A la fundación Miguel Alemán por proporcionar el apoyo económico para que el proyecto de investigación fuera posible.

Al comité asignado para mi examen tutorial ampliado y al jurado asignado para mi examen de grado por sus aportaciones en la mejora de este escrito.

“La vida es a la vez triste y solemne. Somos guiados a un mundo maravilloso, nos encontramos aquí, nos saludamos – y deambulamos juntos por un breve momento. Después nos perdemos y desaparecemos tan repentina e irrazonablemente como cuando llegamos.”
El mundo de Sofía de Jostein Gaarder

Dedico este trabajo

A mi familia. Mis padres, por su amor incondicional y por verme siempre de la misma forma; mis hermanas y hermano, cuñado y cuñada, sobrina y sobrinos, por su amor, sus consejos y apoyo incondicional.

A la familia Salvador Reyes, por compartir su amor y brindarme siempre su apoyo.

A mis familias Olgúin y Reyes, por ser descanso y paz en cualquier momento. Haré especial mención a mis tías Inés, Margarita, Fabiana, Rosa, Francisca, y Salomé, ejemplos de fuerza y entereza, siento gran respeto por sus vidas y enseñanzas.

A mis amigos, los que estuvieron, están y estarán, por compartir grandes momentos conmigo. A Mariana, Aydé, Andrea, Servando, Jorge, Rogelio, Daniel, Teresita, Marisol, Rodrigo, Jaime, y Mauricio, gracias.

A los integrantes del laboratorio C206 del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en particular a la Bióloga Sandra Luz Hernández Ojeda por guiarme, enseñarme y aconsejarme en mi conducir dentro del laboratorio de investigación y en la vida.

A los alumnos integrantes, técnicos académicos, investigadores principales, laboratoristas y personal de limpieza de los laboratorios del segundo piso del edificio C y al personal administrativo de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas nueva sede, por ser siempre amables colaboradores y permitir el correcto avance de nuestro trabajo en el laboratorio C206, por brindarme siempre su apoyo, gracias.

Al Dr. J. Javier Espinosa Aguirre, por guiarme, aconsejarme y permitirme ser y hacer en la investigación biomédica básica.

1. Índice de Contenido

	página
1. Índice de Contenido	1
1.1. Índice de Figuras y Tablas.....	3
1.2. Abreviaturas I	4
2. Abstract	6
2.1. Resumen.....	8
3. Introducción	10
3.1. Citocromo P450.....	11
3.1.1. Familia de citocromo P4501 (CYP1)	19
3.2. Epigenética	26
3.2.1. DNA Metiltransferasas	30
3.2.1.1. Regulación de la expresión y actividad de las DNMTs	34
3.2.1.2. Metilación del DNA	35
3.2.2. Desacetilasas de histonas.....	39
3.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos: Sustratos de CYP1A1	45
3.3.1. Benzofluoreno	48
3.3.2. Benzo[a]pireno	49
3.3.3. 3-Metilcolantreno	52
3.3.4. Dimetilbenz[a]antraceno.....	55
4. Antecedentes: vínculo HAPs, CYP1A1 y epigenética.....	59
5. Planteamiento del problema	67
6. Hipótesis.....	68
7. Objetivo	68
8. Diseño experimental	69
9. Resultados	71
9.1. Caracterización del cultivo celular, tiempos de exposición y concentraciones de HAPs y 5AzadC 71	
9.2. 5AzadC y cuatro distintos HAPs modifican la expresión de isoformas de CYP	76
9.3. Los niveles proteicos de DNMT1 y DNMT3b son modificados diferencialmente por cuatro distintos HAPs.....	78
9.4. La exposición subaguda a cuatro distintos HAPs no modifica el nivel proteico de tres HDACs clase I 80	

9.4.1.	Los niveles proteicos de HDAC4 y SIRT1 son incrementados ante la exposición subaguda a HAPs	80
9.5.	La exposición subaguda a BaP conduce a la hipometilación del DNA global de las células C9	83
9.6.	Efecto de la exposición subaguda a 5AzadC y BaP sobre CYP1A de hígado de rata	85
9.6.1.	La exposición subaguda vía intraperitoneal a 5AzadC-BaP no modifica los niveles de RNA ni proteicos de CYP1A1/2 de hígado de ratas	85
9.7.	Efecto de la exposición subaguda vía intraperitoneal de 5AzadC-BaP sobre CYP1A1/2 de hígado de ratones	88
10.	Discusión	90
10.1.	Modulación de CYP1A1 por 5AzadC en modelos hepáticos	92
10.1.1.	La expresión transcripcional de <i>rCYP1A1</i> es alterada por un estado de metilación del DNA disminuido en células epiteliales C9	92
10.1.2.	La expresión transcripcional de <i>rCYP1A1</i> no es modificada por un estado de hipometilación del DNA hígado de rata	93
10.1.3.	La expresión transcripcional de <i>rCYP1A1</i> no es modificada por un estado de metilación del DNA disminuido hígado de ratón	94
10.2.	Alteración del perfil proteico de modificadores epigenéticos en células C9 expuestas a HAPs durante 48 h	95
10.2.1.	Disparidad en los cambios obtenidos en la concentración proteica de DNMTs y el estado de metilación del DNA por la exposición subaguda a HAPs en células epiteliales C9	95
10.2.2.	Cambio en la concentración proteica de HDACs clase II y III por la exposición subaguda a HAPs en células epiteliales C9	96
11.	Conclusiones	98
12.	Perspectivas	99
13.	Materiales y Métodos	100
14.	Referencias	104
15.	Artículo publicado: "Sub-acute exposure effect of selected polycyclic aromatic hydrocarbons on protein levels of epigenetic modifiers in non-cancerous hepatic model"	122

1.1. Índice de Figuras y Tablas

	página
Figura 1. Inducción del metabolismo de xenobióticos.....	13
Figura 2. Ciclo catalítico de citocromo P450.....	17
Figura 3. Contribución de principales CYP en el metabolismo de fármacos y factores que afectan la variabilidad de respuesta.....	18
Figura 4. Localización cromosómica de CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 en ser humano, rata y ratón.....	19
Figura 5. Niveles de RNA y proteínas de CYP1 en distintos órganos humanos.....	20
Figura 6. Esquema proteico tridimensional de CYP1A1.....	22
Figura 7. Vías de inducción e inhibición de la expresión de CYP1A1.....	24
Figura 8. Esquema del empaquetamiento del DNA en una estructura condensada de cromatina.....	29
Figura 9. Características y mecanismos de acción de DNMTs.....	31
Figura 10. Biotransformación de 5-aza-2'-desoxicitidina y su progresión a la inhibición de DNMTs.....	38
Figura 11. Dominios estructurales y funcionales de desacetilasas de histonas humanas.....	42
Figura 12. Reacciones catalíticas llevadas a cabo por desacetilasas de histonas.....	44
Figura 13. Estructura de BF.....	48
Figura 14. Mapa metabólico de BaP.....	53
Figura 15. Mapa metabólico de 3MC.....	56
Figura 16. Mapa metabólico de DMBA.....	58
Figura 17. Región regulatoria de CYP1A1 en rata, ratón y del ser humano.....	60
Figura 18. Diseño experimental.....	69
<i>Figura 19. Efecto de distintas concentraciones de HAPs sobre la viabilidad celular del cultivo de C9.....</i>	<i>72</i>
Figura 20. Efecto del co-tratamiento 5AzadC-BaP sobre la viabilidad de cultivos de células C9.....	73
Figura 21. Efecto hipometilante de 5AzadC sobre el DNA de cultivos de células C9.....	75
Figura 22. Efecto de la hipometilación del DNA global sobre la expresión de enzimas de la familia CYP1 y CYP2 en células C9.....	76
Figura 23. Efecto de la hipometilación del DNA sobre la expresión inducida de rCYP1A1 por cuatro distintos HAPs.....	77
Figura 24. Efecto de cuatro HAPs sobre el nivel de proteína de DNMTs en células C9.....	79
Figura 25. Efecto de HAPs sobre los niveles proteicos de HDACs clase I.....	81
Figura 26. Efecto de cuatro HAPa sobre los niveles proteicos de HDACs clase II y III.....	82
Figura 27. Efecto de BaP sobre el nivel de metilación del DNA de células C9 sin tratar o pretratadas con 5AzadC.....	84
Figura 28. Efecto del inhibidor de DNMTs 5AzadC sobre la inducción de CYP1A1 por BaP en hígado ratas.....	86
Figura 29. Efecto del inhibidor de DNMTs sobre la inducción de CYP1A2 de hígado de rata por BaP.....	87
Figura 30. Efecto de 5AzadC sobre la inducción de CYP1A1 de ratón por BaP.....	89

Tabla 1. Tipos de citocromos y sus donadores de electrones.....	15
Tabla 2. Potencias de unión a AHR, inducción de CYP1 y actividad EROD de HAPs.....	48
Tabla 3. Efecto de la inhibición de DNMTs y HDACs sobre CYP1A1.	61
Tabla 4. Efecto de HAPs sobre DNMTs, HDACs y estado de metilación del DNA celular.....	64
Tabla 5. Perfil proteico de CYP1A1 y modificadores epigenéticos en células C9 después de su exposición subaguda a cuatro HAPs.....	98

1.2. Abreviaturas I

3 – metilcolantreno	3MC
5 – Aza-2-desoxicitidina	5AzadC
Acetil – coenzima A sintetasa	AceCS2
Receptor de aril hidrocarburos	AHR
Complejo AHR-Traslocador del AHR	AHRC
Aldo ceto reductasa	AKR
Leucemia linfoblástica aguda	ALL
Proteína antirepresora 1	ANT
Aldehído oxidasa	AO
Endonucleasa apurínica-apirimídica 1	APE1/Ref1
Ataxia telangiectasia mutado – cinasas de serina/treonina	ATM
Ataxia telangiectasia y relacionada a Rad3	ATR
Benzo[a]pireno	BaP
Benzofluoreno	BF
Proteína de cáncer de mama 1	BRCA1
Células epiteliales de hígado de rata clona 9	C9
Catecol – O – transferasa	COMT
Correpressor del factor de transcripción silenciador del elemento represor 1	CoREST
Proteína de biosíntesis de polisacárido capsular	CPSI
Linfoma cutáneo de células T	CTCL
Citocromo P450	CYP
7,12 – Dimetilbenz[a]antraceno	DMBA
DNA metiltransferasa	DNMT
Epóxido hidrolasa	EPHX
Proteína caja del frente de horquilla	FOXO
Gen inducible por arresto y daño al DNA 153	GADD153
Factor de transcripción eritroide	GATA
Dominio N-terminal de glutamato deshidrogenasa	GHD1
Glutación transferasa	GST

Hidrocarburos aromáticos policíclicos	HAPs
Desacetilasa de histonas	HDAC
Factor inducible de hipoxia 1	Hif1 α
Linfoma de Hodgkin	HL
Proteína de choque térmico 90	HSP90
Familia de inhibición de crecimiento	ING1a
Subunidad de la helicasa 2 dependiente de ATP	Ku70
Proteína de determinación de mioblasto 1	MyoD
Fosforibosiltransferasa de nicotinamida	Nampt
Factor nuclear kappa B	NFkB
Adeniltransferasa de nicotinamida mononucleótido	Nmnat
Complejo desacetilasa y remodelador de nucleosomas	NuRD
Inhibidor 1 de ciclina dependiente de cinasa	P21
Proteína 53 relacionada a la transformación o proteína tumoral 53	P53
Factor asociado ap300/CBP	PCAF
Antígeno nuclear de proteliferación celular	PCNA
Complejo represor policomb	PCR2
Receptor proliferador de peroxisomas	PPAR
Subunidad del factor de replicación C	RFC
Sirtuina	SIRT
Madres contra el homólogo 6 decapentaplégico	SMAD6
Mediador de silenciamiento del receptor de ácido retinoico y hormona tiroidea	SMRT
Sulfonato transferasa	SULT
DNA timidina glicosilasa	TDG
Enzima de traslocación diez once	TET
Topoisomerasa II	TopII
UDP – glucuronosil transferasa	UDPGT / UGT

2. Abstract

The exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), either environmental or deliberate, are part of human daily life. This exposure constitutes a chronic toxicity which leads to a wide range of diseases, mainly cardiovascular, cerebral, pulmonary, and cancer diseases. Metabolites produced because of biotransformation of PAH compounds produce changes in cellular environment resulting in DNA damage, DNA repair, oxidative stress, apoptosis, or cellular arrest.

Changes in protein expression may also occur, like the proteins involved in the biotransformation of these compounds, as well as other proteins which are part of different cellular pathways. Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) is one of the most affected proteins by PAH exposure because the regulatory region of the gene has several binding sites for the complex PAH-aryl hydrocarbon receptor (AHR), a cytoplasmic receptor involved in the enhancement of expression of several enzymes required for xenobiotic metabolism. There is a CG dinucleotide at the middle of the binding sequence of AHR, which can be methylated by a DNA methyltransferase (DNMT) enzyme, thus showing a potential for *CYP1A1* epigenetic regulation. On the other hand, the exposure to PAH causes DNA damage and mutations, but the former seems to be an ultimate event in PAH toxicity. We wonder if changes in the state of DNA methylation would affect the rat *CYP1A1* basal and induced expression, which in turn could affect the biotransformation and toxicity of ligands of the protein CYP1A1, such as PAH.

Historically in the study of carcinogenesis, three stages had been recognized: initiation, promotion and progression, from which initiation was thought as an irreversible step. Recently, new cellular stages have been proposed including epigenetic disruption of progenitor cells, mutagenic initiation mutation, and genetic and epigenetic plasticity. The epigenetic disruption of progenitor cells would be managed by epigenetic modifiers, which modify the epigenome directly; epigenetic mediators, which are genes or proteins targets for epigenetic modifiers; and epigenetic modulators, which are genes acting upstream of the modifiers and mediators and could be part of signaling and metabolic pathways. We wondered if a semiacute exposure of noncancerous cells to mutagenic and carcinogenic compounds would change the protein level of epigenetic modifiers.

The purpose of this thesis was to determine if rat *CYP1A1* gene is regulated by epigenetic mechanisms such as DNA methylation and if this affects its basal expression as well as its inducible expression by PAH. Also, our intent was to determine if normal liver cells exposed to PAH will exhibit changes at the protein level of epigenetic modifiers such as DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, histone deacetyltransferase 1 (HDAC1), HDAC2,

HDAC3, HDAC4, and SIRT1, and determine if the epigenetic modifiers protein profile is the same among these common PAH carcinogens.

To achieve our objectives, we worked with the inhibitor of DNMTs, 5-aza-2-deoxycytidine (5AzadC), for DNA methylation disruption and with the PAH compounds benzofluorene (BF), benzo[a]pyrene (BaP), 3-methylcholanthrene (3MC), and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) for induction of CYP1 proteins as well as for alteration of epigenetic modifiers in the normal rat liver cell line C9.

We found that even when in the *in vitro* model of rat liver normal cell line C9 5AzadC increase the *CYP1A1* expression induced by PAH, it was not observed in the *in vivo* model of rat liver exposed to BaP. We also tested the effect of 5AzadC over the mouse *CYP1A1* expression induced by BaP and no change was obtained. From *in vitro* studies, we found that C9 cell exposure to PAH conducted to changes in protein level of epigenetic modifiers such as DNMT1, DNMT3b, HDAC4 and SIRT1, as wells as caused a global cell DNA hypomethylation state.

Our results suggest that DNA hypomethylation induced after the exposure to PAH is not related with DNMTs protein levels. We suggest that this DNA hypomethylating effect of PAH could result from the DNA damage induced by each PAH, and we cannot rule out the possibility that the protein changes in epigenetic modifiers also could result from DNA damage occurring in C9 cells by PAH. Finally, *CYP1A1* expression will have in some extent dependency on cell proliferation rate because 5AzadC enhanced its induced expression only in the *in vitro studies* with hepatocyte cell culture but not in the *in vivo studies* with rat liver tissue.

2.1. Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes ambientales a los cuales estamos expuestos diariamente, causando toxicidad crónica. Dicha toxicidad está relacionada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cerebrales, pulmonares, así como cáncer. Los metabolitos producidos ante la biotransformación de los HAPs promueven cambios en el ambiente celular que conducen a estrés oxidante, apoptosis, daño al DNA, reparación del DNA, arresto celular, y mutaciones.

La exposición a HAPs conduce a cambios en la expresión de diversas proteínas, entre ellas, aquellas involucradas en el metabolismo de estos HAPs. Citocromo P450 1A1 (CYP1A1) es una de las proteínas fuertemente inducida por los HAPs a través de su unión al receptor de aril hidrocarburos (AHR) y su posterior interacción con los sitios de unión de este receptor en la región regulatoria del gen de CYP1A1. La secuencia de unión de AHR contiene un dinucleótido CG, el cual es susceptible a ser metilado por DNA metiltransferasas (DNMTs), lo cual abre la posibilidad de que *CYP1A1* sea regulado epigenéticamente. Por otro lado, el daño al DNA inducido por la exposición a HAPs conduce al establecimiento de mutaciones, un evento tardío en la toxicidad generada por estos compuestos.

En el estudio del desarrollo del cáncer se había establecido que este proceso se da en tres pasos: iniciación, promoción y progresión, la iniciación está basada en el establecimiento de mutaciones en genes clave y por tanto un evento irreversible. Esta teoría ha cambiado recientemente a una nueva teoría de tres pasos que incluye: disrupción epigenética de células progenitoras, establecimiento de la mutación iniciadora, y plasticidad genética y epigenética. La disrupción epigenética de las células progenitoras está dada por modificadores epigenéticos, los cuales ejercen su acción bajo interacción directa con el epigenoma; mediadores epigenéticos, los cuales son los genes o proteínas blanco de los modificadores epigenéticos; y los moduladores epigenéticos, los cuales son genes que actúan sobre los modificadores o moduladores en vías metabólicas o de señalización. Dentro de estas proteínas involucradas en la disrupción de células progenitoras, estamos interesados en los modificadores epigenéticos que pueden verse alterados y jugar un papel importante en la toxicidad por HAPs.

El presente trabajo tuvo dos objetivos, el primero determinar si agentes químicos como HAPs son capaces de alterar los niveles proteicos de modificadores epigenéticos tales como DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, desacetilasa de histona 1 (HDAC1), HDAC2, HDAC3, HDAC3, y SIRT1, así como si los HAPs conducen al mismo patrón de cambios en los modificadores epigenéticos. El segundo, fue determinar la alteración de la expresión basal e inducida de *CYP1A1* en un estado de hipometilación celular de hígado de rata sano.

Para lograr los objetivos planteados trabajamos con el inhibidor de DNMTs, 5-aza-2-desoxicitidina, para la disrupción de la metilación del DNA, y con cuatro compuestos prototipo del grupo de HAPs, benzo[fluoreno] (BF), 3-metilcolantreno (3MC), benzo[a]pireno (BaP), y 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA) para la inducción de proteínas de la familia de CYP1, así como para la determinación de la alteración proteica de modificadores epigenéticos.

En este estudio encontramos que aun cuando en el modelo *in vitro* de células de epiteliales C9 de hígado de rata la expresión inducida de CYP1A1 por HAPs es incrementada por 5AzadC, estos cambios no se presentan en el modelo *in vivo* de rata ni en ratón. También observamos que la exposición de la línea celular C9 a HAPs permite cambios en el nivel de proteína de los siguientes modificadores epigenéticos: DNMT1, DNMT3b, HDAC4 y SIRT1, así como también causa disminución del nivel de metilación de DNA total en las células.

En conclusión, el estado de hipometilación del DNA inducida por HAPs parece no estar relacionada con los niveles proteicos de DNMTs, y es el daño al DNA el que parece estar jugando un papel fundamental en los cambios de niveles proteicos de los modificadores epigenéticos, así como de los cambios observado en el estado de metilación del DNA. Por otro lado, la expresión de *CYP1A1* podría tener cierta dependencia en la velocidad de proliferación celular debido a que el inhibidor 5AzadC incrementa su expresión inducida por HAPs únicamente en el cultivo celular proveniente de hígado y no en el tejido hepático de ratas tratadas con dicho inhibidor y con BaP.

“Más sabia es Ella que sabe que no sabe.”

El mundo de Sofía de Jostein Gaarder

3. Introducción

Los HAPs son parte del conocido material particulado (PM, del inglés *particulate matter*) de la contaminación del aire. La exposición a estos compuestos tóxicos no sólo se da a través del aire sino también a través de alimentos contaminados con residuos de combustión de material orgánico, exposición ocupacional, y hábitos como fumar [1,2].

En 1775, Percival Pott correlacionó la exposición ocupacional de los limpiadores de chimeneas con el desarrollo de cáncer de escroto en estos trabajadores. La causa del mal fue tan evidente que la sugerencia de prevención se hizo pronta y efectiva, quitarse el exceso de hollín lavándose bien las manos y bañándose adecuadamente. El hollín remanente en las manos de los trabajadores era la causa, dicho hollín está compuesto principalmente por HAPs [3].

Así como con el hollín y cáncer de escroto, la inhalación de humo de cigarro fue catalogada como agente causal de adenocarcinoma pulmonar, cuyos componentes tóxicos principales son los HAPs, siendo el BaP el hidrocarburo representativo de este grupo de compuestos [4].

La importancia del estudio de los mecanismos de acción y efectos de contaminantes ambientales con capacidades carcinogénicas radica en que se hace posible la estimación de riesgos, prevención, regulación de su exposición, e inclusive el diseño de estrategias para la posible reversión del efecto de estos contaminantes. Los HAPs son compuestos promutagénicos y procarcinogénicos, pues necesitan ser biotransformados para llevar a cabo su efecto tóxico. Dicho efecto está caracterizado por el incremento en formación de enlaces covalentes con el DNA, así como la subsecuente generación de mutaciones. La biotransformación de los HAPs es el proceso clave para la formación de los metabolitos tóxicos, de tal manera que la alteración de los niveles proteicos de estas las enzimas involucradas en este proceso tendrá como resultado mayor o menor generación de compuestos mutagénicos, los cuales son clave en el éxito del establecimiento de mutaciones y a largo plazo del establecimiento de células tumorales [4,5].

De las enzimas involucradas en el proceso de biotransformación de los HAPs resaltan las pertenecientes a la familia de citocromo P450, pues la catálisis que llevan a cabo da lugar a la formación de compuestos oxidados que siguen el proceso metabólico hacia compuestos más tóxicos y reactivos con el DNA.

“Cuando te das cuenta de que hay algo que no entiendes, entonces generalmente estás en el camino correcto al entendimiento de toda clase de cosas.”

El mundo de Sofía de Jostein Gaarder

3.1. Citocromo P450

Escribir acerca de citocromo P450 (CYP) necesita forzosamente una introducción al estudio de la toxicología, ya que los inicios en la investigación de esta molécula están históricamente vinculados con el conocimiento del metabolismo de agentes químicos en los sistemas vivos, tanto así que se le pensó con la función exclusiva de biotransformar compuestos externos que ingresan a los organismos vivos para su posterior eliminación y así evitar efectos tóxicos.

La toxicología es la ciencia que estudia los efectos adversos de agentes químicos, físicos y biológicos sobre los organismos vivos. A aquellos agentes químicos externos a un organismo y que no son parte de las rutas metabólicas del sistema biológico se les denomina xenobióticos [6]. Para que los compuestos químicos lleven a cabo su efecto tóxico o terapéutico, dependen de algunos aspectos como el tipo y frecuencia de exposición, absorción, distribución, biotransformación, interacción con macromoléculas y eliminación. En su conjunto, a estos procesos se les denomina toxicocinética y toxicodinámica. Estrictamente la toxicocinética se define como el estudio cuantitativo del movimiento de un agente químico exógeno desde su entrada al organismo, su distribución a través de los órganos y tejidos vía la circulación sanguínea, y su disposición final por medio de la biotransformación y excreción. La toxicodinámica se refiere a los efectos moleculares, bioquímicos, y fisiológicos de los agentes tóxicos o de sus metabolitos en sistemas biológicos. Estos efectos serán el resultado de la interacción de una dosis biológicamente efectiva de la forma tóxica del agente químico con un blanco molecular.

El proceso de biotransformación de xenobióticos puede ocurrir en todos los órganos, sin embargo, el hígado es el órgano que presenta mayor participación en la biotransformación de xenobióticos. Este proceso de biotransformación en el que participa CYP, entre otras enzimas que catalizan reacciones de oxido-reducción e hidrólisis, es denominado fase I del metabolismo de xenobióticos. Algunos de los metabolitos resultantes

serán capaces de unirse con otras enzimas para una segunda biotransformación, lo cual les conferirá mayor hidrosolubilidad, pues se les adiciona moléculas hidrosolubles como el ácido glucurónico, sulfonato, aminoácidos, glutatión, etc. Este segundo proceso es llamado conjugación o fase II. Finalmente, la fase III es referida al transporte de los metabolitos para su excreción ya sea por bilis u orina. Las tres fases están interrelacionadas para que el xenobiótico produzca su efecto tóxico, **Figura 1**.

El CYP tiene un papel protagónico en la biotransformación de los xenobióticos promutágenos y procarcinógenos, debido a que su acción sobre estos agentes dará lugar a la formación de compuestos electrofílicos capaces de reaccionar con macromoléculas celulares como proteínas, lípidos y DNA, causando toxicidad al organismo [7].

La reacción entre metabolitos electrofílicos y DNA genera enlaces covalentes denominados aductos, los cuales son removidos mediante mecanismos de reparación del DNA, ya sea de forma directa o a través de la eliminación de la base nitrogenada completa. La continua formación de aductos mediante exposición crónica a agentes mutagénicos incrementa el riesgo de causar mutaciones, las cuales de llevarse a cabo en genes claves para la homeostasis entre muerte y proliferación celular darán pauta al inicio del proceso de carcinogénesis.

Las estrategias de quimiopreención tendrán como enfoque revertir el daño en la medida de lo posible, mientras que el proceso irreversible puede ser disminuido para aminorar los daños o hacer que su manifestación fisiológica se retrase el mayor tiempo posible. En tales esfuerzos, las estrategias van desde la búsqueda de inhibidores de CYP hasta la modificación de su expresión génica.

La expresión de los citocromos puede ser promovida por agentes ambientales tóxicos al interactuar directamente con receptores nucleares capaces de unirse a secuencias de regulación génicas para promover la expresión de un gen o reprimirla, **Figura 1**; aunque también existe la posibilidad de modular la expresión de dichos genes bajo otros mecanismos que no involucran directamente a factores de transcripción o receptores nucleares. Lo anterior abre ampliamente la posibilidad de que los factores ambientales y estilo de vida afecten la expresión de los genes mediante mecanismos diversos, por tanto, también permite analizar y proponer varias vías para afrontar el origen de un mismo problema, la bioactivación de agentes promutagénicos y procarcinogénicos.

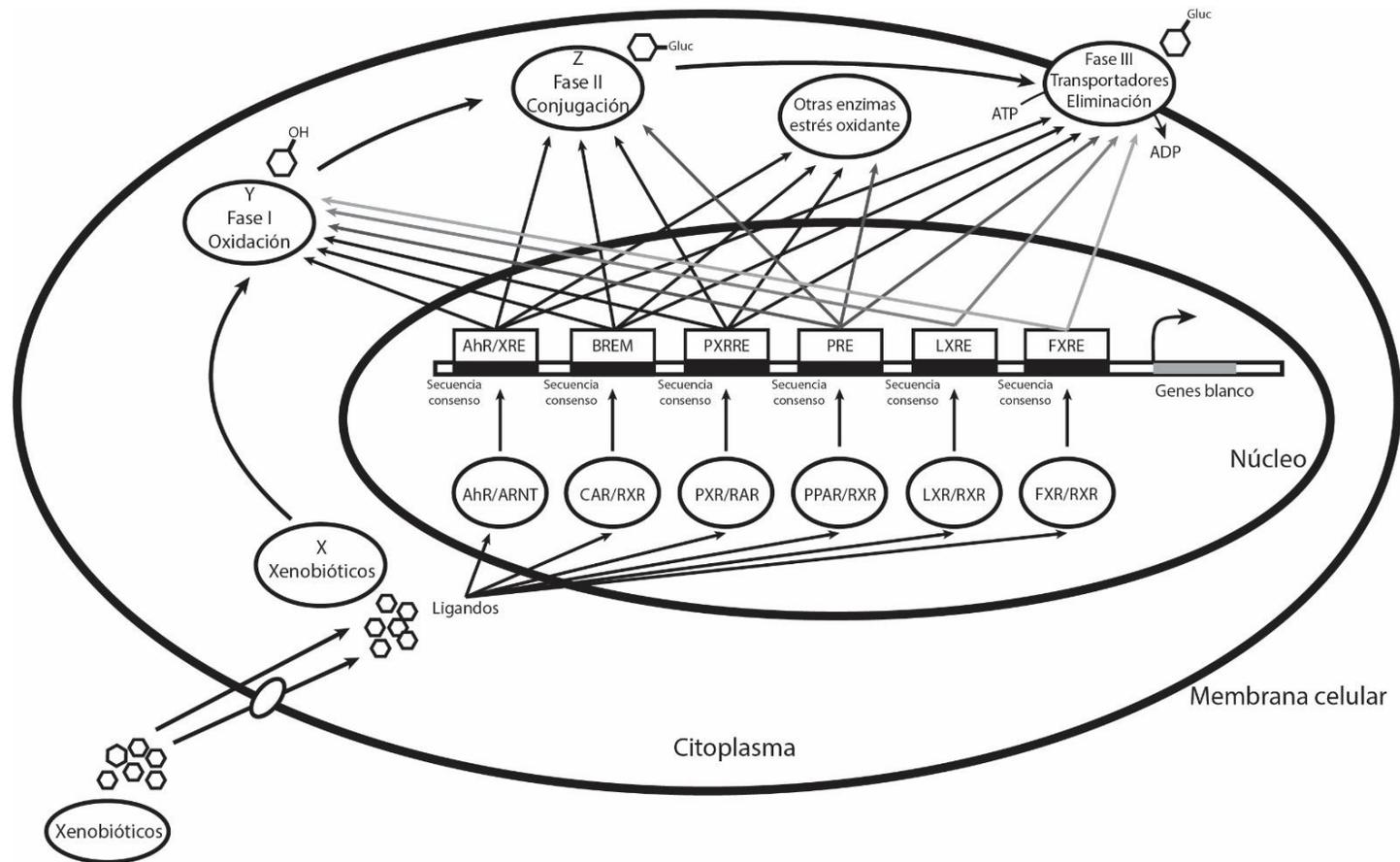


Figura 1. Inducción del metabolismo de xenobióticos

Representación de la inducción de la expresión de proteínas involucradas el metabolismo de xenobióticos, así como la inducción de proteínas involucradas en estrés, a través de la interacción de los xenobióticos con receptores nucleares. El xenobiótico X entra a la célula y sigue dos caminos: 1) dependiendo de su naturaleza química se unirá al receptor nuclear apropiado para en complejo ligado-receptor interactuar con el elemento de respuesta adecuado, dicha interacción tendrá como resultado la activación de la expresión génica de proteínas de fase I, II, III o de estrés oxidante. 2) El xenobiótico X será sustrato de enzimas de fase I, II, III o podrá participar en procesos de estrés oxidante. Si es sustrato de enzimas de fase I, las cuales pueden ser de oxidación, reducción o hidrólisis, se transformará en el compuesto Y, el cual formará diversos metabolitos conjugados (Z). Los transportadores en la fase III facilitarán la salida de la célula de los compuestos conjugados Z. Revisar nombre completo de receptores en abreviaturas I y abreviaturas II. Imagen editada y extendida de [8,9].

El inicio del estudio de CYP fue resultado indirecto del estudio de hemoproteínas microsomales y su posible participación en el transporte de electrones a la mitocondria, en el que Klingenberg descubrió una señal a 450 nm en un resultado espectral. Tal señal llamo la atención de su compañero de laboratorio Ryo Sato, quien en 1962 junto a Tsuneo Omura investigó más sobre el pico de absorbancia generado ante el burbujeo de monóxido de carbono a muestras microsomales de hígado de conejo, para posteriormente concluir que se trataba de una molécula del tipo hemoproteína, pero con comportamiento totalmente nuevo. Ante su detección por espectrofotometría se pensó que se trataba de una sola proteína, la cual se encontraba únicamente en hígado. Dada la importancia del hígado en el metabolismo de xenobióticos, además de estudios de funcionalidad de la hemoproteína recién descrita que saltaron proto a escena, la localización de CYP en este órgano dio pauta para pensar que la “razón de su existencia” era para el metabolismo de xenobióticos, de tal manera que la mayoría de los estudios realizados en su entorno fueron con diversos fármacos, compuestos industriales, agentes ambientales, etc. [10]

Vasto y arduo trabajo se ha realizado en múltiples áreas desde el descubrimiento de CYP, estudios en evolución han conducido a estimar que el primer portador de CYP pudo haber surgido hace 3500 millones de años [11]. La hipótesis de su surgimiento apunta a la necesidad de los organismos de sobrevivir al ambiente oxidante de aquel periodo, ya que el principal sustrato de CYP es el oxígeno [12].

Las características estructurales de las proteínas de CYP son muy variadas, sin embargo, presentan plegamiento proteico altamente conservado. Son cuatro las secuencias que permiten a una proteína ser identificada como CYP [12]:

- Secuencia de aminoácidos WXXXR en la hélice C.
- Una treonina (Thr) en la hélice I, implicada en la activación del oxígeno en la catálisis.
- Secuencia de aminoácidos EXXR de la hélice K (esta secuencia es totalmente necesaria para el correcto plegamiento de la proteína).
- Secuencia PERF seguido de la región de unión del grupo hemo.
- Secuencia FXXGXXXCXG alrededor del ligando axial Cys.

Actualmente las enzimas de CYP son reconocidas por su capacidad para biotransformar una amplia gama de compuestos, poco más de 200,000. Al momento han sido identificadas y secuenciadas alrededor de 504 enzimas de CYP y para el 2014 se contaban con 19,000 organismos poseedores de CYP en distintas especies, aproximadamente 200 de ellas en animales y 400 en plantas [13].

Ante el número extenso de enzimas de CYP encontradas en múltiples organismos se hizo necesario generar un sistema de nomenclatura que facilitara su identificación y organización, esto ha sido posible con el uso de identidad de secuencia de aminoácidos; agrupándolas en familias y subfamilias [14,15]. Para enzimas que

comparten igual o más del 40% de identidad se les agrupa en su respectiva familia designada por un número arábigo (CYP1), si estas enzimas comparten hasta el 55% de identidad se les agrupa en una subfamilia designada por una letra (CYP1A) y finalmente, si las enzimas comparten más del 55% se les asigna un número de acuerdo con su año de descubrimiento (CYP1A1). Actualmente existen diversas herramientas digitales que permiten un acceso rápido a los estudios reportados sobre CYP en diversos organismos, entre las más relevantes se pueden mencionar:

- <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html> Esta página web nos permite estar actualizados acerca de los nuevos integrantes de la familia de CYP, así como para saber de los existentes.
- <https://www.proteinatlas.org> En esta página web se puede acceder a información sobre expresión génica y proteica de los integrantes de CYP en el ser humano sano, a nivel de células, tejidos y órganos, y en ciertas patologías.

Los sustratos de CYP son típicamente, casi exclusivos, lípidos o compuestos lipofílicos. Pueden ser desde hidrocarburos aromáticos policíclicos hasta esteroides, ácidos grasos, retinoides, cientos de fármacos y más de 150 eicosanoides.

La importancia de los CYP ha sido demostrada mediante mutaciones o deleciones en diversos genes de familias como CYP2, CYP3 y CYP4, las cuales pueden resultar en fenotipos raros, sin embargo, en algunos CYP las consecuencias pueden ser tan dramáticas que llegan hasta embriofetalidad por pérdida de control de azúcar, balance salino, raquitosis, ceguera y alteraciones de características sexuales secundarias [10].

Por otro lado, los CYP también se dividen en 10 grupos dependiendo de su mecanismo catalítico y su donador de electrones, como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Tipos de citocromos y sus donadores de electrones.

Grupo	Localización	Donador de e ⁻
I	Citosol bacterias y mitocondrias eucariontes	Ferredoxina y reductasas de ferredoxina
II	Unidos a membranas de retículo endoplásmico liso y mitocondrias.	CYP-Reductasa de NADPH
III	Citosol de bacterias	Flavin mononucleótido – flavodoxina
IV	Citosol bacterias	Reductasa no dependiente de NADPH
V	Citosol bacterias	CYP fusionado a un dominio ferredoxina (3Fe-4S)
VI	Citosol bacterias	CYP fusionado a flavodoxina
VII	Citosol bacterias	CYP fusionado a reductasa con motivos FMN, NADPH y dominio tipo ferredoxina.
VIII	Citosol bacterias (unido a membrana en hongos)	Dominio hemo fusionado a dominio tipo CYP reductasa eucarionte
IX	Citosol (con función de reductasa de óxido nítrico)	NADH
X	Mitocondria (cloroplastos en plantas)	No poseen donador de e ⁻

Revisado en [16,17].

En la **Figura 2** se muestra el mecanismo catalítico general para los CYP. El ciclo catalítico comienza con la unión del sustrato y el desplazamiento de la molécula de agua. Esta unión provoca un cambio de bajo a alto espín de hierro férrico del grupo hemo y conduce a un potencial más positivo de hierro para favorecer la transferencia del electrón de la NADPH-reductasa y reducir al hierro del grupo hemo al estado ferroso. El hemo ferroso une al oxígeno para formar el intermediario oxi-ferroso. La transferencia del segundo electrón reduce al hierro del hemo a estado peroxi férrico. Su subsecuente protonación forma al hidroperoxo férrico (también conocido como compuesto 0). La siguiente protonación tiene como consecuencia la ruptura del oxígeno molecular y por lo tanto la producción de una molécula de agua. El intermediario remanente en el grupo hemo es un ferril-oxo (compuesto I), quien ataca al sustrato cercano y efectúa la hidroxilación. La salida del producto permite la unión de una molécula de agua al hierro férrico y con esto se completa el ciclo. [18] Dentro del ciclo hay vías no productivas que conducen a la fuga de intermediarios oxi, interrumpiendo el ciclo. Las especies oxi ferroso pueden producir anión superóxido y formar hierro férrico. El compuesto 0 puede producir anión superóxido y llevar la reacción a la interacción de peróxido de hidrogeno tanto con el hierro férrico y como con el sustrato unido al CYP. El compuesto I puede perderse con la producción de agua. La fuga de estas especies ocurre si, por ejemplo, la transferencia del electrón/protón ocurre con desfase de tiempos o si el sustrato es posicionado incorrectamente o si es resistente al ataque oxidante. Las especies reactivas de oxígeno también forman parte de procesos celulares como es la hiperoxidación de residuos tioles en proteínas vinculadas en cascadas de señalización, metabolismo endógeno, etc. [18,19].

El ciclo catalítico descrito será llevado a cabo sobre a todo aquel compuesto con características estructurales necesarias para ser sustrato de CYP. Lo anterior toma relevancia cuando se trata de compuestos tóxicos, ya sean de índole antropogénico o natural, como claro ejemplo se encuentran las nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, arilaminas, arilnitrosaminas, etc., los cuales son biotransformados a compuestos electrofílicos altamente reactivos con el DNA. La participación del CYP en reacciones de biotransformación y sus características de regulación de expresión génica proporcionan un punto de prevención a la toxicidad causada por los xenobióticos, ya sean con efectos reversibles como las interacciones fármaco-fármaco o irreversibles como las mutaciones.

Los CYP son las principales enzimas biotransformadoras de la mayoría de los fármacos y compuestos lipofílicos, lo cual les confiere relevancia en el desarrollo farmacéutico y en el estudio toxicológico. Además, participan en procesos de síntesis de hormonas esteroides, ácidos biliares, prostaglandinas, entre otros, mostrando también su importancia fisiológica, esta versatilidad de actividad metabólica sobre compuestos químicos tanto endógenos como exógenos hacen de las diferentes enzimas de CYP excelentes blancos terapéuticos [10].

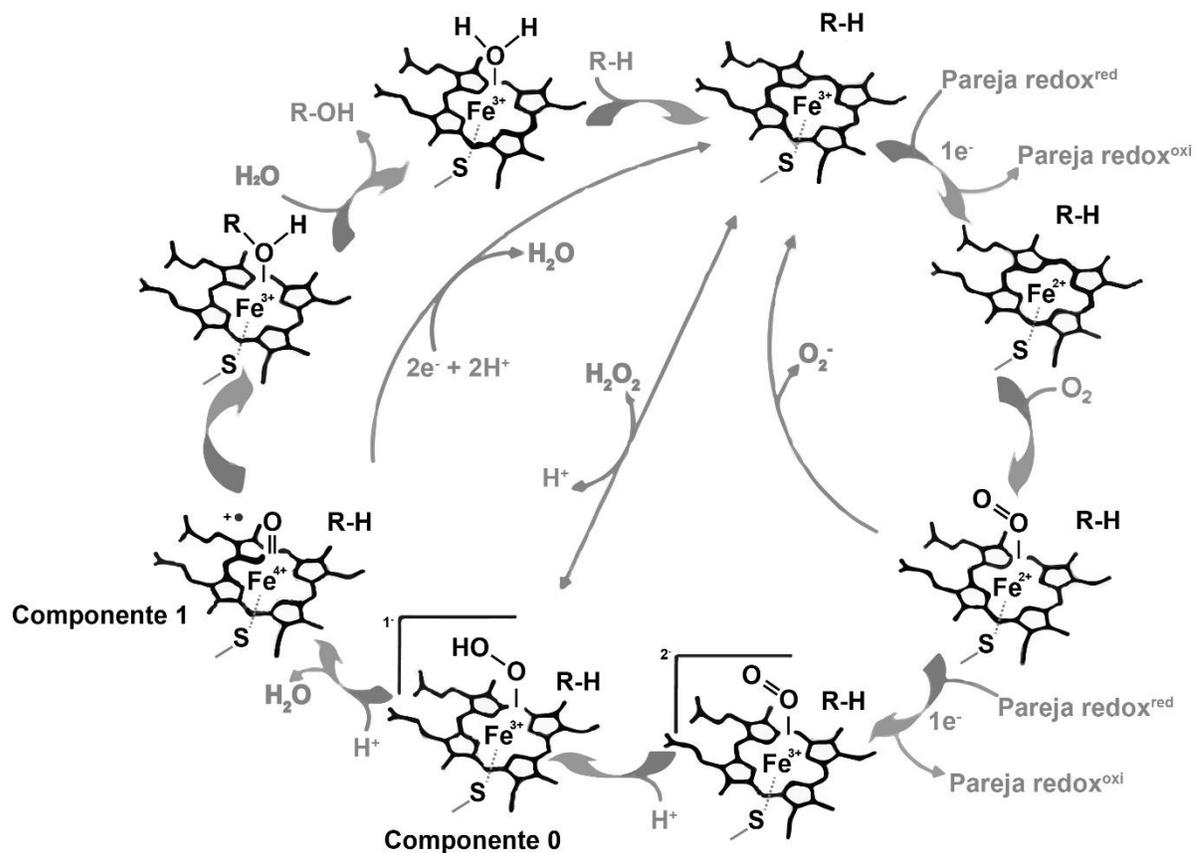


Figura 2. Ciclo catalítico de citocromo P450.

El ciclo inicia con la entrada del sustrato RH y el cambio de bajo a alto espín del hierro de la protoporfirina, lo cual permite la reducción del mismo hierro mediante el uso de un NADPH, sigue con el acoplamiento de oxígeno molecular al sitio catalítico, continúa con la ruptura de la molécula de oxígeno, y finaliza con la inserción de un átomo de oxígeno al sustrato, generalmente en forma de hidroxilación. Para llevar a cabo la reacción de oxidación, el ciclo requiere de dos electrones y dos protones. La reacción tendrá como productos secundarios especies reactivas de oxígeno. Imagen editada al español de [18].

En el ser humano existen 18 familias de CYP, divididas en 44 subfamilias de proteínas codificadas en 57 genes. Los citocromos del ser humano partícipes del metabolismo de fase I son expresados principalmente en hígado [10]. Su expresión, además de observarse en el hígado, es advertida en una gran variedad de tejidos extrahepáticos [20].

Varios de los genes encontrados en cuatro de las familias principales de CYP en seres humanos (*CYP1*, *CYP2*, *CYP3*, y *CYP4*) son inducibles por estímulos externos como dieta, inductores químicos, fármacos, feromonas, etc. Lo anterior hace necesario la constante búsqueda de factores intrínsecos y extrínsecos que afecten la expresión y función de los CYP, así como de su impacto en la farmacocinética y respuesta a fármacos y agentes tóxicos. Estos factores serán determinantes en la variabilidad interindividual exhibida ante la exposición a

fármacos o compuestos ambientales tóxicos. Los polimorfismos son otro factor que ha dado respuesta parcial a la variabilidad interindividual de algunas enzimas de CYP, en particular CYP2D6. Otras posibilidades de variabilidad interindividual son el sexo, edad, enfermedades, influencias hormonales y diurnas, regulación epigenética, entre otros [21]. Un resumen de esto lo muestra la **Figura 3**.

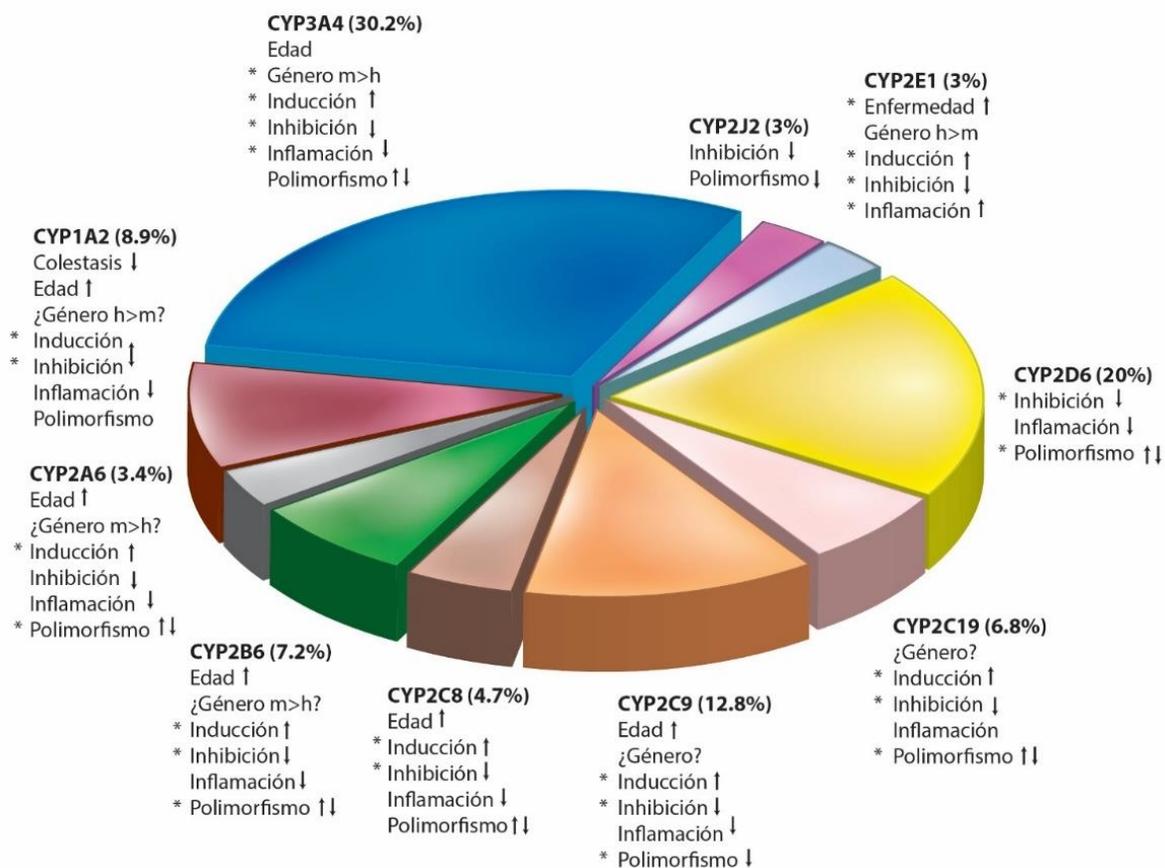


Figura 3. Contribución de principales CYP en el metabolismo de fármacos y factores que afectan la variabilidad de respuesta.

*Factores que afecta la respuesta, ¿? factores con significancia controversial y la flechas indican el direccionamiento de la respuesta. Imagen editada al español de [21].

Una estrategia en la quimioprevención es la inducción o inhibición de la producción de proteínas de CYP. Para ello, primero es necesario tener un claro entendimiento del proceso de expresión de los genes de CYP. En la **Figura 1** se hace un resumen ilustrado de los procesos generales en los cuales los xenobióticos inducen la expresión de enzimas de fase I, II y III mediante su interacción con varios receptores nucleares. Como se aprecia en dicha figura, el xenobiótico con la capacidad de ligando inductor puede inducir varias enzimas, ya sea del mismo grupo CYP u otras de distintas fases del metabolismo de xenobióticos.

3.1.1. Familia de citocromo P4501 (CYP1)

La acción enzimática de la familia CYP1 fue inicialmente conocida como aril hidroxilasa (AHH), de tal manera que las enzimas que la conforman fueron consideradas como una sola. Adicionalmente, las isoformas que conforman a la familia CYP1A comparte la misma vía de inducción génica, del tal manera que la confusión de ser una sola enzima fue sustentada con el hecho de que su actividad AHH es fuertemente inducida por una amplia variedad de compuestos bajo la misma ruta transcripcional [5]. En 1979, mediante el uso de inductores específicos y separación electroforética se logró aislar e identificar a P450c, ahora conocida como CYP1A1 [22], un año después bajo el nombre de P450d fue identificado CYP1A2 [23], y hasta apenas en 1996 fue aislado e identificado CYP1B1 [24,25].

En el ser humano, rata y ratón, los genes de *CYP1A1* y *CYP1A2* están localizados uno seguido del otro pero con cuerpo del gen en dirección contraria, **Figura 4**, por lo cual comparten sus regiones regulatorias, cuya organización y extensión varía entre especies [26].

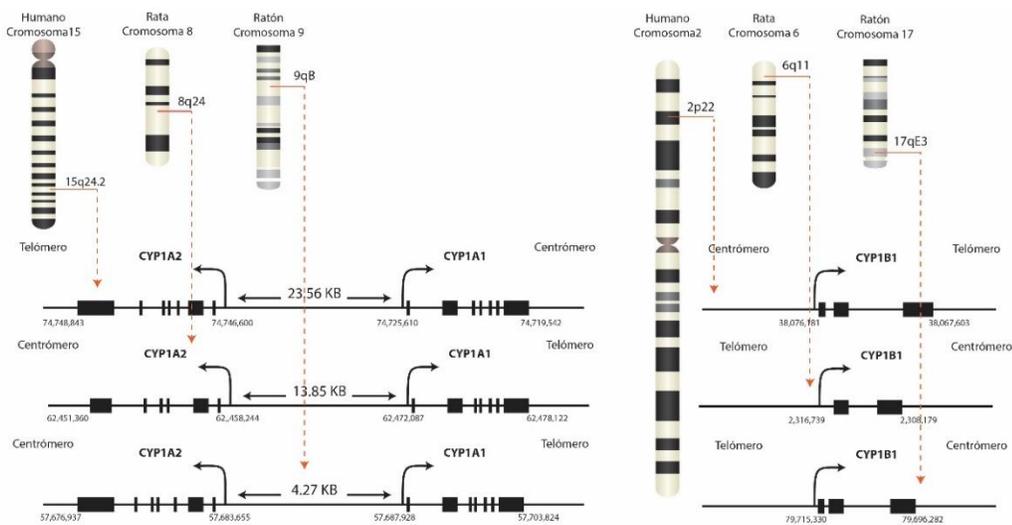


Figura 4. Localización cromosómica de CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 en ser humano, rata y ratón.

Datos obtenidos de NCBI – marzo 2019.

El porcentaje de similitud entre CYP1A1 y CYP1A2, así como su análisis evolutivo ha llevado a postular que estos genes son producto de duplicación génica [27]. Por su lado, el gen de *CYP1B1* no está ubicado cromosómica ni evolutivamente cerca de los otros dos genes de esta familia y a pesar de esto comparte la misma vía de inducción de AHR, aunque parece no ser la única vía de regulación ni tampoco la principal para este citocromo [28].

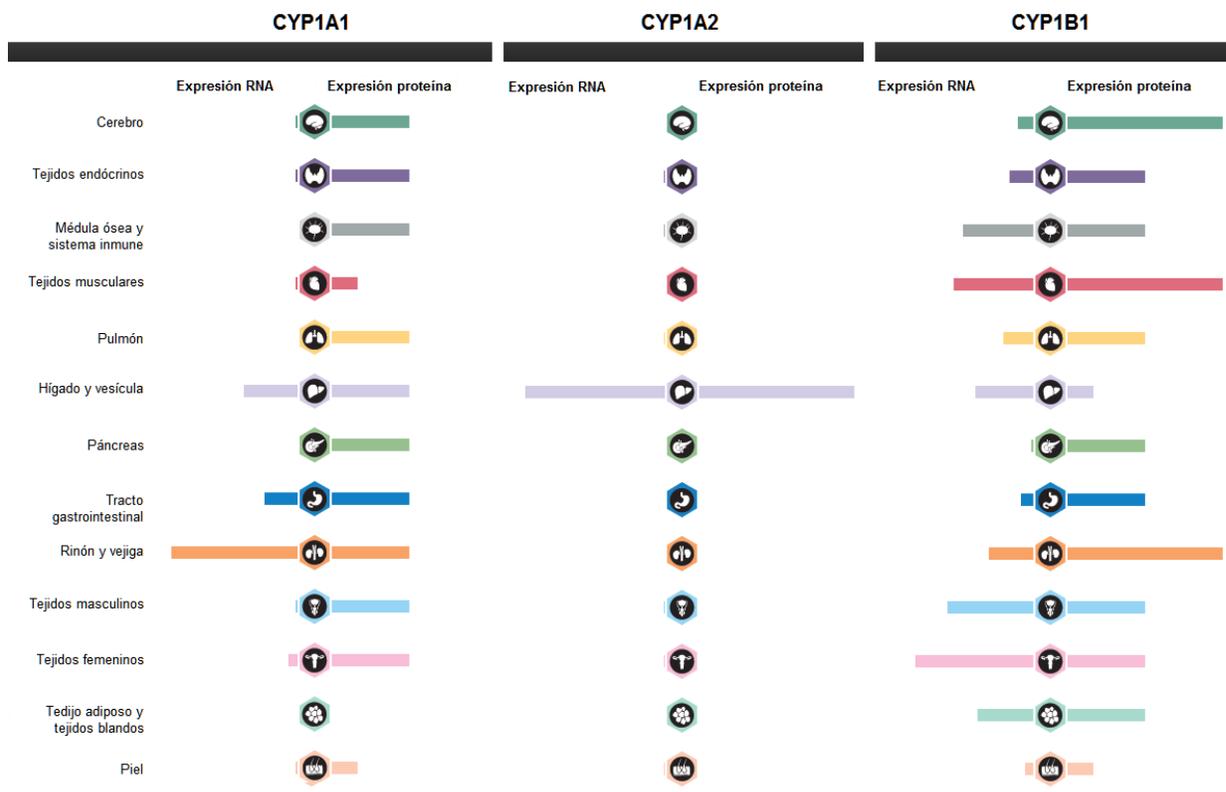


Figura 5. Niveles de RNA y proteínas de CYP1 en distintos órganos humanos.

Adaptado y traducido de [20].

A partir de estudios de bioactivación de compuestos mutagénicos se sabe que CYP1A1 y CYP1B1 son mucho más activos y parecen ser claves en la generación de los metabolitos electrófilos que después serán de mayor reactividad ante la acción de la enzima epóxido hidrolasa, inclusive está la propuesta de que es CYP1B1 quien juega un papel central en dicha bioactivación debido a que posee mayor velocidad de reacción [29].

La distribución basal de CYP1A1 y CYP1B1 en el organismo es extrahepática principalmente, como lo muestra la **Figura 5**, por lo cual, serán los tejidos extrahepáticos los más afectados en la bioactivación de compuestos tóxicos por estas enzimas. A pesar de esto, el hígado no se descarta de ser dañado por los metabolitos generados ante la acción de estas enzimas, debido a que compuestos inductores de la ruta transcripcional de CYP1A permitirán el incremento de los niveles proteínicos de la familia CYP1 en este órgano, incrementando el metabolismo hepático y permitiendo mayor generación de metabolitos tóxicos.

CYP1A2 es la única enzima de la familia cuya expresión basal es elevada en el hígado, sin embargo, las velocidades de reacción de esta enzima son bajas comparadas con las otras dos de su familia, por lo tanto, se ha propuesto que no juega un papel tan relevante en el proceso de carcinogénesis como es el caso de las otras dos enzimas de la familia de CYP1 [29].

“...incluso si es difícil de contestar una pregunta, solo existe una -y solo una- respuesta correcta.”

“ En alguna parte dentro de nosotros, algo nos dice que la vida es un gran misterio”

El mundo de Sofía de Jostein Gaarder

3.1.1.1. Citocromo P450 1A1

La importancia de citocromo P4501A1 (CYP1A1) en toxicología recae en su participación en la biotransformación de HAPs, hidrocarburos aromáticos policlorados y arilaminas. Dicha biotransformación tendrá como consecuencia la generación de diversos metabolitos que, dependiendo de sus características, así como del entorno metabólico en el que se encuentre, seguirán vías de desintoxicación o de toxicidad. En esta última se resalta la formación de aductos por los metabolitos tóxicos con el DNA. Esta interacción entre metabolito electrofílico y el DNA es señal de daño, por tanto, causa de activación de diversas vías de señalización como arresto celular, apoptosis, reparación del daño o establecimiento de mutaciones [30][31]. CYP1A1 no sólo participa en la biotransformación de xenobióticos, también lo hace en la biotransformación de diversos sustratos endógenos como la hormona 17 β -estradiol [32], melatonina [33], y mediadores inflamatorios como el ácido araquidónico y el ácido eicosapentoico [34,35]. Sin embargo, su relevancia en el metabolismo endógeno aún no está completamente dilucidado. Estudios en los que se suprime o disminuye la expresión embrionaria de este gen conducen al organismo en cuestión a daños en el sistema cardiovascular principalmente [36].

Por otro lado, ante la inducción de células de hepatoma de ratón o fibroblastos de hámster con el agente tóxico 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD), la proteína de CYP1A1 tiene un tiempo de vida media de 2.8 horas y se ha propuesto que su degradación podría estar siguiendo la vía proteasomal pues ha fallado en responder a la vía lisosomal [37–39]. En lo que se refiere a la ubicación celular se le ha encontrado principalmente en dos porciones, retículo endoplásmico liso y mitocondria [40].

La estructura cristalizada de la proteína de CYP1A1 fue determinada con una resolución de 2.6 Å y muestra un arreglo clásico para proteínas P450 de hélices A-L, **Figura 6**. También presenta pequeñas hélices F' y G' típicamente involucradas en el acceso ligandos hidrofóbicos al sitio activo. Un detalle inusual son 5 residuos de aa. que rompen el centro de la hélice F, el cual está involucrado con la unión del ligando. Esta estructura

de ruptura de la hélice F, pero con tres residuos de amino ácidos, también está presente en las proteínas de CYP1A2 y CYP1B1 [41].

Un residuo de fenilalanina (Phe224) en la hélice F, forma un enlace π - π con el ligando planar que ingrese al sitio activo, aparentemente la única interacción directa entre la enzima y su ligando. Dicho ligando se posicionará cerca del grupo hemo, a aproximadamente 4.5 Å del sitio a oxidar. El sitio activo presenta una cavidad de aproximadamente 524 Å³. El grupo hemo conforma al “techo” de la cavidad, mientras que la hélice I funge de “pared”, y la base la están formando las hélices F y G. La fenilalanina que genera el enlace π - π con el ligando es una característica que comparten CYP1A1 y CYP1B1, lo cual podría explicar la similitudes en cuanto a afinidad de tipo de sustratos que estas dos tienen [41].

Mediante el uso del programa CAVER se determinaron cuatro canales de entrada a la cavidad de CYP1A1. El canal S: se abre entre las hélices D, F e I con cara al citosol. El canal 3: se abre entre F y G, cerca del punto de quiebre de la hélice F. Este canal tendría cara al interior de la bicapa lipídica de la membrana de anclaje. El canal 2c: se abre entre las hélices G y B', está delimitada por la hélice I. El canal 2e: se abre entre las hélices B' y B/B'. Los canales 2c y 2e están dando cara a la interfaz membrana-citosol. Se propone que este arreglo de canales estarían discriminando entre sustratos pequeños y grandes para entrar a la cavidad del sitio activo de CYP1A1 [42].

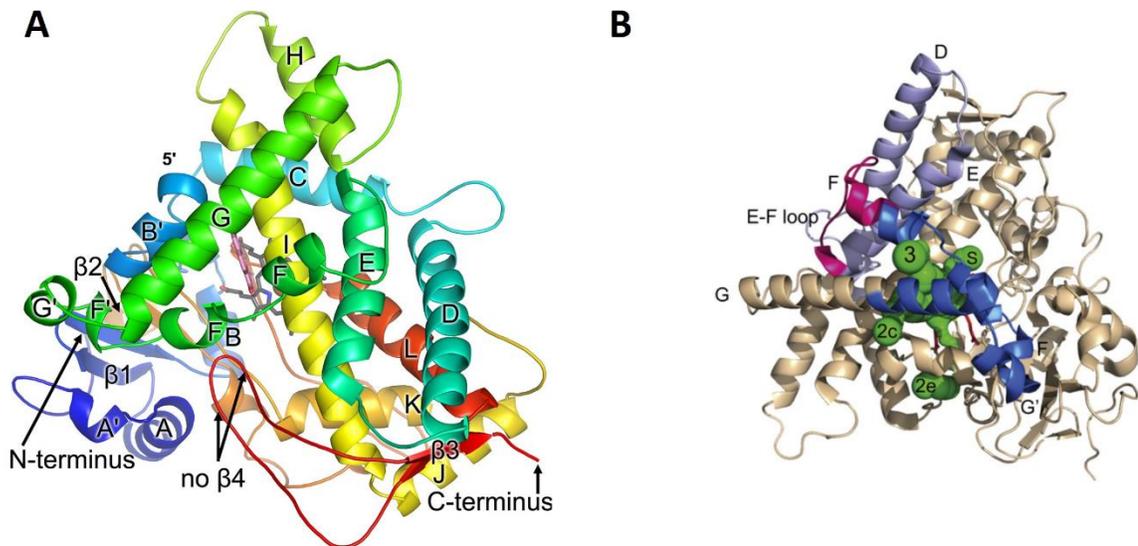


Figura 6. Esquema proteico tridimensional de CYP1A1.

En el panel A se muestra la estructura clásica de hélices A-L, en esta imagen se observa el techo de la cavidad con las hélices F y G, mientras que en el panel B se muestran los canales S. Imagen de Walsh *et al.* [41].

3.1.1.2. Regulación de CYP1A1 a través de AHR

Ante la participación de CYP1A1 en la activación de promutágenos, su regulación a nivel de expresión génica y de actividad enzimática ha sido planteada como blanco para la quimioprevención, así que conocer a fondo los mecanismos de regulación de esta enzima es de suma relevancia para el desarrollo de estrategias de prevención y de continúa búsqueda de modos de acción de diversos promutágenos.

Las investigaciones iniciales sobre CYP1A1 giraron en torno a su actividad AHH y al estudio de la carcinogénesis química, estos estudios llevaron a los investigadores a postular en 1976 la participación de un receptor en la inducción de la enzima AHH [43], lo que hoy conocemos como AHR. Las acciones de AHR en la regulación de genes no solo se restringen a CYP1A1 sino a múltiples enzimas del metabolismo de fase I y II, estrés oxidante, sistema inmune, control de ciclo celular, etc. [44], **Figura 1**.

Como estructura básica, el gen de CYP1A1 está conformado por una región *enhancer*, un promotor y por el cuerpo del gen; dentro del *enhancer* se encuentran las secuencias consenso 5'-GCGTG-3' correspondientes al sitio de unión del complejo transcripcional, constituido por el receptor AHR y el factor transcripcional conocido como transportador del receptor de aril hidrocarburos (ARNT), estas secuencias consenso son denominadas elementos de unión a xenobióticos (XRE), [45–47], **figuras 4 y 7**.

En lo que respecta a la inducción de *CYP1A1*, se sabe que este proceso es iniciado mediante la unión del ligando, ya sea exógeno o endógeno, a AHR estabilizándolo en el citoplasma mediante proteínas chaperonas (HSP90, XAP2, p23) [48,49]. De entre los ligandos endógenos hasta ahora reportados para AHR se encuentran el triptófano y compuestos de estructura similar, como el 6-formilindol [3, 2-b] carbazol (FICZ); mientras que de los ligandos exógenos más relevantes son TCDD, BaP, 3MC, etc.[50] Ante la unión del ligando a AHR, la proteína sufre cambios conformacionales, permitiéndolo su translocación al núcleo mediante las proteínas importinas [51,52]. Una vez en el núcleo AHR será capaz de interactuar con ARNT, disociándose de las proteínas chaperonas y estableciendo el complejo ligando-AHR-ARNT (AHRC) capaz de unirse a los sitios XRE. En la región promotora se unirán factores transcripcionales generales tales como TBP, pero no AHRC. Dependiendo de la especie será el número de XRE presentes en el *enhancer* de *CYP1A1*, así como el número de elementos funcionales para la unión de AHRC y promoción de la transcripción [53]. Se ha demostrado que la región promotora está regida por el *enhancer*, si AHRC no está unido al *enhancer* no hay posibilidad de transcripción [46]. En la **Figura 7** se muestra la representación de esto.

Al momento, AHR ha mostrado su versatilidad de interacción con diversas proteínas, activando o reprimiendo genes en tiempo, células y tejido específicos, generando diversas respuestas fisiológicas o patológicas [44,50,54].

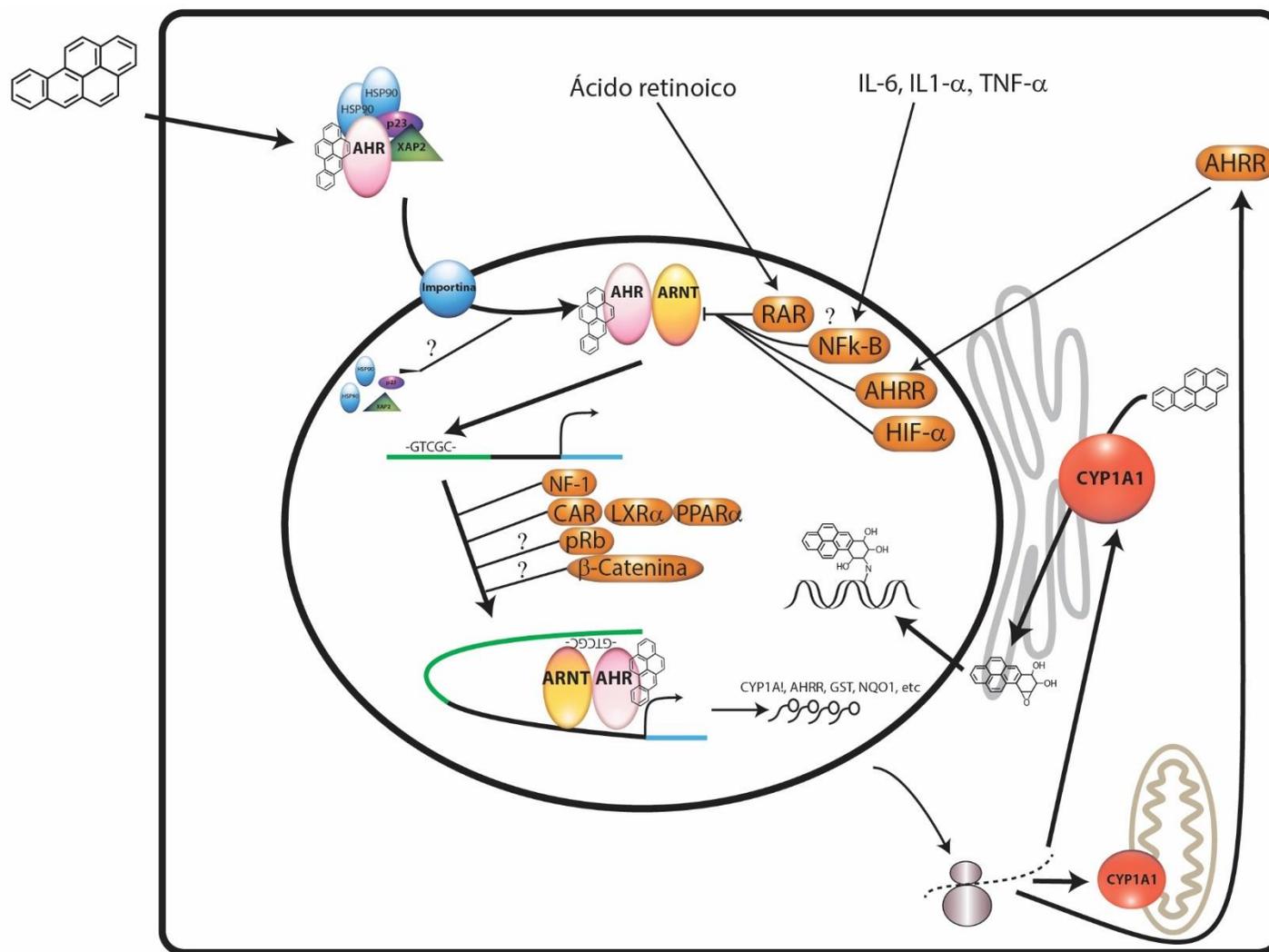


Figura 7. Vías de inducción e inhibición de la expresión de CYP1A1.

Se muestra a los ligandos HAPs de AHR, los cuales también son sustratos de la enzima CYP1A1 de cuyo metabolismo dará como resultado metabolitos reactivos con el DNA. Las vías marcadas con signo de interrogación ? aún no han sido corroboradas en modelos humanos.

3.1.1.3. Expresión de *CYP1A1* a través de otros receptores

Se le denomina regulación no clásica de *CYP1A1* debido a que ocurre la activación transcripcional del gen sin la presencia de un ligando clásico (tipo HAP o HAH), sin embargo, esta activación no clásica sigue involucrando al receptor AHR. Pocos estudios han planteado la posibilidad de inducción de *CYP1A1* independiente de AHR, como lo es el tratamiento de la línea celular de carcinoma de colon con suero [55]. A este respecto, se ha propuesto que el receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α) es activado por ácidos grasos libres en el suero, lo cual permite su subsecuente interacción con elementos de respuesta en la región promotora en *CYP1A1* [56], sin embargo, son necesarios más estudios para aclarar el mecanismo de acción propuesto.

Gracias a inductores no canónicos de *CYP1A1* como el omeprazol, ha sido posible dilucidar la activación de AHR con otros factores de inducción como son la proteína RB [44] y, aunque no completamente comprobadas, también se han sugerido algunas cinasas [57]. Recientemente se ha postulado la participación de Wnt/ β -Catenina en la expresión de *CYP1A1* dependiente de la zona en el lóbulo del hígado de ratón [58]. Los procesos anteriores están ilustrados en la **Figura 7**.

3.2. Epigenética

El término epigenética tiene sus orígenes en 1942, durante el estudio del proceso que conduce a un óvulo fertilizado a la formación de un organismo maduro, epigénesis. A este proceso se le pensaba como una serie de eventos orquestando reacciones bioquímicas que darían lugar al complejo organismo maduro. Fue Waddington quien introdujo el término epigenética definiéndolo como “los mecanismos causales por los cuales los genes de un genotipo tendrán efectos fenotípicos” [59,60]. La definición del término ha ido cambiando en función de los descubrimientos que al respecto se han hecho. Los primeros hallazgos de la regulación epigenética se basan en la organización cromosómica del DNA, la cual dejó de ser considerada un mecanismo de compactación del DNA contenido en el núcleo para ahora ser analizada como una estructura que controla la expresión génica y que también promueve la variabilidad genética [61].

Uno de los descubrimientos más importantes fue revelado entre 1959 y 1961 por Susumu Ohno y Mary Lyon, respectivamente: la inactivación del cromosoma X femenino. Este descubrimiento demuestra la inalteración de la secuencia del DNA para silenciar a un cromosoma. En 1975 el proceso de inactivación del cromosoma X tendría otro gran significado, cuando la metilación del DNA fue propuesta por Arthur Riggs y por Robin Hollyday y J.E. Pugh como parte del mecanismo de inactivación [59]. Posteriormente, otro de los descubrimientos más importantes se realizó en 1983 por Shapiro y Mohandas quienes plantean a la metilación del DNA como una memoria transcripcional de las células en división a través del desarrollo [60]. A la par de los descubrimientos sobre metilación del DNA, dentro del Simposio de Cold Spring Harbor sobre Biología Cuantitativa llevado a cabo en 1974, Hewson Swift realza la importancia funcional de la organización estructural de los cromosomas, haciendo recuento de lo que hasta el momento se había descubierto al respecto e incentivando a los asistentes a indagar más sobre la estructura de los cromosomas y preguntarse sobre su función más allá del empaquetamiento del DNA [62]. Para ese entonces, las histonas ya eran reconocidas como proteínas involucradas en el silenciamiento de la expresión de genes con base en los descubrimientos de Edgar y Ellen Stedman en 1950, y su acetilación estaba correlacionada con la forma activa de los cromosomas Vincent Allfrey y Alfred Mirsky en 1964. Siguiendo con estudios entorno a esta estructura cromatínica, en 1974 Jean Thomas y Roger Kornberg descubren el empaquetamiento del DNA en nucleosomas.

Sesenta y dos años han pasado desde la introducción del término epigenética y durante este tiempo múltiples descubrimientos han mostrado la compleja regulación de expresión de genes durante procesos mitóticos y meióticos. Los diversos descubrimientos llevaron a redefinir a la epigenética como “el estudio de cambios en

la función de genes heredados mitóticamente y meióticamente que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia de DNA.

Las histonas son los principales componentes de la estructura cromosómica en su arreglo heterocromatínico. La heterocromatina es DNA altamente condensado, clasificada en: constitutiva, formada principalmente por regiones pobres en genes de los pericentromeros, considerada una conformación que permite una cromatina condensada y transcripcionalmente nula; facultativa, la cual es una región con nula transcripción, pero que posee la capacidad de interconversión entre heterocromatina y eucromatina en dependencia de contextos de temporalidad, espacio y herencia.

La presencia de histonas en la estructura heterocromatínica se suponía un mecanismo de empaquetamiento de la gran cantidad de DNA que los organismos eucariontes poseen, debido a la carencia de estas proteínas en procariontes, cuya cantidad de DNA es menor, sin embargo, también existen las proteínas HU que permiten empaquetar el DNA bacteriano, y organismos como las arqueas utilizan tanto proteínas HU como histonas para empaquetar su DNA [63]. Ahora sabemos que las histonas funcionan como un mecanismo de regulación de la expresión genética. El octámero de proteínas histonas H2A, H2B, H3 y H4, forman a la subunidad fundamental de la cromatina, el nucleosoma [64].

147 pb de DNA con carga electrostática negativa se enrollan en un nucleosoma, generando una estructura neutra y parcialmente accesible a factores transcripcionales. De tal manera que eventos como replicación y transcripción son dirigidos a sitios permisibles para el ensamblaje de las proteínas correspondientes para dichos procesos. De aquella estructura básica nucleosomal de 11 nm de diámetro salen las porciones amino terminales de las histonas, en las cuales se llevan a cabo modificaciones postrcripcionales como acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones, etc., con profundos efectos locales sobre la estructura cromosómica [63].

Aparte de las histonas que canónicamente forman al nucleosoma existen otras cuya presencia en el cromosoma permite otro tipo de funciones. Está la histona H1 que actúa como molécula enlace entre los nucleosomas para formar una estructura de mayor compactación, la estructura de 30nm o heterocromatina. La H1 ocupa ~38pb en seres humanos, esta zona también es conocida como pequeña zona de enlace entre nucleosomas [64]. Existen cuatro variantes de la histona H2, una de ellas es la H2A.Z, la cual ha sido asociada con múltiples y contradictorias funciones tales como activación transcripcional, inhibición transcripcional, control de ciclo celular, reparación del daño al DNA, replicación del DNA, segregación cromosómica, e integridad genómica; la histona H2A.X, la cual puede ser fosforilada en su serina del motivo carboxi terminal generando la conocida γ H2A.X, siendo abundante cuando ocurre daño al DNA y localizándose en los sitios de daño, particularmente del tipo ruptura de la doble cadena; la histona H2A.B, la cual es apenas perceptible en

técnicas de inmunocitoquímica y que se ha visto enriquecido en las regiones TSS, presuntamente facilitando la transcripción; y finalmente la histona macroH2A, la cual presuntamente participa en el impedimento de la transcripción al reducir el acceso de los factores transcripcionales y excluye a H1 [63].

Con respecto a la histona H3, hasta el momento se han identificado dos variantes de esta proteína, la histona H3.3, la cual forma parte del ensamble nucleosomal independiente de la replicación en la transcripción activa de genes; la histona cenH3, la cual se localiza específicamente en centrómeros en lugar de H3 y es parte esencial en la formación del cinetocoro y en el proceso de segregación de cromosomas [63].

Existen zonas de enlace de 142pb conocidas como regiones libres de nucleosomas (NFR). Las NFR tienden a ser zonas de anclaje para DNA y RNA polimerasas. En el análisis general de los promotores de genes se encuentra una zona NFR entre los nucleosomas -1 y +1; en algunos genes humanos, el nucleosoma -1 es encontrado en algunos genes en la zona NFR, siendo más predominante como primer nucleosoma el -2. El posicionamiento de los nucleosomas, la combinación de sus modificaciones postranscripcionales y el reemplazo de histonas dentro de los nucleosomas son clave en la regulación de genes [64].

Los procesos que están mediando la expresión de genes con características heredables y sin alteración de la secuencia de DNA generalmente estarán involucrando tres mecanismos representativos de la epigenética: metilación del DNA, modificación de histonas y presencia de una variante de histonas, **Figura 8**.

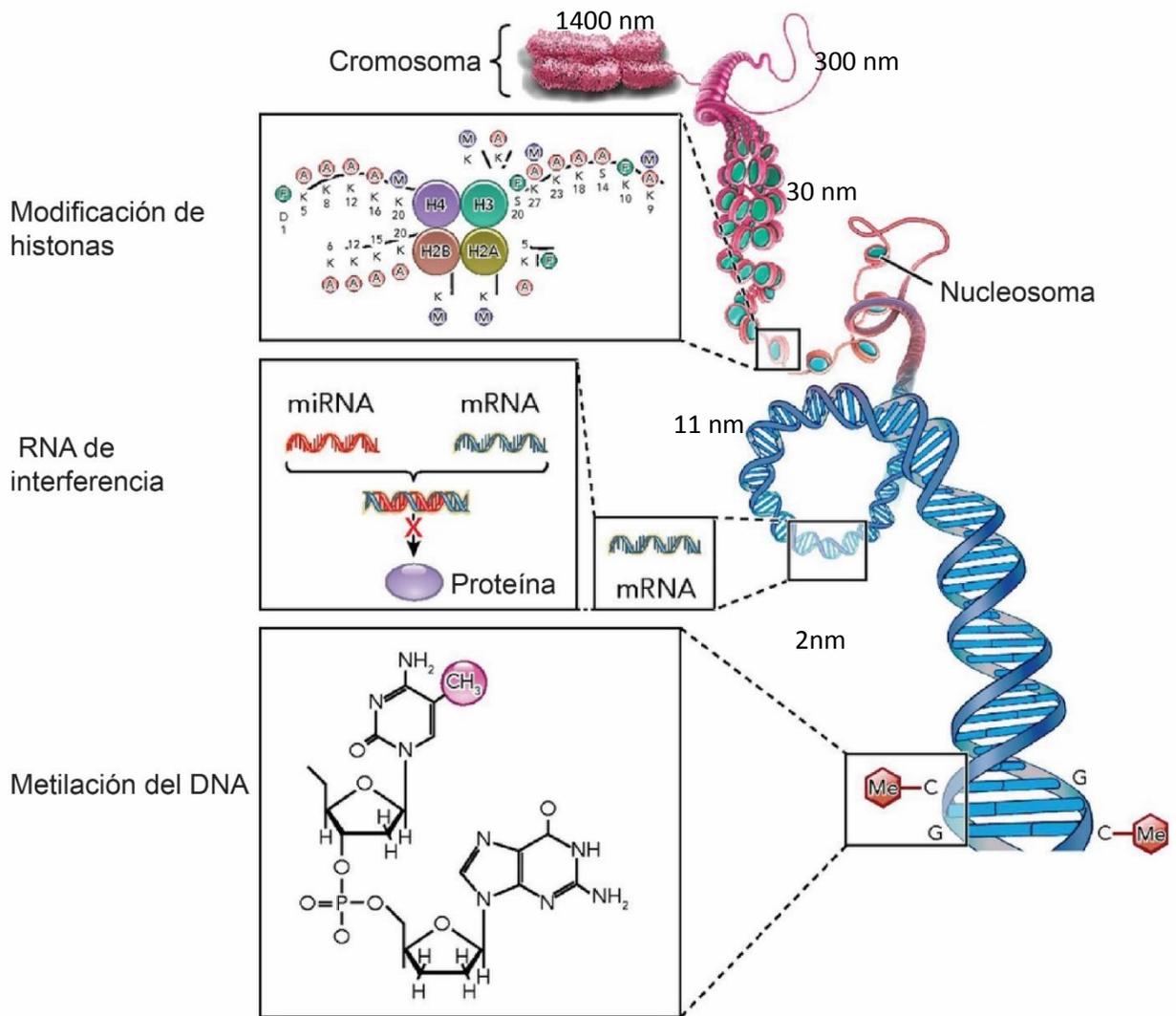


Figura 8. Esquema del empaquetamiento del DNA en una estructura condensada de cromatina.

La estructura de la cromatina está regida por modificación de histonas, diversos modos de acción de RNA no codificante y metilación de DNA. Esquema adaptado al español de Hagood JS. [65]

3.2.1. DNA Metiltransferasas

Las enzimas que catalizan la transferencia de un grupo metilo a la citosina en su posición C5, fueron inicialmente conocidas como DNA nucleósido metiltransferasas, siendo esta catálisis llevada a cabo mayoritariamente en el dinucleótido CpG, **Figura 9 A y B**. Son cinco las proteínas denominadas DNA metiltransferasa (DNMT): DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L, sin embargo, sólo DNMT1, DNMT3a y DNMT3b son las que experimentalmente han mostrado tener la actividad catalítica de DNA metiltransferasa. DNMT2 está denominada así debido a su similitud tanto en secuencia de amino ácidos como estructural con las DNA MTasas, sin embargo, pero carece del centro activo metiltransferasa del DNA, adicional a que ha mostrado tener actividad metiltransferasa sobre la citosina 38 del RNA de transferencia como se muestra en la **Figura 9 C**, de tal manera que es clasificada como una tRNA metiltransferasa [66,67]. La acción de DNMT2 sugiere su participación en modificaciones post-traduccionales, debido a que la falta de esta proteína coincide con sustituciones de aminoácidos en los codones reconocidos por la tRNAs metilados por DNMT2 [68]. Por su lado, DNMT3L también posee una secuencia de aminoácidos muy parecida a DNMT3 y dado su mecanismo de acción se le cataloga como un factor de regulación, pues al formar un tetrámero con DNMT3a potencia la actividad de esta metiltransferasa, **Figura 9 C**, [69].

DNMT3a y b son metiltransferasas involucradas en la metilación de *nov*o del DNA durante la gametogénesis y el desarrollo temprano. Mientras que DNMT1 es una proteína cuyo sitio catalítico actúa preferencialmente sobre DNA hemimetilado, por lo cual, es una proteína involucrada en el mantenimiento de la marca de metilación. También se ha probado su acción en la reparación de sitios dañados del DNA, actuando conjuntamente con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), **Figura 9 E**, [70]. Se le vincula con la replicación cromosómica así como en la reparación de DNA dañando [71].

En las **Figura 9 D, E y F** se muestra el dominio N-terminal (NTD) y el dominio catalítico (CD) de DNMT1. El dominio CD ha sido descrito únicamente como partícipe en la actividad DNA metiltransferasa de la enzima, mientras que el dominio NTD es quien ha sido estudiado como región moduladora del reconocimiento de los sitios de unión a heterocromatina para el establecimiento de la distribución celular de la enzima y de unión a PCNA. Una porción del NTD que ha tomado relevancia es el dominio TS (targeting sequence), el cual presenta un motivo de interacción con ubiquitina y que al parecer su acción es independiente de la replicación celular. Este dominio es requerido para la actividad enzimática de DNMT1, de tal manera que al insertarse en la porción CD de la participa en la autoinhibición de la enzima [72,73]

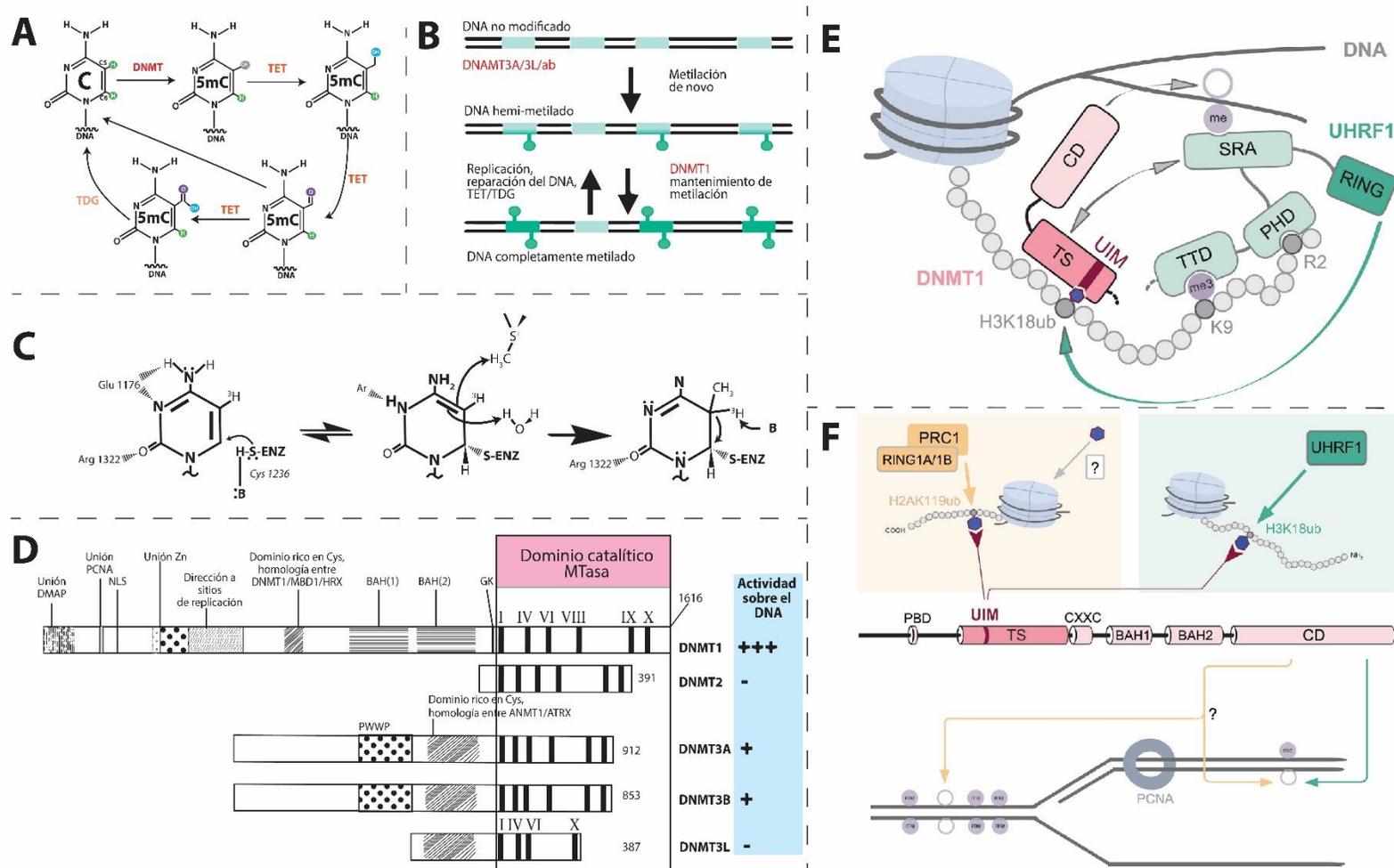


Figura 9. Características y mecanismos de acción de DNMTs.

Panel A: reacción de metilación del DNA por DNMTs; **panel B:** clasificación de las DNMT en función de su acción sobre el DNA; **panel C:** mecanismo de acción para la metilación del DNA por DNMT1; **panel D:** comparación de estructuras de las distintas DNMTs; **panel E:** esquema en el que se muestra el motivo de interacción con ubiquitina en la estructura de DNMT1; **panel F:** sitios ubiquitinados en H3 y H2, los cuales son señales de reconocimiento para un/hemimetilación del DNA. Esquema adaptado al español de [69], [74], [75].

En la **Figura 9 D** se muestra el mecanismo propuesto hasta ahora para el reconocimiento de sustrato por parte de DNMT1, el cual se basa en la interacción entre DNMT1 y la proteína UHRF1 (del inglés *PHD* y *RING finger domain 1*). Esta interacción es a través del dominio TS de DNMT1 con la porción SRA (SET y RING-associated ubiquitin like) del UHRF1. Los dominios de unión de UHRF1 parecen ser claves para la interacción de las dos proteínas y la eficiencia del mantenimiento de la metilación del DNA. La interacción entre DNMT1 y UHRF1 es localizada en los sitios de replicación del DNA durante la fase S, en las cuales esta proteína metila preferencialmente a los dinucleótidos CG reconocidos mediante UHRF1 [76].

El dominio SRA de UHRF1 se une preferencialmente al DNA hemimetilado [76–81], mientras que su dominio tudor (TTD) se une a los residuos de trimetilados de lisina en la histona H3 (H3K9me3), marca que corresponde a un estado de eucromatina. El homeodominio de plantas (PHD), el cual se une a la arginina de la H3 (H3R2), participa en la unión de TTD a la marca H3K9me3, es requerido para la ubiquitinación de la H3 mediada por UHRF1, y contribuye a la reorganización a gran escala de la heterocromatina pericentromérica [81–85].

La H3 ha sido reportada como potencial sustrato para ubiquitinación, con lo cual sería una vía para el reclutamiento de DNMT1. Son dos los sitios en H3 que han mostrado ser ubiquitinados en el proceso de reconocimiento por DNMT1, estos son H3K18 y H2AK119. La propuesta es que el dominio RING con actividad E3 ubiquitin ligasa de UHRF1 participa en la ubiquitinación de H3K18, mientras que RING1A/1B participa en la ubiquitinación de H2AK119, las cuales son señales de reconocimiento del DNA un/hemimetilado **Figura 9 F**. El motivo de interacción con ubiquitina (UIM) de DNMT1 se une tanto a H3K18-ubiquitinado como a H2AK119-ubiquitinado, a través de lo cual se mantiene la marca de metilación del DNA. En la **Figura 9 E y F** se muestra el esquema y posible secuencia de pasos para estos mecanismos de acción de DNMT1 [75].

DNMT1 es un polipéptido de 1616 aa. de largo con un mecanismo catalítico parecido al de la DNA-(citosina) - (5)-metiltransferasa bacteriana (M.HhaI), por tanto, ha sido estudiado a partir de esta enzima. El dominio del sitio catalítico contiene motivos de secuencia común entre las carbón-5-pirimidin metiltransferasas (I – IX) y motivos encontrados en otras proteínas de unión a adenosil-metionina, **Figura 9 D**. La afinidad de unión al sustrato y la cinética dependen de la combinación de secuencia de DNA, patrón de metilación y estructura del DNA [86]. El DNA hemimetilado tiene altas velocidades de metilación, inhibición alostérica, alta procesitividad, y relativamente moderada afinidad de unión a DNMT1 [86]. Además, se ha propuesto que la unión a sitios CG no metilados permite el cambio conformacional de la enzima de tal manera que el dominio CXXC de la DNMT1 se une a los sitios CG no metilados y posiciona a la proteína BAH1 entre este CG y el sitio catalítico de la enzima, impidiendo la metilación *de novo* [87].

Se ha determinado a nucleótidos como la poli(ADP-ribosa) como inhibidores del sitio catalítico de DNMT1, ya sea como molécula libre o unida a la poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 [88]. El incremento de poli(ADP-ribosa) es

una respuesta celular por daño al DNA [89], su incremento previene la metilación del DNA y subsecuente compactación de la cromatina, lo cual estaría permitiendo que el DNA sea accesible a proteínas de reparación del daño al DNA antes de que el sitio de daño sea empaquetado en una estructura de cromatina compacta [74,89,90].

Las DNMTs llevan a cabo un mecanismo catalítico similar, en el que hay la formación de un enlace covalente intermediario entre el sustrato y la enzima. En la **Figura 9 C** se muestra el mecanismo catalítico que las DNMTs llevan a cabo para la transferencia del grupo metilo del sustrato S-adenosil metionina (SAM) al carbono 5 de la citosina en el dinucleótido CpG, comenzando con el cambio de posición de la citosina, que en lugar de dar hacia adentro de la cadena de DNA este voltea hacia afuera. El ciclo continúa con el ataque nucleofílico al carbono 6 de la citosina por la cisteína¹²²⁶ de la DNMT1, enseguida el grupo metilo del sustrato SAM será transferido al C5 de la citosina. Finalmente ocurre la reacción de β -eliminación del hidrógeno 5 para producir a la 5 metilcitosina (5mC) [91–95].

DNMT1 tiene capacidad de unirse a sitios de replicación del DNA a través de PCNA [96]; también se une a proteínas moduladoras de la organización de cromatina como HDAC1 y HDAC2 [97,98], MeCP2 [99] y proteínas de la familia policomb [100]; proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular o de respuesta a daño al DNA como p21 [96], Rb [98], p53 [101], y PARP1 [102]; y proteínas de unión a RNA [103] y RNA polimerasa II [104].

Con respecto a las enzimas DNMT3, se ha sugerido que la actividad catalítica intrínseca de estas enzimas es lo que permite su actividad de metilación *de novo*, mientras que los factores proteicos que las acompañan en el proceso de catálisis son importantes para definir las regiones específicas en las que se llevará a cabo la metilación del DNA [105]. También se ha sugerido que las secuencias próximas a los sitios CG no metilados podrían estar jugando un papel importante para que estos sitios sean reconocidos como sustratos de las DNMT3. Además de que se ha observado la actividad catalítica elevada de estas metiltransferasas sobre los dinucleótidos CA, los cuales han tomado relevancia por su alto contenido en células madre embrionarias [106].

3.2.1.1. Regulación de la expresión y actividad de las DNMTs

Las modificaciones post-traduccionales son uno de los mecanismos por los cuales la actividad de las DNMTs puede ser mediada [107]. De entre las modificaciones que ocurren sobre estas proteínas se encuentran la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación y ADP-ribosilación. La reacción de SUMOilación ha sido observada en DNMT3a y DNMT3b, con lo cual posiblemente se modifica la capacidad de las proteínas para interactuar con otras proteínas como las HDACs [108,109]; esta reacción también se ha observado en DNMT1, presuntamente incrementando la actividad catalítica de la enzima sobre el DNA genómico [110].

Otro mecanismo de regulación de la actividad catalítica de las DNMTs es la metilación de lisinas. La metilación de la Lys1094 de DNMT1 catalizada por la metiltransferasa de lisinas SET7/9 coincide con la hipometilación global de DNA en células madre embrionarias, si la proteína desmetilasa de lisinas LSD1 está ausente [111]. Otro sitio potencial para la metilación de DNMT1 es su Lys142, cuya catálisis es llevada a cabo también por SET7. Esta marca de metilación presuntamente está promoviendo la degradación de la proteína vía proteasomal, debido a que el silenciamiento de SET7 incrementa los niveles proteicos de DNMT1 [112]. En resumen, la metilación de lisinas DNMT1 promueve la degradación de esta proteína, mientras que la desmetilación o el estado no metilado promueve su estabilidad proteica.

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones post-traduccionales que con mayor frecuencia se presenta en la célula. La adición de grupos fosfatos también ocurre sobre la proteína DNMT1, observándose esta marca en las serinas 515, 146, 143 y 127. La serina 515 es fosforilada por CDKL5 y se sugiere que permite la interacción entre el dominio N-terminal y el dominio catalítico, la cual es necesaria para la actividad enzimática de DNMT1 [113–115]; la fosforilación de la Ser146 catalizada por la CK1 δ reduce la unión de la DNMT1 sobre el DNA [116]; la fosforilación de la Ser143 por la AKT se propone como un mecanismo de estabilidad proteica dependiente del ciclo celular [112]; y, finalmente, la fosforilación de la Ser127 llevada a cabo de forma independiente por las cinasas AKT y PKC disminuye la interacción de la DNMT1 con PCNA y UHR1, afectando el reclutamiento de la DNMT1 en los sitios hemimetilados del DNA durante la mitosis [117]. El tiempo de vida media de la DNMT1 en células Jurkat es de 12 horas o mayor si la proteína está fosforilada en su serina 143, mientras que si está metilada en su lisina 142 su tiempo de vida media disminuye considerablemente a 3.5 horas [112]. Además, la DNMT3a también puede ser fosforilada en su Ser 390 y 393 dentro del dominio PWWP por la CK2, promoviendo la localización de esta metiltransferasa en regiones de heterocromatina para metilar regiones repetidas heterocromatínicas [118].

La acetilación sobre DNMT1 se ha observado en sus Lys143, 1113, 1115 y 1117 por Tip60 que en conjunto con la ubiquitinación por UHRF1 conducen a la degradación proteasomal de esta metiltransferasa [119–121].

La regulación de la actividad de las DNMTs también es llevada a cabo por RNAs no codificantes, presuntamente impidiendo la metilación del gen del que provienen y con ello bloqueando la metilación de dicho gen [122].

Estudios sobre las diferencias en los niveles de expresión de DNMT1 entre diferentes líneas celulares han sugerido otra forma de regulación de DNMT1, la cual es llevada a cabo a través de las proteínas del complejo APC, CDC20 y FZR1. FZR1 es un adaptador que permite el mantenimiento de la fase G1 del ciclo celular, ya que reconoce a ciclinas tipo D promoviendo su destrucción. Las proteínas que son sustrato de CDC20 deben contener las secuencias de destrucción RXXL o cajas KEN, un criterio que es cumplido por las dos secuencias RXXL que se encuentran en el dominio N-terminal aminoácido 118 y la caja KEN del dominio N-terminal aminoácido 644 de DNMT1. CDC20 reconoce al sustrato con secuencias RXXL o caja KEN, posteriormente FZR1 reconoce a la proteína CDC20 con caja KEN y lo recluta al complejo APC para que la proteína en cuestión, en este caso DNMT1, sea ubiquitinada y degradada. La proteína reguladora de la fase mitótica del ciclo celular MAD2 es un inhibidor de la proteína CDC20 y estudios llevados a cabo en diversas líneas celulares tumorales muestran que esta proteína está incrementada, lo que coincide con el incremento y estabilidad proteica de la DNMT1 [123,124].

3.2.1.2. Metilación del DNA

La metilación del DNA es una marca común en los genomas de diversos organismos que puede llevarse a cabo en el carbono 5 o el nitrógeno 3 de la citosina o en el nitrógeno 6 de la adenina, sin embargo, en los eucariontes esta marca es más frecuente como 5'-metil citosina (5mC) y preferentemente en el dinucleótido 5' – citosina – fosfato – guanina – 3' (CpG) [125,126]. La catálisis de esta marca es realizada tanto química como enzimáticamente por DNMTs en 5mC y 3mC, mientras que el mecanismo de acción involucrado para establecer la marca 5mA es aún desconocido [127].

Durante la evolución, la secuencia CpG ha ido desapareciendo progresivamente de los genomas, en el genoma humano y de otros organismos superiores la frecuencia con la que se presenta este dinucleótido es de entre 5 al 10% [128]. Normalmente las células diferenciadas humanas poseen del 70 al 90% de sitios CpG metilados concentrados en secuencias repetidas en regiones intergénicas e intrónicas, en donde típicamente se encuentran transposones [129,130]. Existen regiones del DNA denominadas islas CpG, las cuales mantienen la frecuencia de sitios CpG esperados, estos son que el contenido G+C mayor al 60% y con un radio de CpG/GpC de al menos 0.6. Alrededor del 10% de estas regiones están metiladas o acaso presentan 20% de cambios en el estado de metilación, lo cual sugiere que no serán eliminadas con el paso del tiempo, ya que se disminuye la probabilidad de mutaciones por transiciones C – T en este tipo de regiones [128].

Alrededor de la mitad de los genes que posee el ser humano tiene islas CpG en su región 5', de entre los más importantes que tienen estas características son los llamados "genes endógenos", mientras que la otra mitad no poseen islas CpG, sin embargo, presentan sitios CpG individuales en regiones regulatorias que pueden ser metilados con patrones célula y tejido específicos, modulando así la transcripción de estos genes [128].

Como ya se mencionó, la metilación del DNA está catalizada por metiltransferasa ya sea *de novo* o del sustrato hemimetilado, mientras que la desmetilación es llevada a cabo en parte por dioxigenasas miembros de la familia de enzimas de traslocación diez-once (TET), **Figura 9 A**.

Como parte del proceso de desmetilación en el que TET actúa hay las subsecuentes oxidaciones de 5mC a 5' – hidroximetilcitosina (5hmC), 5' – formilcitosina (5fC) y 5' – carboxicitosina (5caC). Uno de los mecanismos de acción que se ha propuesto es en el que TET oxida a 5mC a 5hmC, posteriormente a 5fC y a 5caC, a continuación, el mecanismo de reparación BER a través de la enzima DNA timina glicosilasa (TDG) actúa para remover el residuo modificado (timina, 5hmC, 5fC, 5caC o 5hmU) y restaurar a la citosina [131], **Figura 9 A**.

La desmetilación de sitios CpG a través de la acción de TET/TDG es conocida como desmetilación activa, mientras que la desmetilación por pérdida de acción de DNMT1 es conocida como pasiva, pues la marca se pierde paulatinamente de replicación a replicación. Los cambios de marca de 5mC a sus formas oxidadas han sido propuestas como mecanismos de mantenimiento de sitios CpG no metilados, particularmente de aquellos ligados a improntas génicas [131].

3.2.1.3. Inhibidor de DNMTs: 5' – aza – 2' – desoxicitidina

La 5' – aza - 2' – desoxicitidina (5AzadC) es un profármaco análogo de citidina usado en pacientes con padecimientos hematológicos malignos. Su historia química comienza con los estudios quimiofarmacéuticos de su antecesor, la 5' – azacitidina. En 1964, 5AzadC fue diseñada a partir de esta molécula fue diseñada por Pliml y Sotorm y probada como compuesto con mayor potencia que su predecesor [132,133]. Es un compuesto con actividad farmacológica de antileucemiantes [134] y antineoplásico para leucemia mieloide y síndrome mielodisplásico [135].

La vía de administración más usada para este fármaco es la infusión intravenosa. Su concentración en fase estacionaria debe ser por arriba de su concentración mínima citotóxica, la cual es de 10^{-7} M [136]. Por otro lado, una administración por infusión continua ha mostrado ser lo más adecuado para los pacientes en tratamiento, pues con un tiempo de exposición de 90 horas se asegura que haya habido recambio celular, que en pacientes ha sido observado ser mayor a 90 horas. Para que la 5AzadC pueda afectar el ciclo celular necesita ser incorporada al DNA, es por ello que una infusión continua de al menos 90 horas es lo adecuado para lograr su efecto, el cual no es de inhibidor del ciclo celular sino de hacer más lenta la progresión de

entrada de G1 a fase S [135]. En experimentos *in vitro* también se ha determinado la relevancia de la duración de la exposición al compuesto, ya que la CI_{50} para la formación de colonias transformadas de células leucémicas HI-60, Molt-3 y RPMI-8392 fue de 10 μ M por una hora, mientras que la exposición durante 24 horas disminuyó a 0.1 μ M la CI_{50} [137].

Los procesos celulares que este compuesto altera son diferenciación, apoptosis y senescencia, favoreciendo la inducción de estos en células leucémicas, reparación de daño al DNA e inhibe angiogénesis, presuntamente por la reactivación de genes como c-myc, p16, p14, E-cadherina, p15, MGMT, etc. [137].

El compuesto sufre extensa biotransformación en hígado y bazo, en donde es fosforilada por la desoxicitidina cinasa bioactivando el compuesto al metabolito farmacéutico activo 5-aza-2-desoxicitidina trifosfato, sin embargo, también es biotransformado por la timidin desaminasa a sus metabolitos inactivos 5-aza-2-desoxiuridina y 5-aza-2-desoxiuridina monofosfato, los cuales son fáciles de excretar y no son incorporados al DNA. Tiene un tiempo de vida media de cinco minutos debido a que su paso a la célula es mediado por transportadores de nucleósidos como SLC28A/22/15, SLC29A y ABC [137].

En cuanto a dosis, tiempo de exposición y efecto, los esquemas de tratamiento han ido cambiando hasta establecer el más eficaz. Al inicio se reportó que concentraciones altas de 5AzadC tienen efecto citotóxico en pacientes con leucemia hasta que se comprobó que concentraciones bajas inducen a la diferenciación celular, siendo la máxima dosis tolerada de 1500-2250 mg/m² [135]. El efecto adverso más común por 5AzadC es la mielosupresión [138].

Su farmacodinamia se resume en lo siguiente, una vez en el organismo, 5AzadC es fosforilada por la deoxicitidina cinasa a su forma activa beta- anomérica, **Figura 10**, el cual es sustrato de la DNA polimerasa alfa [139] e inhibidor por unión covalente de la DNMT1 [140]. Se pensaba que el mecanismo de inhibición de DNMT1 por 5AzadC era dependiente de incorporación del 5AzadC al DNA, sin embargo, un estudio reciente mostró que la degradación de DNMT1 se da antes que la incorporación de la 5AzadC. El mecanismo propuesto es la inducción de la degradación proteasomal de DNMT1 por 5AzadC [141].

Este compuesto ha demostrado que su exposición por 48 – 72 h en diversas líneas celulares logra pronunciada disminución del estado de metilación del DNA celular [142]. No se le ha conferido actividad mutagénica puntual, pero sí capacidad genotóxica debido a la generación de aberraciones cromosómicas. En rata no hay reportes que confirmen capacidad carcinogénica, pero en ratón sí. En ratón, presuntamente por inestabilidad genómica atribuida a su actividad como agente hipometilante del DNA [143].

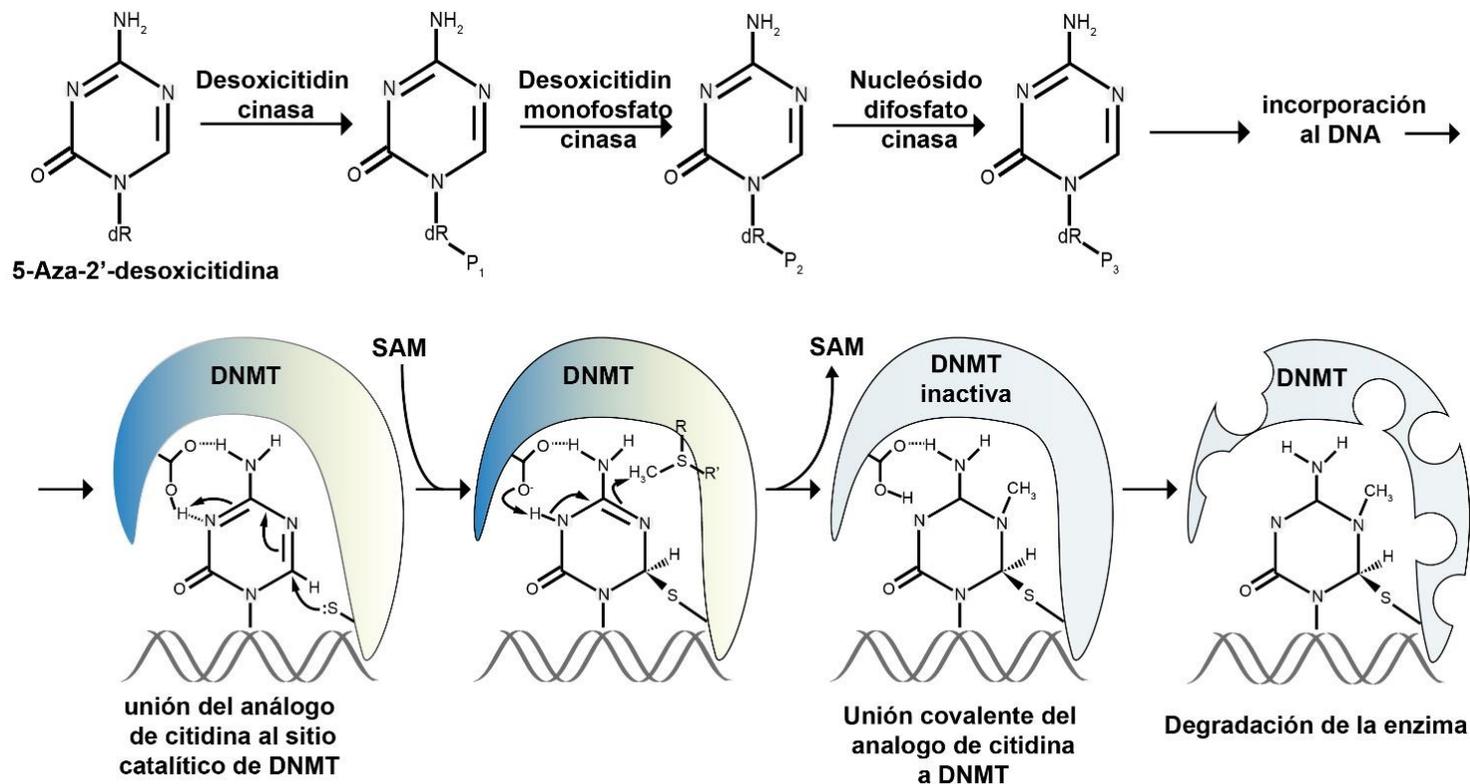


Figura 10. Biotransformación de 5-aza-2'-desoxicitidina y su progresión a la inhibición de DNMTs.

La imagen comienza con la conversión metabólica de 5AzadC a 2-desoxi-5-azacitidina-trifosfato, el cual es incorporado al DNA en lugar de 2-deoxycitidina-trifosfato por acción de la DNA polimerasa, un proceso determinado en mamíferos. Una vez incorporado en el DNA, se observa a la DNMT llevando a cabo su actividad metiltransferasa, sin embargo, al contener un N en la posición del C5 de la citidina el complejo unido covalentemente a la DNMT queda atrapado, pues no puede ser liberado mediante β-eliminación a través de su C6. Las DNMTs covalentemente unidas a 5AzadC son degradadas, resultando en su disminución en el contenido celular. Imagen con información de [142,144].

3.2.2. Desacetilasas de histonas

En 1961 Phillips descubre que una molécula de acetato puede ser tomada e incorporada a las histonas. Posteriormente se propone a la acetilación de histonas como un mecanismo reversible y dinámico para la activación, así como represión de síntesis de RNA; también se determina la acetilación de proteínas de alta movilidad en la cromatina (HMG), la actividad desacetilasa de histonas en el núcleo, la acetilación en el grupo ϵ -amino de su lisina (Lys – K) [145], y que estos residuos de lisinas son porciones muy conservadas en la región N-terminal de las histonas [146].

La arquitectura cromosómica es un factor importante en regulación de la expresión génica [147]. La unidad básica para esta regulación la establece la conformación nucleosomal entre proteínas y DNA: 146 pares de bases de DNA alrededor de un tetrámero de histona 3/histona 4 y dos dímeros de histona 2A/histona 2B. Esta unidad básica está a su vez modulada por modificaciones postraduccionales de las histonas de las cuales las más estudiadas son las acetilaciones. Otras modificaciones postraduccionales de los residuos de histonas son: metilación [148], propionilación y butirilación [149], fosforilación [150], ubiquitinación [151], sumoilación [152], ADP ribosilación [153], glicosilación [154], biotinilación [155], y carbonilación [156]. La acetilación de lisinas no sólo se restringe a los residuos de histonas sino también a otras proteínas, con lo cual se logran cambios en las interacciones y funciones de histonas-DNA, histonas-histonas, e histonas-proteínas. De las principales acetilaciones en Lys se encuentran aquellas que ocurren en la Lys9 y la Lys14 en la histona 3, y las que ocurren en las Lys5, Lys8, Lys12 y Lys 16 en la histona 4 [157].

Los tallos de las histonas dentro del nucleosoma confieren carga positiva al polímero de DNA estabilizándolo en fibras condensadas. La acetilación de histonas permite la neutralización de esta carga y, por consecuencia, la disminución de las interacciones electrostáticas entre las histonas y el DNA, facilitando así el acceso a factores transcripcionales. Sin embargo, también está la posibilidad de que los residuos de histonas por sí mismos estén participando en la unión de factores de transcripción debido al reconocimiento de los cambios postraduccionales producidos en las histonas. Por consiguiente, la acetilación no sólo conduce a la activación de la expresión génica sino también a su represión. Estas consecuencias dependerán de la naturaleza del gen y de las proteínas involucradas en los mecanismos regulación.

Adicional a la acetilación de histonas alrededor de 60 factores de transcripción son regulados mediante acetilación, esta marca también está modulando la acción de proteínas de reparación del daño al DNA, replicación metabolismo, dinámica del esqueleto, apoptosis, plegamiento proteínico, y múltiples proteínas de señalización celular [158].

Los niveles equilibrados de acetilación de histonas resultan del fino balance entre la acción de acetiltransferasas de histonas y HDACs [159]. La primer HDAC fue descubierta por Taunton *et al.* [160], posteriormente Furukawa *et al.* [161] aisló un cDNA homólogo a RPD3 de levadura, y Schreiber [160] determinó que dicho cDNA corresponde a HDAC1 con 60% de identidad a RPD3.

Al momento hay cuatro clases de HDACs, las cuales participan en diversos mecanismos de regulación postraducciona y traduccional, **Figura 11**. Estas HDACs a su vez se dividen en aquellas dependientes de Zn^{2+} en su centro activo y aquellas dependientes de NAD^+ , **Figura 12**:

- Clase I: homología con la RPD3 de levadura. La constituyen las proteínas HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8, las cuales son aproximadamente de 350-500 aa. de largo y, en general, están expresadas en todo el organismo y localizadas en el núcleo, con excepción de HDAC3 la cual también ha sido encontrada en citoplasma. Estas proteínas presentan alta actividad enzimática sobre sustratos tipo histonas.

HDAC1 y HDAC2 comparten el 82% de homología y, generalmente, son encontradas juntas en complejos represivos como Sin3, NuRD, CoREST, y PCR2, los cuales tienen la capacidad de unirse a receptores hormonales cuyo ligando está ausente. Por sí solas estas desacetilasas de clase II carecen de actividad catalítica [162]. Por su lado HDAC3 es encontrada en co-precipitados con HDAC4, HDAC5 y HDAC7 en complejos proteicos como SMRT y N-CoR [163,164]. HDAC3 también tiene la capacidad de mediar la interacción entre Rb y RbAp48 por lo que ha sido señalada como una proteína reguladora del ciclo celular. En lo que respecta a HDAC8 no ha sido encontrado formando parte de algún complejo proteico [165].

- Clase II: homología con la Hda1 de levadura. La conforman las proteínas HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, y HDAC 10, cuyo largo es de aproximadamente 1000 aa. Este grupo contiene varios motivos proteicos característicos y bien conservados dentro de su grupo. Algunos de sus miembros tienen hasta dos dominios catalíticos. Estas proteínas son transportadas del citoplasma al núcleo en respuesta a estímulos celulares, por lo que se les encuentra en ambos compartimentos. En algunos casos tienen como sustratos proteínas distintas a las histonas.

HDAC4, HDAC5 y HDAC7 forman la clase IIa, estas proteínas poseen un dominio N-terminal largo con sitios de unión conservados para el factor de transcripción factor potenciador de miocitos 2 (MEF2, *myocyte enhancer factor 2*), y para la chaperona 14-3-3. Las proteínas de la clase IIa son fosforiladas por la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK) y por la proteína cinasa D (PKD), con lo cual se unirán CRM1, un factor de transporte celular, para permitir su transporte del núcleo al citoplasma. En el citoplasma se unirán a la chaperona 14-3-3 con lo cual las proteínas clase IIa serán

retenidas en el citosol. Mientras tanto, dicha fosforilación causa la disociación de las proteínas de la clase IIa de MEF2, por lo cual esta proteína podrá unirse a la histona acetilasa p300 y fomentar la activación transcripcional [166]. Estos eventos son muy particulares de la diferenciación celular de células musculares. HDAC4 es encontrada con alta expresión en corazón, cerebro y músculo esquelético [167–169].

HDAC6 es más cercana evolutivamente a HDAC10, es una proteína única entre la familia de HDACs debido a sus dos dominios catalíticos. Actúa como una desacetilasa de α -tubulina regulando la motilidad celular dependiente de microtúbulos [170], por lo tanto su localización es citoplasmática. HDAC6 también participa en la desacetilación de Hsp90, del receptor de glucocorticoides, y de factores transcripcionales como TFIIE β , TFIIF, p53, NF- κ B, GATA1, EKL, e interferón- β , con lo cual se afecta la función, capacidad de unión al DNA o inclusive induce la degradación de estas proteínas [171].

HDAC10 tiene la capacidad de unirse con varias HDACs indicando la posibilidad de que más que una proteína desacetilasa es un reclutador de sus contrapartes, aunque esta proteína por sí sola sí presenta actividad desacetilasa [172,173].

- Clase III: homología con Sir2 de levadura. La conforman siete proteínas divididas en cuatro subclases (Sirt1 – 7) [174]. SIRT1, 2 y 3 pertenecen a la clase I, SIRT4 a la clase II, SIRT5 a la clase III, y SIRT6 a la clase IV. SIRT1 se localiza principalmente en el núcleo, bajo determinadas condiciones es transportado a citoplasma, lo cual muestra que proteínas tanto nucleares como citoplasmáticas están bajo la regulación de esta desacetilasa [175]. SIRT2 se encuentra primordialmente en el citoplasma, donde desacetila a α -tubulina, sin embargo también puede ser transportada a núcleo durante la transición de fase G₂-M para desacetilar a H4, sugiriendo el control de la condensación cromatínica durante la metafase [176]. Por su parte, SIRT3, 4 y 5 están localizadas en mitocondria, sugiriendo participación en el metabolismo energético y en el envejecimiento. SIRT6 es predominantemente nuclear, sin presencia en el nucléolo. SIRT7 es una proteína que se encuentra en el nucléolo [177].

		Actividad	Proteínas asociadas	Ubicación	Función en daño DNA	Vínculo con cáncer
Clase I	HDAC1	Desacetilasa	H3K56, P21, P53, PCNA TopII, ATM, ATR, RFC, ING1a, APE1/Ref1, BRC1	Nuclear	Reparación, replicación, y mantenimiento puntos de chequeo DNA, NHEJ, estrés oxidante.	Cáncer mama, gástrico, colorectal, pulmón, HL, hígado.
	HDAC2	Desacetilasa	H3K56, BRCA1, ATR	Nuclear	Traslado al núcleo en en daño al DNA, regula reparación DNA.	Cáncer gástrico, próstata, colorectal, HL, CTCL
	HDAC3	Desacetilasa	H3K9/K14, H4K5/K12	Nuclear/ Citoplasmática	Reparación DNA, mantenimiento orquilla replic, huso mitótico, y reparación del DNA y estabilidad genómica via HDAC3	Cáncer gástrico, mama, ALL, colorectal, HL
	HDAC8	Desacetilasa		Nuclear		Neuroblastoma
Clase IIa	HDAC4	Desacetilasa	HDAC3-NCoR, GATA1 53BP1	Nuclear/ Citoplasmática	Señalización y reparación DNA, funcionalización células T.	Cáncer colorectal, linfoma células B, próstata, renal.
	HDAC5	Desacetilasa	HDAC3-NCoR, GATA1 GATA2	Nuclear/ Citoplasmática		Meduloblastoma, leucemia, linfoma células B.
	HDAC7	Desacetilasa	HDAC3-NCoR, ER α	Nuclear/ Citoplasmática		ALL, linfoma células T
	HDAC9	Desacetilasa		Nuclear/ Citoplasmática	Reparación DNA	ALL, meduloblastoma, leucemia, linfoma.
Clase IIb	HDAC6	Desacetilasa	GADD153, α -Tubulin HSP90, HDAC11	Nuclear	Quimiosensibilización	Leucemia, linfoma, mama
	HDAC10	Desacetilasa		Nuclear/ Citoplasmática	Reparación del DNA	
Clase IV	HDAC11	Desacetilasa	HDAC6	Nuclear		Cáncer mama, renal, hepático.
Clase III	SIRT1	Desacetilasa	p53, FOXO, MyoD, Ku70, PPAR γ , NF κ B, PCAF, H3K9, H3K14	Nuclear/ Citoplasmática	Metabolismo glucosa, diferenciación, neuroprotección, secreción insulina	Leucemia mieloide aguda, colon, vejiga, próstata, glioma, piel, ovario.
	SIRT2	Desacetilasa	α -Tubulina, FOXO	Nuclear/ Citoplasmática	Control ciclo celular, deacetilación tubulina.	Glioma
	SIRT3	Desacetilasa	Complejo GHD 1, AceCS2	Mitocondrial	Producción ATP, oxidación ácidos grasos, deacetilación proteínas mitocondriales	Cáncer de mama
	SIRT4	ADP-ribosil transferasa	GHD, ANT	Mitocondrial	Secreción insulina	Cáncer de mama.
	SIRT5	Desacetilasa	CPSI	Mitocondrial	Ciclo urea	Cáncer de mama, pancreático.
	SIRT6	Desacetilasa - ADP-ribosil transferasa	Hif1 α , helicasa, NF κ B, polimerasa β	Nuclear	Telómeros y funciones teloméricas, reparación DNA	Cáncer de mama, colon.
	SIRT7	Desacetilasa	RNA polimerasa 1, EIA SMAD6	Nuclear	Transcripción RNA pol I	Cáncer de mama

	Dominio Catalítico clase I		Sitio para la proteína chaperona 14-3-3		Sitio de Zn ²⁺
	Dominio Catalítico clase IIa		Sitio de unión factor potenciador de miocitos (MEF2)		Zona rica en leucinas (dominio catalítico inactivo)
	Dominio Catalítico clase IIb		Secuencia de localización nuclear (NLS)		
	Dominio Catalítico clase IV		Secuencia de exportación nuclear (NES)		
	Dominio Catalítico clase III		Sitio de ruptura mitocondrial		

Figura 11. Dominios estructurales y funcionales de desacetilasas de histonas humanas.

En el esquema se enlista un resumen de las características de las HDACs y de su función biológica. Esquema con información de [178–181].

La clase III se diferencia de las otras clases de deacetilasas de histonas por su dependencia al cofactor NAD^+ , sin embargo, también son proteínas con Zn^{2+} como parte de su dominio catalítico. La gran variabilidad en su dominio de Zn^{2+} es lo que permite las diferentes actividades entre estas enzimas, como es el caso de SIRT5 que a pesar de tener una pobre actividad desacetilasa es muy eficiente como lisina desuccinilasa y lisina demalonilasa [182]. Con excepción de SIRT4, todas las sirtuinas poseen actividad desacetilasa, a pesar de esto, sólo SIRT1, SIRT2 y SIRT3 son verdaderas enzimas desacetiladoras [177]; SIRT6 actúa como una auto ADP-ribosil transferasa y posee pobre capacidad desacetiladora [183]. Hasta el momento, SIRT7 solo ha mostrado capacidad desacetiladora sobre H3K18 [184]. SIRT4 es una ADP-ribosil transferasa que transfiere un grupo ADP-ribosa a sus sustratos [185].

Este grupo de proteínas transfieren el grupo acetilo del residuo de lisina del sustrato en cuestión al cofactor NAD^+ , teniendo como productos nicotinamida, 2'-O-acetil-ADP-ribosa y el sustrato deacetilado [183], como se muestra en el esquema de las **Figura 12 C y D**.

- Clase IV: no se le ha encontrado un homólogo en hongos. La constituye hasta el momento la HDAC11, el cual no ha sido identificado como parte de algún complejo proteico [169].

El mecanismo catalítico propuesto para las desacetilasas clases I, II y IV, comienza con la unión del ion Zn^{2+} del sitio catalítico de la desacetilasa al oxígeno del carbonilo de la lisina, lo cual polarizará al grupo carbonilo para hacer más electrófilo a su carbono. Adicionalmente el Zn^{2+} unirá una molécula de agua, con lo cual la nucleofilicidad del oxígeno del agua se incrementará. Dicha nucleofilicidad del agua será aún más incrementada por la unión tipo puente de hidrógeno con Asp-His a los cuales estará unida la molécula de agua. El agua llevará a cabo un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo produciendo un oxianión tetrahédrico de transición el cual estará estabilizado por la unión entre el Zn^{2+} y el agua, así como por el potencial puente de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo y el grupo hidroxilo del residuo de Tyr, mientras tanto el acetato será liberado. Finalmente el nitrógeno ϵ del residuo de Lys podrá aceptar un protón de la His "externa" [171].

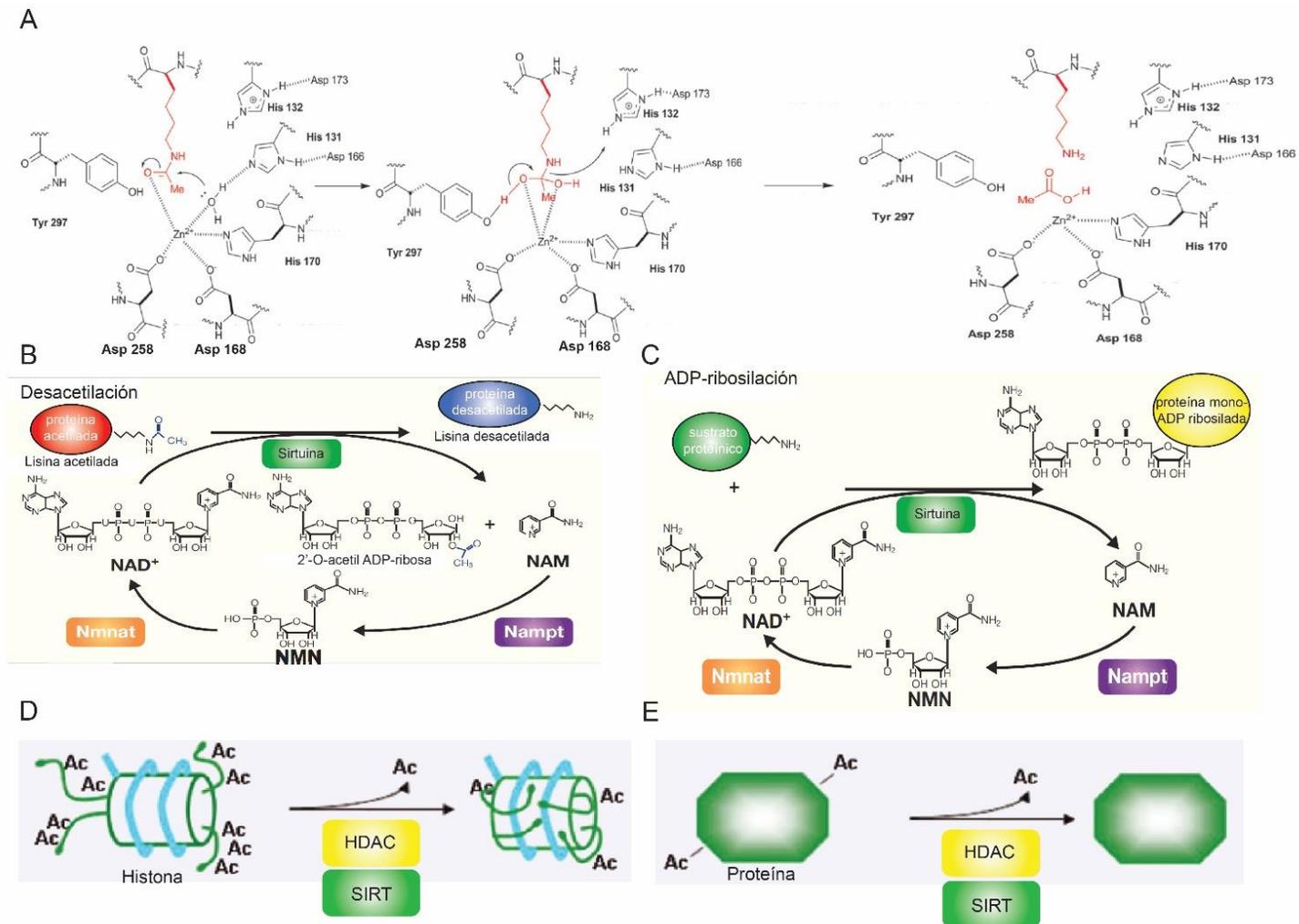


Figura 12. Reacciones catalíticas llevadas a cabo por desacetilasas de histonas.

Panel A: mecanismo catalítico de desacetilación de histonas llevado a cabo por HDACs dependientes de Zn^{2+} ; panel B: mecanismo de acción de desacetilasas de histonas dependientes de NAD^{+} ; panel C: mecanismo de acción de desacetilasas de proteínas dependientes de NAD^{+} ; panel D: esquema de tipos de sustrato para proteínas desacetilasas de, histonas y desacetilasas de proteínas. Adaptado al español de [186–188].

3.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos: Sustratos de CYP1A1

En el 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que la contaminación del aire ambiente está vinculada con el 58% de muertes prematuras de bebés debidas a infartos y muertes por isquemia del corazón, el 18% de muertes por enfermedad obstructiva pulmonar, y 6% de las muertes por cáncer pulmonar.

En el año 2013, la IARC concluyó que la contaminación del aire ambiente es un carcinógeno tipo I, posicionando al material particulado como el principal componente asociado a la incidencia de cáncer, particularmente el cáncer pulmonar, aunque también se ha establecido su asociación con el cáncer de tracto urinario y vejiga.

El material particulado es una mezcla de partículas sólidas y líquidas de sustancias inorgánicas y orgánicas suspendidas en el aire. Se les clasifica como PM10, PM2.5, PM1 y PM0.1. El PM2.5 es de particular relevancia debido a que las partículas de este tamaño penetran la barrera pulmonar, logrando entrar a torrente sanguíneo. El límite de exposición al PM2.5 establecido por la OMS es de $10 \mu\text{M}/\text{m}^3$ en promedio anual y de $20 \mu\text{M}/\text{m}^3$ en promedio anual para PM10. A este respecto, para el 2016, la OMS determinó que el 91% de la población mundial vive en ambientes cuya calidad de aire supera estos límites.

Las principales fuentes de PM son motores de combustión tanto diesel como petróleo, combustibles orgánicos para la producción de energía dentro de las casas y en la industria como carbón, lignita, aceites pesados y biomasa, así como otras actividades industriales tales como construcción, minería, manufactura de cemento, cerámica y ladrillos, y fundición. En la Ciudad de México, la combustión de diesel aporta el 35.7% del PM2.5, la combustión de gasolina el 10.76%, la industria el 20.2%, la erosión del suelo el 26.5% y otras fuentes el 6.88% [189].

El PM2.5 está compuesto principalmente de nitratos, sulfatos, compuestos orgánicos, metales, partículas de polvo y compuestos orgánicos volátiles, aunque el porcentaje de composición varía entre áreas y estaciones del año o condiciones climáticas. Para el 2006, la Ciudad de México reportó un promedio anual de $39 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM2.5, el cual consistió 16% de corteza, 3% de amonio, 7% de nitratos, 10% de sulfatos, 5% de carbón elemental y 55% de compuestos orgánicos.

Dentro de los compuestos orgánicos que constituyen al PM2.5 se encuentran los HAPs, los cuales consisten en más de dos anillos fusionados compartiendo un par de átomos entre los anillos. Los HAPs más simples son el fenantreno y antraceno con 3 anillos fusionados. Aunque se han registrado alrededor de 500 compuestos de este tipo, sólo algunos de estos son catalogados por la IARC como carcinógenos tipo I, 2A y 2B, por lo cual se tiene un listado de 16 HAPs con información suficiente para ser los representantes de este grupo de compuestos [190].

Los HAPs son compuestos de origen natural y antropogénico, cuya principal formación es través de combustiones incompletas a temperaturas en un rango de 350°C – 1200°C para formaciones pirogénicas y desde 100°C para formaciones petrogénicas [190].

Las características fisicoquímicas que hacen a estos compuestos tener efectos tóxicos sobre los organismos son: su relativa baja presión de vapor, su adsorción a superficies de partículas sólidas acarreadoras, su coeficiente de partición en tejidos, y sus límites de solubilidad las fases lípido-agua en los tejidos. Además, son sensibles a la luz, son buenos conductores, resistentes a la oxidación y reducción, y son fisiológicamente activos. Dichas características permiten que estos compuestos tengan una particular vía metabólica dentro del organismo, conduciéndolos a la generación de procesos que causarán daño a las células. Uno de los daños más importantes es la generación de cáncer [190].

Una vez liberados al aire ambiente los HAPs son encontrados en dos fases, vapor y partícula. Por otro lado, en términos generales, del total de HAPs en el aire ambiente la mayor concentración de estos se presenta en vapor, alrededor de 741 ng/m³ versus 12 ng/m³ que se localiza en partícula. Los HAPs con baja presión de vapor serán absorbidos más fácilmente en las partículas, sin embargo, las estaciones del año y el tipo de clima del lugar en el que se hallen afectarán la proporción de HAPs en vapor o en partícula. En verano y regiones tropicales es de esperar mayor concentración de HAPs en vapor, mientras que en invierno y regiones nórdicas se evidenciará mayor concentración en partículas. Los HAPs de alto peso molecular con cinco o más anillos están asociados a partículas de tamaños menores a 2.5µm [190].

La principal vía de exposición a HAPs en la población en general es vía pulmonar (aire ambiente, aire casa y fumar, humo incendios o fuego), gastrointestinal (alimentos y agua procesados o contaminados), y dérmica (ocupacional) [190].

Los HAPs encontrados en los suelos presentan baja toxicidad para organismos invertebrados terrestres, excepto en aquellos suelos altamente contaminados. Los efectos fitotóxicos por parte de los HAPs son raros, ya que las plantas contienen sustancias que los protegen contra los HAPs, además de que algunas pueden sintetizarlos para que actúen como hormonas de crecimiento [190].

Los HAPs son ligeramente persistentes en el ambiente y pueden bioacumularse, pero no bio-magnificarse, debido al metabolismo que sufren en algunos organismos.

Los alimentos humeados y cocinados a altas temperaturas son la principal fuente de formación de los HAPs. En pescados y carnes rojas humeadas se pueden encontrar hasta 200 µg/Kg de HAPs; en carne al carbón hasta 130 µg/Kg; y alimentos procesados a altas temperaturas cantidades de entre 0.01 a 1 µg/Kg de HAPs [190].

En cuanto al consumo de cigarrillos, otra forma de exposición a HAPs, el humo de la corriente principal del cigarro es la principal fuente de exposición a HAPs para los fumadores con alrededor de 1 – 1.6 µg de HAPs totales por cigarrillo en un promedio de 12 mg de material particulado por cigarro. La corriente secundaria del humo de cigarrillo (proveniente de quema del cigarro), es la principal fuente de exposición a HAPs dentro de casa, presentando alrededor de 52-95 ng BaP/g cigarro y 14-24 mg HAPs/cigarro, tres veces de BaP y cinco veces de HAPs más que la corriente primaria [191].

Los límites permisibles de exposición a HAPs son 0.2 mg/m³ por 8 horas según OSHA, 0.1 mg/m³ por 10 horas laborales por la NIOSH, 0.2 ppb como cantidad máxima contaminante en el agua según EPA [190].

El metabolismo de los HAPs ocurre en casi todos los órganos, particularmente en aquellos ricos en tejido adiposo. Una vez que los HAPs entran al organismo requieren varios pasos de activación metabólica por enzimas específicas. En términos generales, la primera reacción es de epoxidación, los epóxidos de HAPs pueden ser conjugados con glutatión para su desintoxicación, sin embargo, también pueden convertirse en fenoles y dioles, los cuales pueden no ser lo suficientemente polares para ser eliminados y necesitan un segundo paso de conjugación, generalmente con sulfonato o glucurónido para ser eficientemente eliminados, la mayoría de los metabolitos son excretados en heces y orina.

La intoxicación aguda por HAPs se caracteriza por irritación de ojos, náuseas, vómito, diarrea y confusión. También causan irritación de piel e inflamación. Por su lado, la exposición crónica a HAPs exhibe disminución del funcionamiento del sistema inmune, cataratas, daño al riñón e hígado, problemas respiratorios, síntomas tipo asma, anormalidades en el funcionamiento de los pulmones; la exposición repetida a piel causa enrojecimiento e inflamación; la misma exposición crónica incrementa predominantemente el riesgo a cáncer de piel y pulmón, así como a cáncer de vejiga y tracto gastrointestinal en menor extensión [190].

Como ya se mencionó, en la sección de estructura proteica de CYP1A1, el sitio catalítico de esta proteína permitirá la unión de compuestos anillados y planares, como los compuestos endógenos bilirrubina, eicosanoides, prostanglandinas, etc.; y los exógenos como HAPs, AHA y policlorinados. La mayoría de los HAPs no son genotóxicos por sí mismos y necesitan ser biotransformados a diol-epóxidos, quinonas o especies reactivas de oxígeno para reaccionar con el DNA y así inducir su daño genotóxico.

Los HAPs seleccionados para llevar a cabo esta tesis doctoral fueron cuatro compuestos cuya capacidad de unión a AHR varía desde muy baja, intermedia a alta. En la **Tabla 2. Potencias de unión a AHR, inducción de CYP1 y actividad EROD de HAPs.** se muestra sus capacidades de unión a AHR. Por otro lado, estos están clasificados como carcinógenos completos, por lo cual son utilizados como inductores de dicho proceso patológico en modelos de carcinogénesis química. A continuación, se presenta una descripción de cada uno de estos compuestos.

3.3.1. Benzofluoreno

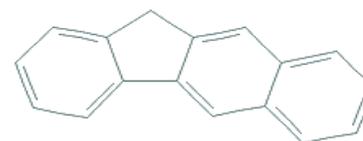


Figura 13. Estructura de BF.

También conocido como 11H-benzo[b]fluoreno, benzo[b]fluoreno o 2,3-benzofluoreno (BF). Es un HAP proveniente de humo de tabaco, contaminación ambiental, e ingesta de alimentos y agua contaminada con productos de combustión orgánica.

Está clasificado como carcinógeno tipo 3 por la IARC debido a que no mostró ser positivo en el ensayo de iniciación-promoción de cáncer de piel ni en los ensayos de mutagenicidad en la prueba de Ames, los cuales se reportan como no concluyentes [192]. Pese a no dar indicios de ser mutagénico, en estudios de desarrollo ha mostrado ser teratógeno, ya que el pez zebra expuesta a 3 μM del compuesto, 3 horas pos-fertilización por 120 horas, genera malformaciones en los embriones del tipo acumulación de fluido en la región del pericardio y placenta, así como malformaciones cerebrales. Se sugiere que sus efectos teratogénicos pudieran estar relacionados con su capacidad de unión a AHR, además de que es un ligando débil del receptor de estrógenos. Por otro lado, 24 horas de exposición a este compuesto, 96 horas pos-implantación de este organismo, incrementa la expresión de *cyp1a1*, *per2*, *cry1*, *odc1*, los cuales son genes involucrados en el metabolismo de xenobióticos y ciclo circadiano; mientras que disminuye la de *wnt11*, *hoxa3*, *alcam* y *dusp1*, los cuales son genes vinculados con transporte molecular y metabolismo de lípidos [193]. Su interacción con la vía de AHR también fue comprobada en la línea celular de hepatoma de humano, HepG2, en donde después de 24 horas de exposición a 5 μM de este compuesto se obtiene la inducción de genes como *CYP1A1*, *CYP1A2*, *AKR1C1*, *NQO1*, los cuales son parte del set de genes inducidos por AHR [194].

Estudios sobre su metabolismo no han sido llevados a cabo, sin embargo, al ser un HAP con capacidad de inducción de CYP1A a través de AHR, es de esperar que sea oxidado por CYP1 para producir el esperado diol-epóxido de BF.

Tabla 2. Potencias de unión a AHR, inducción de CYP1 y actividad EROD de HAPs.

Compuesto	Valores de CE_{50} (M)		
	Potencia de unión a AHR	Inducción de CYP1	Actividad EROD
2,3-Benzofluoreno	1.3×10^{-5}	1.0×10^{-6}	1.0×10^{-6}
Benzo[a]pireno	3.6×10^{-7}	$>1.0 \times 10^{-4}$	$>1.0 \times 10^{-4}$
7,12-Dimetilbenz[a]antraceno	3.2×10^{-7}	$>1.0 \times 10^{-4}$	$>1.0 \times 10^{-4}$
3-Metilcolantreno	2.8×10^{-8}	1.3×10^{-6}	6.4×10^{-7}

La determinación de potencias de unión a AHR se hizo mediante ensayos de competencia de unión a [^3H]-TCDD. Información tomada de [195].

3.3.2. Benzo[a]pireno

EL benzo[a]pireno (BaP) es un HAP conformado por cinco anillos aromáticos. Es un cristal amarillo de olor ligero, insoluble en agua y de baja volatilidad. Es liberado al aire ambiente tanto por vías naturales como antropogénicas y removido mediante oxidación fotoquímica; reacciones con óxidos de nitrógeno, radicales hidroxilo e hidroperoxi, ozono, óxidos de sulfuro, y nitrato de peroxacetilo; y mediante la lluvia depositándose en tierra o agua. Por otro lado, en el aire es predominantemente adsorbido a partículas, pero también existe en forma de vapor a altas temperaturas. Las principales formas de exposición a BaP son laborales, de forma deliberada ante el consumo de productos de tabaco, por inhalación de aire contaminado, y por consumo de comida y agua contaminada.

El conocimiento de la capacidad carcinogénica de las fuentes que contienen BaP datan desde el siglo XVI, sin embargo, es hasta 1933 cuando el grupo de J.W. Cook aisló algunos miligramos de BaP a partir de toneladas de chapopote [196] y hasta 1955 que R. L. Cooper determinó que 500 cigarrillos contienen alrededor de $4\mu\text{g}$ de BaP [197], la cual es aproximadamente la cantidad necesaria para generar hiperplasia en explantes de pulmón [198]. Un cigarro contiene en promedio 22.5 ng de BaP [191]. Otras fuentes en las que se le encuentra son combustibles fósiles, aceites crudos, incendios forestales, combustión de maderas y carbón, escapes de vehículos motorizados; y en varios procesos de combustión industrial. Es un compuesto persistente, pero que puede ser degradado por algunos organismos, por lo que no es biomagnificable [199].

Este compuesto está clasificado como carcinógeno tipo 1 por la IARC. Es el integrante representativo de las mezclas de HAPs y, hasta ahora, es el carcinógeno más potente de entre los HAPs. Con base en estudios epidemiológicos, una unidad de riesgo para cáncer de pulmón ante la exposición a aire ambiente contaminado con HAPs es de $8.7 \times 10^{-5} \text{ ng/mg}^3$ de BaP, mientras que la exposición a lo largo de la vida generará un riesgo de cáncer de 1/10 000, 1/100 000, y 1/1 000 000, para 1.2 ng/m^3 , 0.12 ng/m^3 , y 0.012 ng/m^3 , respectivamente [4].

En ingesta oral, el BaP no es absorbido en estómago pero sí en intestino, y el grado de esta absorción dependerá del vehículo en el que esté disuelto [200]. Este compuesto es principalmente eliminado en sus formas metabolizadas en heces, con aproximadamente 20% de excreción en orina, teniendo un pico máximo en bilis a las 2 horas de ingesta y a las 24 horas se tiene la excreción total [197,201,202]. Para su distribución, BaP se une a lipoproteína α y a γ -globulina [202], también es transportado por quilomicrones, y en el plasma es acumulado en esferas lipídicas [203]. Dentro de las células se localiza en mitocondria, Golgi, retículo endoplásmico liso, membrana plasmática, envoltura nuclear y, con menor intensidad, en lisosomas. La dosis de referencia para la exposición a BaP vía oral para toxicidad para el desarrollo es de $3 \times 10^{-4} \text{ mg/Kg/día}$,

mientras que el factor de pendiente para exposición oral a BaP es de 1 mg/Kg/día para respuesta a tumores en el tracto digestivo [199].

Tras la inhalación de BaP, este compuesto se distribuye rápidamente en varios tejidos, siendo el hígado, esófago, intestino delgado y sangre los que presentan altos niveles durante los primeros 30 minutos tras su exposición [204,205]. La dosis de referencia para toxicidad para el desarrollo tras la exposición vía inhalatoria de BaP es de 2×10^{-6} mg/m³, mientras que el factor de pendiente para esta vía de exposición es de 6.4×10^{-4} µg/m³ para tumores en el sistema respiratorio superior y tracto digestivo [199].

Por las características fisicoquímicas del compuesto, su efecto dependerá de la toxicocinética que se presente en el animal, tejido o modelo biológico en el que se esté evaluando. Los efectos que produce son, proliferación celular, estrés oxidante, interferencia en vías de transducción de señales, daño al DNA, proteínas y lípidos, establecimiento de mutaciones, y muerte celular. Estos efectos pueden tener múltiples consecuencias, entre ellas, condiciones patológicas como, asma, enfermedades pulmonares, cardiovasculares y cerebrales, y cáncer [4].

Esta molécula, también conocida como 3,4-benzopireno, posee la denominada región bahía característica de los HAPs, la cual es susceptible a oxidación o formación de iones radical, pero inmune a conjugación y desintoxicación. Esta característica conduce a los metabolitos oxidados en esta región a ser electrófilos muy reactivos con el DNA, proteínas y lípidos. El estudio del metabolismo de BaP condujo a que entre los años 1973 a 1978, tras enormes esfuerzos de varios grupos de investigación, se descubriera el metabolito mutagénico de BaP, el isómero (+)-*trans*-7,8-diol-9,10-epóxido BaP (BPDE), el cual se une covalentemente al DNA [5][206]. El mapa metabólico de BaP hasta ahora dilucidado se muestra en la **Figura 14**.

El mecanismo general de generación de tumores por BaP comienza con su biotransformación a compuestos altamente reactivos con el DNA. Tres posibles reacciones han sido identificadas con los siguientes productos de la biotransformación de BaP: metabolitos diol-epóxidos, metabolitos radicales catiónicos, y especies reactivas de oxígeno generadas durante el ciclo catalítico de CYP o vía los metabolitos orto-quinonas, los cuales también son productos de biotransformación de BaP. Estas reacciones darán como resultado la formación de aductos o el daño al DNA por ROS, los cuales pueden conducir a la formación y fijación de mutaciones, siendo de relevancia aquellas que se produzcan en genes supresores de tumor u oncogenes asociados con la iniciación de tumores. Finalmente, BaP y sus metabolitos también promueven la expansión clonal de células mutadas durante los procesos conocidos como promoción y progresión del cáncer. La sola exposición a BaP produce todo el proceso de carcinogénesis, por lo que se le cataloga como carcinógeno completo.

Se ha demostrado que los metabolitos de BaP se unen covalentemente a RNA, proteínas tipo no histonas, DNA, e histonas [207]. La reacción entre los metabolitos diol-epóxidos del BaP con el DNA ocurre preferencialmente con los grupos amino exocíclicos de los nucleótidos guanina y adenina, generando aductos voluminosos [208,209]. De estas dos reacciones, los aductos diol-epóxidos con guanina son los que se generan con mayor frecuencia en comparación con el aducto con adenosina, a pesar de esto es este último aducto el que produce desenrollamiento de la cadena de DNA en la zona donde se localiza, lo cual conduce a la desnaturalización del DNA, así como a la ruptura de pares de bases de la cadena generando corrimiento del marco de lectura. Los aductos metabolito BaP-DNA tendrán como resultado sustituciones de pares de bases, corrimiento del marco de lectura, delaciones, arresto en fase S, rupturas de doble cadena de DNA, y variedad de alteraciones cromosómicas [190]. Aun así, las mutaciones por transversiones son las más frecuentes en la exposición por BaP, GC por TA o AT por TA [210]. BaP genera transversiones G-T en *Ha-ras* [211], *K-ras* [212–215] y *p53* [216,217].

Por su lado, los metabolitos radicales catiónicos de BaP, pese a no ser los metabolitos más potentes de unión al DNA, pueden causar aductos con el DNA que resultan en depurinaciones. La depuración más predominante ocurre en las posiciones N3 y N7 de la adenina y en la posición N-7 de la guanina [218–220]. Los metabolitos orto-quinonas pueden generar aductos que causan N-7 depurinaciones, o bien seguir una ruta redox y generar especies reactivas de oxígeno que causan daños al DNA como lo es la generación del aducto 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina [221–224].

El isómero (-)-*trans-BPDE* es el que tiene 60% de efectividad en la generación de tumores dérmicos en ratones en comparación al 2% o menos de efectividad generada por los otros tres isómeros de este diol-epóxido. El mismo (-)-*trans-BPDE* produce el 100% de tumores pulmonares en ratones inyectados vía intraperitoneal [206].

Estudios de tumorigenicidad en ratones hembras y machos expuestos vía intraperitoneal a 2 mg de BaP mostraron que las hembras son más susceptibles a desarrollar tumores, con 70% de localización entre bazo y estómago; mientras que los ratones machos presentan 62% de desarrollo de tumores y la localización de estos es 64% en tejido conectivo y órganos abdominales bajos, en un tiempo de latencia promedio de 33 semanas. Las masas tumorales generalmente se presentaron adheridas o invadiendo al menos a algún órgano abdominal como hígado, bazo, intestino, testículos, vejiga, etc. Adicionalmente, en este diseño y modelo experimental, no se observó metástasis a pulmones [225].

Estudios llevados a cabo en ratas machos y hembras expuestos vía intraperitoneal a 10 mg de BaP mostraron que el 40% de ratas hembras desarrollaron adenomas mamarios y urinarios, el 10% de las ratas macho desarrollaron fibrosarcoma abdominal, el 30% presentó adenoma de células intersticiales, y ambos sexos

desarrollaron hiperplasia de médula adrenal, en un tiempo de latencia de seis meses [225]. Múltiples estudios de desarrollo de tumores y cáncer en diversos modelos animales con diferentes órganos blanco se han llevado a cabo con BaP, de tal manera que este compuesto es ampliamente utilizado en modelos de carcinogénesis química.

La expresión de diversas proteínas es modificada después de la exposición a BaP y es dependiente del modelo en el que se evalúa, varios perfiles de expresión de genes han sido realizados, lo cuales son consistentes en cuanto al incremento de la expresión de un grupo de enzimas en particular, la familia de CYP1 [35,180,184–187]. La inducción de la expresión de esta familia es debido a la capacidad de BaP de unirse al receptor AHR,

Figura 7.

La capacidad mutagénica de BaP ha sido probada en los modelos de *Samonella typhimurium* y *Escherichia coli*, su capacidad de daño al DNA en modelos como aberraciones cromosómicas, prueba de micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas, ensayo cometa.

3.3.3. 3-Metilcolantreno

En 1935 L.F. Fieser y colaboradores reportaron la síntesis de 3-metilcolantreno (3MC) mediante dos vías, una a partir de p-bromotolueno y otra a partir de ácido cólico, mientras que otros investigadores ya hacían uso de él en el modelo de carcinogénesis química obteniéndolo a partir de ácido desoxicólico, un compuesto de origen biliar [231].

Es un compuesto sólido cristalino de color amarillo e insoluble en agua perteneciente al grupo de HAPs. Este compuesto es prototipo en la generación de modelos de carcinogénesis química. Su producción es principalmente sintética, sin embargo, su uso en investigación posiblemente ha permitido la liberación de este compuesto al ambiente, y también hay la posibilidad de que sea liberado a través de la quema de combustibles orgánicos. La exposición de la población a este compuesto es mediante la inhalación de aire contaminado principalmente, aunque el portal TOXNET del Instituto Nacional de Salud de EUA reporta la exposición a través de humo de cigarro o a través de la exposición dérmica a material particulado producto de la combustión [232].

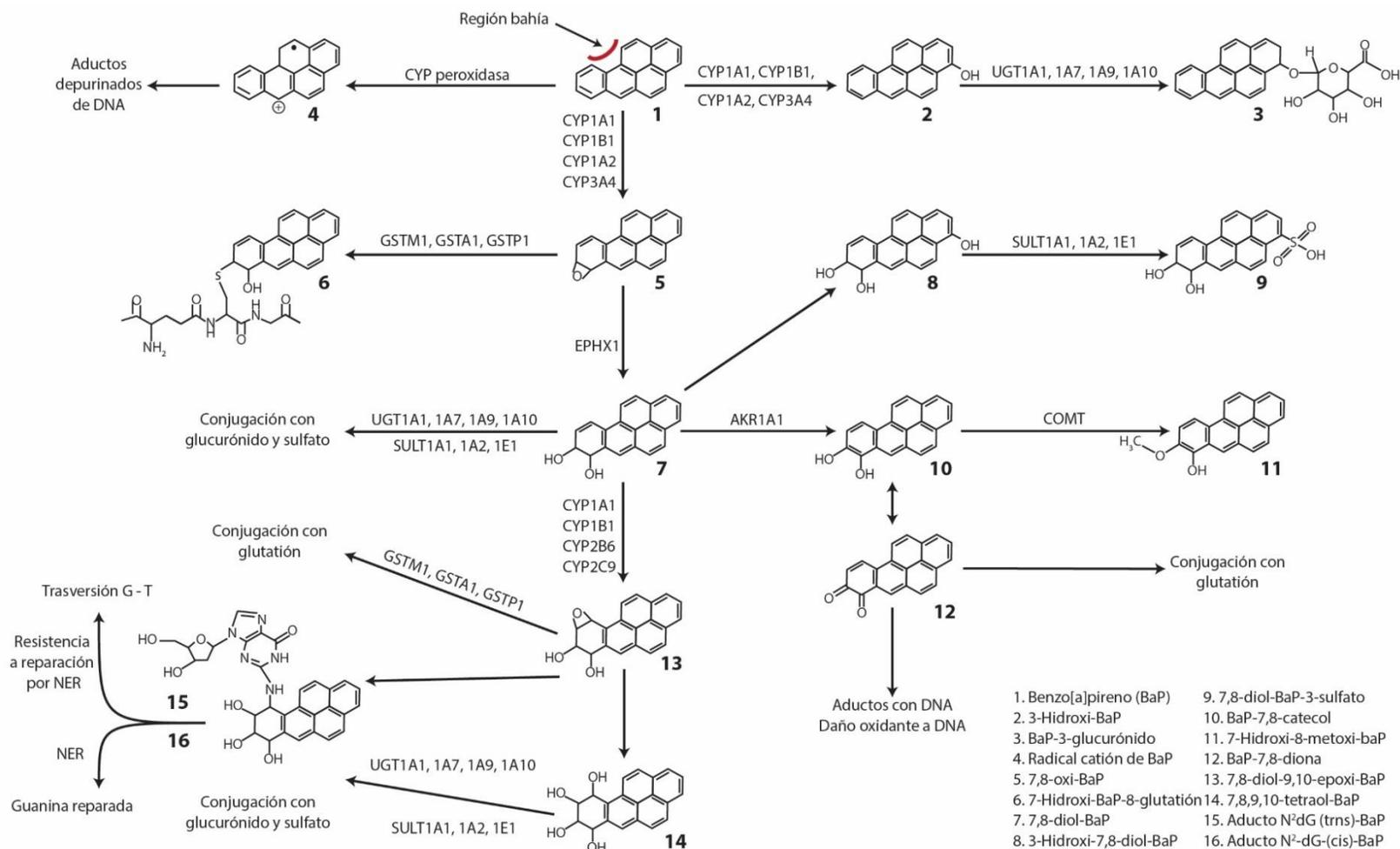


Figura 14. Mapa metabólico de BaP.

En el esquema de reacciones se puede apreciar la clásica región bahía de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, la cual les confiere su capacidad mutagénica. Las enzimas involucradas en el metabolismo de BaP son citocromo P450 (CYP), epóxido hidrolasa (EPHX), aldocetoreductasa (AKR), UDP-glucuronosil transferasa (UGT), sulfonato transferasa (SULT), catecol-*O*-metil transferasa (COMT) y glutatión transferasa (GST). El aducto formado por el metabolito BPDE y el DNA es a través del nitrógeno 2 de la guanina (N-dG). Imagen adaptada y extendida con información de [5,206,230].

En la liberación al aire ambiente, la presión de vapor de 4.3×10^{-8} que posee el 3MC indica que este compuesto puede existir tanto en la fase de vapor como en la fase particulada de la atmósfera. El 3MC contenido en la fase de vapor puede ser degradado fotoquímicamente, produciendo radicales hidroxilos, de tal manera que en aire el 3MC tiene un tiempo de vida media de 1.9 horas. Si es liberado al suelo, se espera que este hidrocarburo no sea capaz de movilidad, no pueda volatilizarse y tampoco sea fácilmente biodegradado. Si es liberado en agua, puede absorberse a sólidos suspendidos y sedimentos [233].

Desde los inicios de su uso 3MC fue un exitoso inductor de tumores dérmicos en modelos de animales de laboratorio [231]. También causa mesotelioma [234], cáncer de colon [235], y cáncer de mama [236] después de su exposición oral. Causa cáncer de hígado [237], pulmón y sanguíneo [238] en bebés que estuvieron expuestos al compuesto durante el embarazo, todo esto en modelos de animales de laboratorio. Este compuesto puede causar cirrosis e inducir cáncer de hígado [5]. Por otro lado, es un potente inductor de enzimas microsomales hepáticas, entre ellas la familia CYP1 [228]. Actualmente es utilizado en combinación con dietilnitrosamina para inducir el modelo de multi-estado de carcinogénesis pulmonar [239] y con TPA para inducir el modelo de cáncer de piel [240].

Tras su ingesta vía oral, 3MC es bien absorbido en el estómago de rata, donde es retenido por un tiempo considerable, y también es absorbido en el intestino, esta absorción es por difusión pasiva principalmente. Después de su distribución es detectado en sangre y en hígado [241], y excretado en bilis [242], en hígado los metabolitos de este compuesto unidos al DNA son totalmente reducidos entre las 4-24 horas posterior a su administración, no así en pulmón en donde además los niveles de DNA-3MC son mucho mayores que en hígado [243]. Bajas dosis de 3MC, 2.5 – 10 mg/Kg vía intraperitoneal, inducen la expresión proteica en hígado, particularmente alrededor de la vena centrolobulillar, la cual se vuelve homogénea en tanto la concentración de 3MC incrementa [244]. Este compuesto induce la expresión de *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *GR*, *GPx*, *GSTA1*, *NQR*, los cuales son parte del grupo de enzimas inducidas por AHR [207][245].

En ratas, una sola dosis de 20-25 ng/Kg de 3MC induce tanto la expresión génica como la actividad enzimática de CYP1 después de 24 horas. Estos niveles regresan a su estado normal después de 5 – 7 días. [246–248]. Los resultados *in vitro* en células HepG2 sugieren que la expresión sostenida de CYP1A1 es un mecanismo independiente de la vía de AHR, debido a que el 3MC y sus metabolitos son eliminados de 12 a 24 horas y la expresión de esta enzima sigue hasta por 96 horas después [249].

La activación de la vía de AHR por este hidrocarburo es muy particular, experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina mostraron que este compuesto induce cambios en la acetilación y metilación de H3 en genes específicos y también induce cambios en la unión oscilatoria de AHR a sus elementos de respuesta, con una periodicidad de 1.5 a 2 horas [250].

Al igual que BaP, 3MC es bioactivado vía la formación de diol-epóxidos en su región bahía y son estos metabolitos los que generaran aductos con el DNA, **Figura 15**, particularmente el metabolito 9,10-dihidrodiol-3MC [251]. Debido a la similitud estructural con BaP no es de extrañar que el metabolito mutagénico de 3MC sea un diolepóxido y que el tipo de aductos que genere en el DNA sean N2-alquilguanosina, O6-alquildesoxiguanosina, y N7-guanina [251]. Se ha observado parte de la capacidad tumorigénica del 3MC en la línea celular humana 312, ya que se logra transformar esta línea celular ante su exposición con 3MC a través de la mutación del codón 61 en el oncogen ras, lo cual activa al producto proteico p21 [252].

Adicional a su capacidad mutagénica y de inducción de enzimas de fase I, 3MC induce a proteínas cinasas, tiene actividad estrogénica debido a su capacidad para interactuar con el receptor de estrógenos α (ER α) [253], causa estrés oxidante y altera el ciclo celular promoviendo el arresto celular [254–256]. Se ha observado en animales de laboratorio que repetidas inyecciones de este carcinógeno afecta el aprendizaje y memoria, mientras que *in vitro* en células neuronales de humano se mostró su capacidad de interferencia con el proceso de neurogénesis [257]. También se ha reportado que altera el ciclo reproductivo de ratas hembras y daña el esperma de ratas machos. Pese a que es fetotóxico y ha mostrado afectar el crecimiento fetal, no se ha observado efectos teratogénicos tras su administración en ratas preñadas [258].

3.3.4. Dimetilbenz[a]antraceno

Dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) es un compuesto prototipo de HAPs, sin embargo, debido a sus características de sensibilidad a la luz no se encuentra de forma natural en el ambiente. Su uso se limita a estudios de carcinogénesis química en laboratorios de investigación. La población involucrada en el manejo del compuesto con propósitos de investigación es la que está expuesta a este agente carcinogénico, de otra manera no se espera que la población esté expuesta este hidrocarburo. Su liberación al aire, agua o suelo es la otra posible vía de exposición, sin embargo, es altamente fotosensible, de tal manera que sería degradado por la luz solar [261].

Este compuesto es absorbido en intestino de ratas tras su exposición oral, después es transportado tanto en sangre como en linfa [262], se acumula en tejido graso, con lo cual retarda su metabolismo y alarga la duración de sus efectos [263], y es excretado en bilis en un 79-82%.

El metabolismo de DMBA está basado en la acción de CYP1B1, CYP1A1 y epóxido hidrolasa, **Figura 16**, de los cuales la activación metabólica llevada a cabo por CYP1B1 es crucial para la acción tóxica, mutagénica y genotóxica [29]. Al igual que BaP y 3MC, los metabolitos diolepóxidos de DMBA causarán aductos con el DNA.

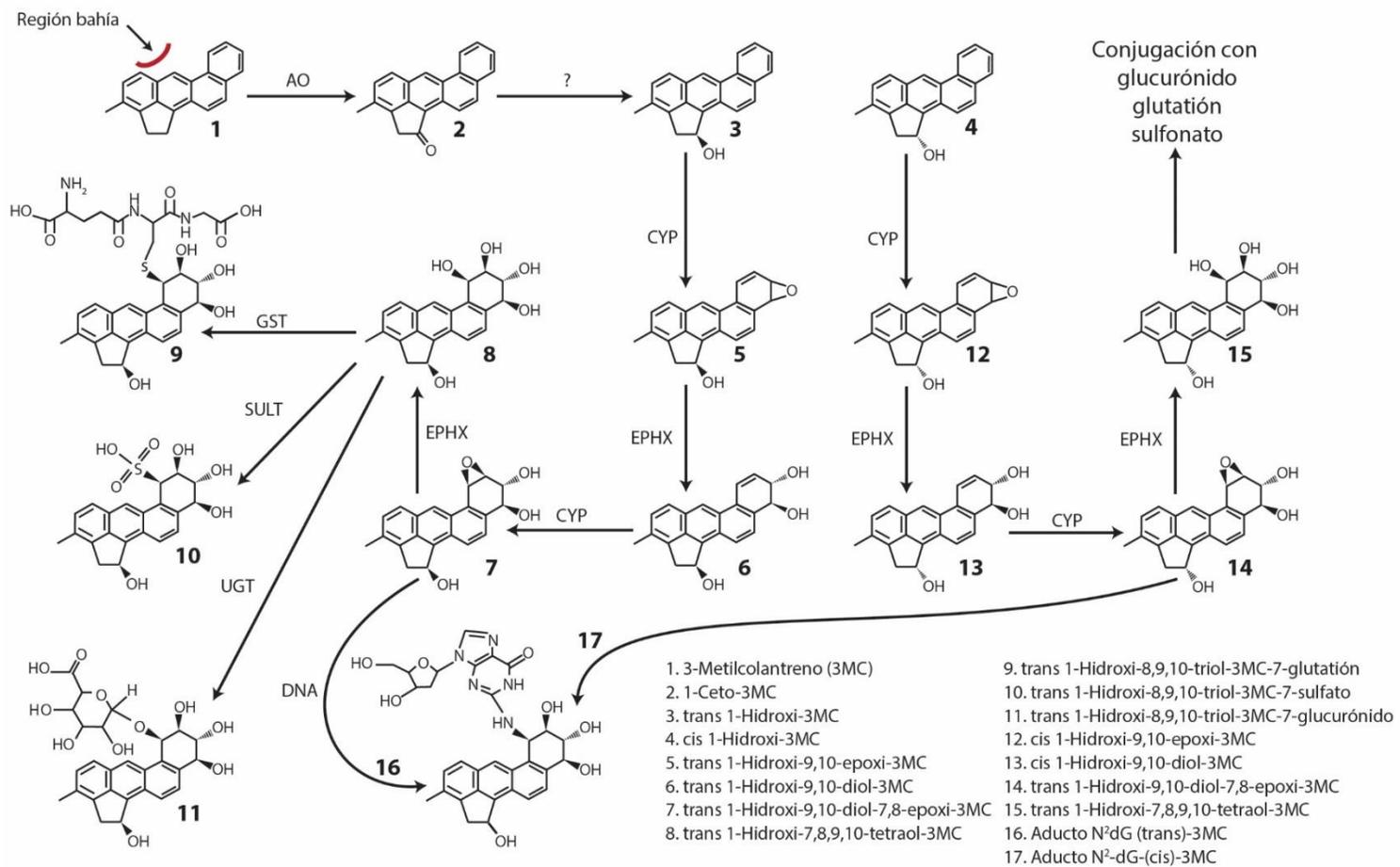


Figura 15. Mapa metabólico de 3MC.

En el esquema de reacciones se puede apreciar la clásica región bahía de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, la cual les confiere su capacidad mutagénica. Las enzimas involucradas en el metabolismo de 3MC son aldehído oxidasa (AO), citocromo P450 (CYP), epóxido hidrolasa (EPHX), UDP-glucuronosil transferasa (UGT), sulfonato transferasa (SULT), catecol-*O*-metil transferasa (COMT) y glutatión transferasa (GST). El aducto formado entre el metabolito 3MCDE y el DNA es a través del nitrógeno 2 de la guanina (N-dG). Imagen con información de [5,251,259,260].

En comparación con BaP, DMBA presenta hasta 10 veces más unión al DNA y proteínas [264]. Sin embargo, en ensayos de mutagenicidad en células humanas tuvo bajo efecto mutagénico con bioactivación inducida por la adición de S9 y prácticamente ningún efecto sin la adición de esta mezcla de enzimas [235].

Pese a lo anterior es un carcinógeno más efectivo que 3MC en la inducción de tumores mamarios [265]. Actualmente es utilizado en combinación con acetato 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) para la inducción del modelo de multi-estado de carcinogénesis química de piel. Es en este modelo en el que se ha demostrado que este hidrocarburo principalmente causa transversiones A – T en el codón 61 del gen *Ha-ras1*, el cual es un gen crítico en el desarrollo de carcinogénesis dérmica [266,267]. En estudios de inducción de carcinogénesis en modelos animales, DMBA es capaz de producir tumores en estómago, intestino, ovario, piel, y en tejido linforeticular.

Dentro de sus efectos está la disminución de la velocidad de proliferación celular dentro de las primeras 48 horas de exposición a este compuesto, tanto *in vivo* como *in vitro* [268]. Este efecto inhibitor de la proliferación celular también se puede observar en tejido hepático en regeneración, el cual tiene menor proliferación cuando está expuesto a este compuesto [269], también se ha visto que induce la acumulación de células hepáticas en fase S debido a su efecto genotóxico [270]. Su administración a ratas tanto macho como hembras jóvenes de 50 días causó pancitopenia y disminución de precursores hematopoyéticos y linfoides [261], mientras que en especies aviarias preñadas provoca embriotoxicidad.

DMBA causa selectivamente calcitración de la corteza de la glándula adrenal en cáncer de mama inducido por el mismo compuesto [271]; produce atrofia testicular y destrucción de células jóvenes en las series germinales [272]; e induce inmunosupresión a través de su capacidad genotóxica [273].

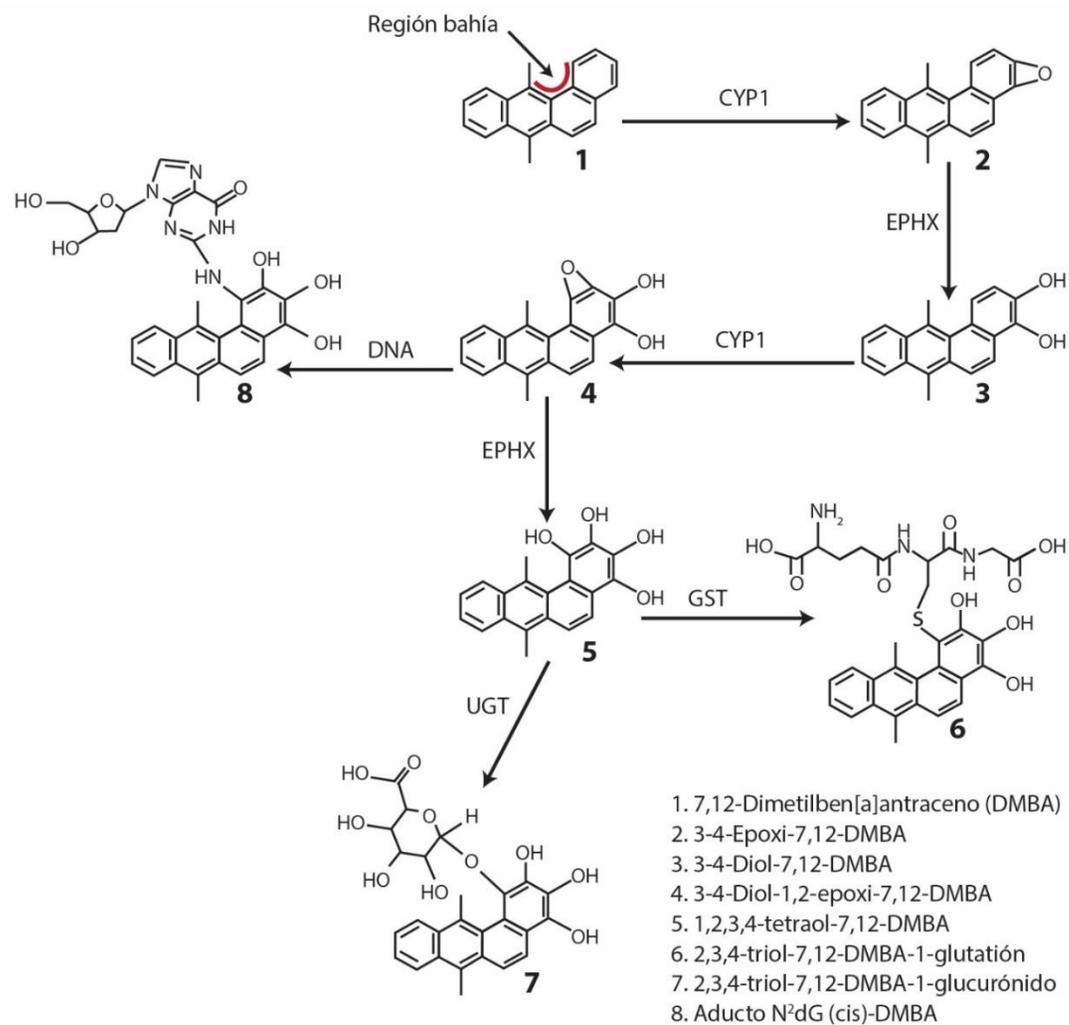


Figura 16. Mapa metab3lico de DMBA.

En el esquema de reacciones se puede apreciar la cl3sica regi3n bahía de los hidrocarburos arom3ticos polic3clicos, la cual les confiere su capacidad mutag3nica. Las enzimas involucradas en el metabolismo de 3MC son, citocromo P450 (CYP), ep3oxido hidrolasa (EPHX), UDP-glucuronosil transferasa (UGT) y glutati3n transferasa (GST). El aducto formado por el metabolito DMBA-diol ep3oxido y el DNA es a trav3s del nitr3geno 2 de la guanina (N-dG). Imagen adaptada de [5,274,275].

4. Antecedentes: vínculo HAPs, CYP1A1 y epigenética

El estudio de la toxicidad causada por HAPs va de la mano con el de la actividad e inducción de la expresión de la familia de CYP1. El modelo de células de hepatocarcinoma de ratón, Hepa 1c1c7, es donde mejor se ha descrito el proceso bajo el cual los HAPs inducen la expresión de la familia CYP1, en particular se ha estudiado más profundamente a CYP1A1.

La expresión génica de *CYP1A1* es tejido dependiente e inducible por HAPs. Aunado a esta expresión diferencial entre tejidos, el estado patofisiológico en el que se encuentre el tejido también podrá definir la expresión o no de *CYP1A1*. Un ejemplo de ello lo dan los individuos fumadores, en los cuales, la expresión de *CYP1A1* en pulmón es mucho mayor que la de los no fumadores, adicional a que el gen de *CYP1A1* en estos individuos presenta menor o nulo estado de metilación que los que no son fumadores [276].

Por otro lado, en células humanas de cáncer de próstata, la expresión de *CYP1A1* es nula, incluso cuando es expuesto a TCDD un potente agonista de AHR, mientras que en células no cancerosas sí se presenta la expresión de este gen ante la exposición al compuesto policlorinado. Lo anterior concuerda con los niveles del estado de metilación de *CYP1A1*, pues en la línea cancerosa el gen está hipermetilado, no así en la línea no cancerosa [277], además de que el resultado obtenido en la primera correlación con la evaluación de 30 pacientes con cáncer de próstata, los cuales mostraron el mismo patrón de hipermetilación en el gen de *CYP1A1*. Estos resultados muestran la importancia de dos situaciones, por un lado, la posibilidad de que el gen de *CYP1A1* sea modulado por metilación de los sitios CpG que están contenidos en él y, por otro lado, la posibilidad de que dicha regulación sea afectada por el estado fisiopatológico del modelo en cuestión, ya que como se describió en el párrafo anterior individuos fumadores crónicos presentan cambios de expresión y de estado de metilación del gen de *CYP1A1*, así como las líneas celulares cancerosas que presentan a este gen insensible a su inducción.

Aunado a los resultados anteriores, en cultivo primario de hepatocitos de rata tratados con el inhibidor de DNMTs, 5AzadC, se observó el incremento en proteína de CYP1A1 directamente proporcional al aumento en la concentración de 5AzadC. Este efecto dependiente de la concentración de 5AzadC se perdió cuando las células fueron expuestas simultáneamente a 5AzadC y AN-8, este último es un inhibidor de HDACs [188]. En la **Tabla 3** se muestra un resumen de dichos estudios y sus conclusiones, los cuales sugieren la posibilidad de regulación de *CYP1A1* por mecanismos epigenéticos, los resultados han sido muy variados y dependen del modelo de estudio, ya que pese a que en modelos de líneas celulares humanas cancerosas se ha observado alteración del estado de metilación de la región regulatoria del gen de CYP1A1, en células de ratón no se

observaron cambios, posiblemente debido a las diferencias en la estructura de la región regulatoria de este gen.

En la **Figura 17** se muestra una comparativa de la estructura del gen de *CYP1A1* en el ser humano, rata y ratón con la finalidad de mostrar las diferencias estructurales en cuanto a la región regulatoria de este gen en las tres especies. El análisis estructural de la región regulatoria de *CYP1A1* en estas especies muestra que la región regulatoria de *hCYP1A1* posee dos islas CpG, la primera de -178 a -1712 pb y la segunda de -2813 a 3567 pb [277], dentro de la primera se encuentran diez elementos de respuesta XRE, de los cuales únicamente cuatro son funcionales; el gen *mCyp1a1* posee sólo una isla CpG, la cual es pequeña comparada a las dos que posee el gen de humano y se encuentra en la región promotora, su posición es de -746 a -1265 pb [278], dentro de esta isla se encuentran tres de los cuatro sitios XRE funcionales de esta región regulatoria ; mientras que el gen *rCYP1A1* posee dos pequeñas islas CpG cuyas posiciones van de -568 a -800 pb y de -997 a -1302 pb, siendo la segunda isla CpG la que presenta dos de los tres sitios XRE de esta región regulatoria.

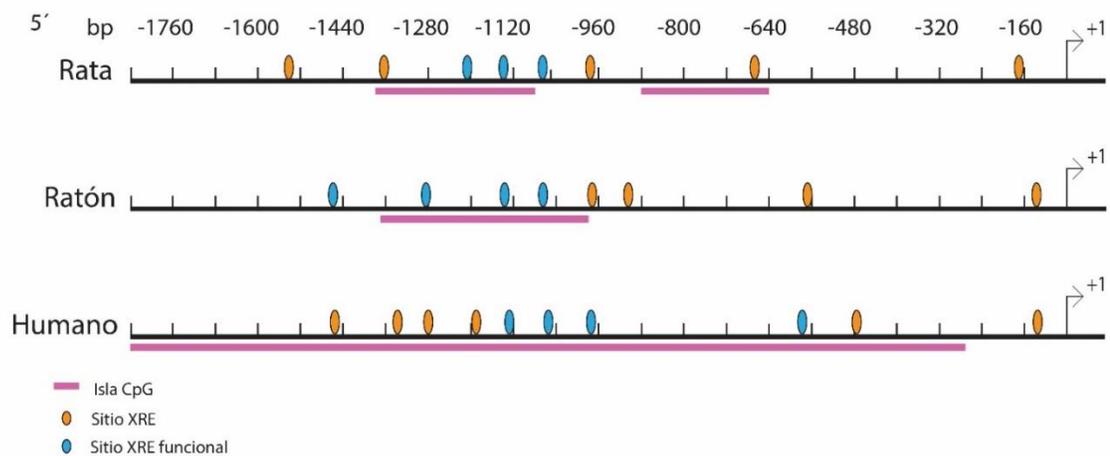


Figura 17. Región regulatoria de CYP1A1 en rata, ratón y del ser humano.

Las secuencias de ratón, rata y de ser humano fueron tomadas del portal NCBI el día 05-07-2015, la longitud de las secuencias fue de $\pm 40,000$ nucleótidos, las cuales fueron sometidas a alineación múltiple mediante el programa Jalview [279], para posteriormente ser analizados mediante los programas CpG Island [280] y TF PROMO Prediction [281]. Las características del análisis de sitios CpG fue la siguiente: CpG; %GC 50%, Obs CpG/Exp CpG 0.6, longitud 200 pb, distancia entre islas 100 pb. La secuencia buscada en el programa TF PROMO fue CACGC y los sitios encontrados fueron validados con los reportes experimentales de sitios de unión AHR en rata [282], ratón [46,53,278] y de ser humano [277,283].

La importancia de la expresión de *CYP1A1* radica en la capacidad del órgano, tejido o células para metabolizar a los xenobióticos, en este caso los HAPs, y con ello generar metabolitos con capacidad para interactuar con el DNA, causando daños en él, ya sea transicionales o permanentes (mutaciones). En este sentido, en el

estudio del proceso de carcinogénesis química en el modelo de transformación de células epiteliales de bronquios humanos inducido por el metabolito BPDE y por el agente alquilante metilnitrosourea, se puede observar que la transformación de estas células ocurre a la par de diversos cambios en procesos celulares como el incremento de daño al DNA observado a través de la formación de micronúcleos, incremento de proteínas vinculadas con la regulación epigenética como lo es DNMT1, sin embargo, a pesar de que las células logran transformarse, no tienen capacidad tumoral en ratones inmunodeprimidos, lo cual sugiere que no se está presentando la mutación iniciadora en genes cruciales para que se establezca la célula neoplásica [284]. Lo anterior, sumado al hecho de que múltiples estudios tanto en modelos de inducción de carcinogénesis química como en evaluación epidemiológica del estado patológico de diversos tipos de cáncer han mostrado consistentemente la disminución de la marca de metilación del DNA global, incremento del nivel proteico de DNMT1, disminución global de la marca de acetilación de histonas 3 y 4, e incremento variable de HDACs [128,284–293], los cuales se presentan inclusive antes de que el estado de hiperplasia sea observada, ha mostrado que el establecimiento de la mutación en genes claves es un evento tardío en el proceso de carcinogénesis y que diversos cambios se presentan antes de dicha mutación. Este conjunto de eventos son lo que ahora se denomina disrupción epigenética de la célula progenitora [294,295].

Tabla 3. Efecto de la inhibición de DNMTs y HDACs sobre CYP1A1.

Dosis de inhibidor de DNMTs	Modelo biológico	Ligando AHR	Efecto	Estado de metilación DNA de CYP1A1	Fuente
	Células de adenocarcinoma humano, A549	BaP 1 nM, 100 nM, 10 µM	Incremento en expresión de <i>hCYP1A1</i> inició con 100 µM.	35% de metilación completa en promotor <i>hCYP1A1</i>	[276]
	Células de epitelio bronquial humano, Beas-2B		Incremento expresión de <i>hCYP1A1</i> inicia con 100 nM.	11% de metilación completa en promotor de <i>hCYP1A1</i>	
5AzadC, 5µM, 96h	Células de carcinoma mamario, MCF-7	TCDD 10 nM, 24 h	Incremento de 2-3 veces en la expresión de <i>hCYP1A1</i> en AzadC vs controles, pero no hubo cambio en AzadC-TCDD vs TCDD.	Ambas líneas: elevada metilación de sitios CpG en la región <i>enhancer</i> . Baja metilación de sitios CpG en la región promotora.	[296]
	Células de carcinoma cervical, HeLa		Incremento de 4 veces la expresión de <i>hCYP1A1</i> en 5AzadC vs control y de 7 veces en 5AzadC-TCDD vs control		
5AzadC, 0, 0.25, 1 µM, por 7 días para determinación de proteína de CYP1A1 Por 14 días para determinación de estado de metilación.	Células próstata, PWR1-E y RWPE-1	TCDD 10 nM, 18 h – día 6 determinación proteína	Incremento en la expresión de <i>hCYP1A1</i> tanto en PWR1 com en PWPE1 tratadas con 5AzadC, pero no con TCDD.	RWP1 presenta menor metilación que LNCaP en la región de <i>enhancer</i> . No presenta metilación en la región promotora.	[277]
	Células de carcinoma prostático, LNCaP		Incremento de la expresión de <i>hCYP1A1</i> en LNCaP por TCDD en dependencia de la concentración de 5AzadC.		
5AzadC, 2 µM, cada 12 h por 3 días	Células de hepatocarcinoma murino, Hepa1c1c7	BaP 5 µM, 8 h	5AzadC no promueve el cambio en la expresión de <i>mCYP1A1</i> vs control. El co-tratamiento 5AzadC-BaP no incrementa la expresión de <i>mCyp1a1</i> vs BaP.	N	[278]
5AzadC, 5µM, 3 días	Células de hepatocarcinoma murino, Hepa1c1c7	TCDD 10 nM, 48 h	AzadC-TCDD no incrementan la expresión de <i>mCyp1a1</i> vs TCDD.	N	[297]
	Células de fibroblastos embrionarios murinos, C3H10T1/2		AzadC-TCDD incrementa la expresión de <i>mCyp1a1</i> vs TCDD		
5AzadC, 5µM, 72 h	Células de carcinoma mamario, MCF-7	24 h después del tratamiento con 5AzadC, TCDD 100 nM	No hay cambios en la expresión de <i>hCYP1A1</i>	N	[298]
	Células de hepatocarcinoma humano, HepG2		No hay cambios en la expresión de <i>hCYP1A1</i>		
5AzadC 1, 5, 10, 50, 250 y 500 µM, por 72 h	Cultivo primario de hepatocitos de rata Sprague Dawley		Incremento en la proteína de rCYP1A1 en dependencia de la concentración de 5AzadC		[188]

5AzadC, 0.5 μ M, por 5 días	Cultivo primario de células bronquiales humanas, NHBE y HBEC Cultivo de células de carcinoma de pulmón, HLAC	5AzadC incrementa la expresión de <i>hCYP1A1</i> sólo en HLAC	NHBE y HBEC presentaron mayor metilación que HLAC en la región de <i>enhancer</i>	[299]
5AzadC, 5 μ M, por 7 días (con cambio de medio en el día cuatro, en el día 6 las células fueron divididas en cajas de 60 mm con medio de cultivo que contenía 5AzadC, el día 7 el medio fue cambiado).	Células de carcinoma cervical, HeLa Células de hepatocarcinoma humano, HepG2.	5AzadC incrementa la expresión de <i>hCYP1A1</i> vs el control	Tanto HeLa como HepG2 no presentan metilación en la región <i>enhancer</i>	[300]
5AzadC, 5 μ M, 5 días RG108, 5 μ M, 5 días	Cultivo primario de hepatocitos humanos, hPH Cultivo primario de células madre derivadas de hepatocitos, hESC.Hep	Sólo hESC-Hep incrementó la expresión de <i>hCYP1A1</i> en ambos tratamientos, 5AzadC y RG108.	hPH no presentó metilación hESC-Hep presentó elevada metilación	[301]
Inhibidores de HDACs	Modelo biológico	Ligando AHR	Efecto	Fuente
TSA, 200ng/mL, 30 min antes de TCDD	Células de hepatocarcinoma murino, Hepa1c1c7	TCDD 1 μ M	No tiene efecto sobre la actividad basal EROD Incrementa la actividad EROD y la proteína de CYP1A1 inducidos por TCDD	[302]
TSA, 100ng/mL, 24h	Células de carcinoma mamario, MCF-7 Células de carcinoma cervical, HeLa	TCDD 10 nM después de TSA, 24 h	Incrementa la expresión basal de <i>hCYP1A1</i> , pero no tiene efecto sobre la inducida por TCDD. Incrementa la expresión basal de <i>hCYP1A1</i> y la inducida por TCDD.	[296]
SAHA, 0.2 - 4.0 μ M, 12 and 24 h TSA, 0.2 - 4.0 μ M, 12 and 24 h	Células de carcinoma mamario, MCF-7	BaP 4 μ M	Incrementa la actividad EROD y la expresión basal de <i>hCYP1A1</i> y no tiene efectos sobre la expresión inducida por BaP. Incrementa la actividad EROD inducida por BaP y la expresión basal de <i>hCYP1A1</i> ; mientras que disminuye la expresión inducida por BaP.	[303]
TSA, 25 μ M, 2, 4, 7 días	Cultivo primario de hepatocitos de rata Sprague Dawley	Ninguno	Incrementa la actividad EROD al día siete. Incrementa la proteína de rCYP1A1 en todos los días probados. Incrementa la expresión de rCYP1A1 en los días cuatro y siete.	[304]
Butirato de sodio, 2mM, 16h	Células de hepatocarcinoma murino, Hepa1c1c7	BaP 5 μ M, 8h	No se observan cambios en la expresión basal ni inducida de <i>mCyp1a1</i> .	[278]
TSA, 100 nM, 24h	Células de hepatocarcinoma murino, Hepa1-OT Células de fibroblastos embrionarios murinos C3H10T1/2	TCDD 10 nM, 24h	Incrementa la expresión inducida de <i>mCyp1a1</i> por TCDD Incrementa la expresión inducida de <i>mCyp1a1</i> por TCDD	[297]
AN-8, 1 – 5 μ M, 72h	Cultivo primario de hepatocitos de rata Sprague Dawley	Ninguno	Incrementa el nivel de proteína de rCYP1A1	[188]
TSA, 250 nM, 16 h	Células de carcinoma mamario, HeLa	PCB-136, 3 μ M, después de TSA, 6 h	Incrementa la expresión basal e inducida de hCYP1A1	[300]

N, no determinado.

La inconsistencia entre eventos mutagénicos y tumorigénicos, así como carcinogénicos, ha llamado la atención desde hace tiempo. Alrededor de los años setenta, la presencia heterogénea de mutaciones en oncogenes en tumores inducidos químicamente mostró la posibilidad de que la mutación de dichos genes no sea lo único que esté mediando su activación. Esta inconsistencia entre eventos llevó al grupo del Dr. Vincent L. Wilson a estudiar otros mecanismos de regulación que fueran más consistentes entre los compuestos que están logrando el establecimiento de la célula iniciada, aun cuando difieran en tipo de activación mutagénica o inclusive no la presenten. Dentro de los descubrimientos más relevantes que su grupo de investigación obtuvo se encuentran que BaP y otros agentes formadores de aductos con el DNA, promueven la hipometilación del DNA, sugiriendo un posible impedimento de la acción metiltransferasa de la DNMT1 debido a la formación de aductos con el DNA [287,305]. Los experimentos llevados a cabo por el grupo de Wilson fueron tanto a nivel de reacción enzimática *in vitro* como en determinación de estado de metilación en células de cultivo primario de bronquio, en ambos estudios diversos HAPs mostraron capacidad para disminuir la metilación del DNA. En particular BaP, en concentraciones de 0.1 a 1 μ g/mL, disminuyó la

metilación en células BALB/3T3 A31 CL1-13 después de 16 h de exposición, así como a concentraciones de 0.033 µg/mL después de 48 h de exposición. En el mismo estudio, DMBA a la concentración de 0.4 µM también mostró disminución de la metilación del DNA. En las reacciones enzimáticas los metabolitos diol-epóxido del BaP fueron inhibidores potentes de la metilación del DNA [287,305].

La alteración de la metilación del DNA por exposición a BaP también fue mostrada en genes vinculados con el establecimiento de la célula iniciada, así como de la expresión aberrante de genes en la célula tumoral. En cultivos de células pulmonares de bronquiocarcinoma, células ChaGo, se determinó la producción de la gonadotropina coriónica humana, así como de su estado de metilación ante la exposición a diferentes concentraciones de BaP y DMBA. Ambos compuestos lograron incrementar la cantidad de proteína desde la concentración más baja probada, 0.025 µg/mL; y también lograron disminuir la metilación del gen de esta proteína de forma concentración-dependiente a partir de 0.05 µg/mL [306].

En cuanto a genes claves de la regulación del ciclo celular, se reportaron estudios de estado de metilación de estos genes en función del estado neoplásico celular a partir de cultivos primarios de células epiteliales de tráquea de ratones, las cuales fueron tratadas con 12-*O*-tetradecainolforbol-13-acetato (TPA), para dar una línea celular transformada no tumorigénica, o con TPA más BaP o BPDE para dar dos líneas celulares tumorigénicas. El estudio fue llevado a cabo con DNA del cultivo primario de células epiteliales de tráquea, de la línea transformada y de las dos líneas tumorigénicas. De estos cultivos se extrajo el DNA para evaluar el estado de metilación en los genes *c-myc* y *ha-ras* mediante su digestión con HpaII y MspI, con la premisa de que HpaII no digiere las zonas con sitios CpG y MspI digerirá el DNA con o sin sitios CpG. Como resultado, el DNA de *c-myc* y *ha-ras* de la línea transformada y de las dos tumorigénicas fueron digeridas tanto por HpaII y MspI, en comparación con las células epiteliales de tráquea normales, las cuales no presentaron digestión por HpaII y sí por MapI [307]. Estos resultados muestran que genes claves en la generación de la célula neoplásica exhiben disminución de la metilación del DNA desde estados tempranos de generación de la célula neoplásica. Dentro de los cambios en los niveles de proteínas de modificadores epigenéticos causados por la exposición a HAPs llama la atención que BaP y 3MC provocan un estado de hipometilación de DNA total celular en diferentes modelos, un evento que no está totalmente correlacionado con los niveles proteicos o expresión proteica de DNMTs [284,308–312]. Por otro lado, también se han reportado algunos casos en los que la exposición a HAPs, ya sea en mezclas provenientes de concentrados de humo de cigarro o independientes, han modificado los niveles de modificadores epigenéticos como HDAC1 [256,313], HDAC2 [308,314], HDAC3 [308], SIRT1 [315]. La **Tabla 4** muestra un resumen de los diversos estudios que se han llevado a cabo hasta ahora y sus conclusiones.

Tabla 4. Efecto de HAPs sobre DNMTs, HDACs y estado de metilación del DNA celular.

Proteína	Modelo	Xenobiótico	Dosis y tiempo exposición	Efecto	Estado de metilación	Referencia	
DNMT1	100 µg/mL DNA hemimetilado	N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina	49.5 rB	100% inhibición enzimática	32.1 % de inhibición de metilación del DNA	[287]	
		Etil metano sulfonato	209 rB	N	27.2 %		
		Etilnitrosourea	95.5 rB	78.2 %inhi enzi	42.3%		
		N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina	16.1 rB	N	36.3% de inhibición de metilación del DNA		
		1,3-Bis-(2-cloroetil-1-nitrosourea	18.2 rB	N	30.7 % de inhibición de metilación del DNA		
		9-aminoacridina	2 rB	N	22.9%		
		Mostaza nitrogenada	0.2 rB	40.6 %inhi enzi	46.5%		
		N-acetoxi-N-acetilaminofluoreno	2 rB	N	47.9% de inhibición de metilación del DNA		
		Benzo[a]pireno diolepóxido	2 rB	N	29.3% de inhibición de metilación del DNA		
	Células de fibroblastos de embrión murino, C3H/10T y BALB/3T3	BaP	1 µg/mL, 16 h	N	Células C3H/10T: no hay cambios	[287]	
					Células BALB/3T3: disminución de la metilación del DNA	[287]	
	Células epiteliales normales de bronquio humano, NHBE	Control	0.04, 0.4, 0.8 µM, 48 h			3.09 % 5mC	[286]
		BaP	0.4 µM, 48h			2.98,2.24,2.41%5mC	
		DMBA	11.2 µM, 48h			2.56 % 5mC	
		Fenantreno	0.6 µM, 48h			3.09 % 5mC	
Aflatoxina B1		2.6 µM, 48h			2.78 % 5mC		
4-Nitroquinolina 1-óxido		92.1 µM, 48h			2.49 % 5mC		
N-Nitrosodietilamina		85.4 µM, 24h			2.75 % 5mC		
N-nitroso-N-etilurea		5 µM, 24h			2.22 % 5mC		
Células de epitelio bronquial humano clona 16	BaP / MNU	0.05 µM/ 0.5 mM – 1 dosis/semana/12 semanas	No hay cambio en mRNA, sí incremento proteína	Incremento metilación en promotores de ciertos genes	[284]		
Células epiteliales de carcinoma cervical humano, HeLa	BaP	2.5 – 40 µM – 24 h	Incremento proteína	Disminución metilación DNA total	[308]		
	BaP	10, 20 y 40 µM – 72 h	Disminución proteína	Disminución metilación DNA total	[311]		
Células de fibroblastos embrionicos de ratón C3H/10T/2	BaP	3 µM – 48 h	Disminución proteína	Hipometilación retrotransposón L1	[310]		
	BaP	0.25 µM – 4 semanas	Incremento mRNA	Incremento metilación DNA total	[312]		
DNMT3a	Células de epitelio bronquial humano clona 16	BaP	10, 20 y 40 µM – 72 h	No cambios	Disminución metilación DNA total	[311]	

		Células epiteliales de carcinoma cervical humano, HeLa	BaP	3 μ M – 48 h	Disminución proteína	Hipometilación retrotransposón L1	[310]
		Células de fibroblastos embriónicos de ratón C3/10T/2	BaP	0.25 μ M – 4 semanas	Disminución proteína	Incremento metilación DNA total	[312]
DNMT3b		Células de epitelio bronquial humano clona 16		10, 20 y 40 μ M – 72 h	Incremento proteína	Disminución metilación DNA total	[311]
		Células de fibroblastos de embrión de ratón C3/10T/2		0.25 μ M – 4 semanas	Disminución mRNA	Incremento metilación DNA total	[312]
Clase 1	HDAC1	Miometrio de ratas Long-Evans expuestas durante gestación	BaP	150 μ g/Kg 300 μ g/Kg	Incremento proteína	N	[313]
		Células de endotelio vascular de cerebro de ratón	3MC	100 nM – 60 y 90 min	Incremento proteína		[256]
	HDAC2	Células monocito-macrófago de humano	Extracto de humo de cigarro	2.5% - 0.5, 1, 2, 4, 6 h	Disminución proteína	N	[314]
		Pulmón de ratón A/J	Humo de cigarro	250 mg/m ³ material particulado, 6h/día por 5 días durante 2, 4, 10 y 16 semanas	Disminución proteína	N	
		Células de epitelio bronquial humano 16	BaP	2.5 – 40 μ M – 24 h 10 μ M – 24 h	Incremento proteína	Disminución metilación DNA total	[308]
	HDAC3	Miometrio de ratas Long-Evans expuestas durante gestación	BaP	150 μ g/Kg 300 μ g/Kg	Incremento proteína	N	[313]
		Células de epitelio bronquial humano 16	BaP	2.5 – 40 μ M – 24 h 10 μ M – 24 h	Incremento proteína	Disminución metilación DNA total	[308]
	HDAC8	N					
Clase 2	HDAC4	Miometrio de ratas Long-Evans expuestas durante gestación		150 μ g/Kg 300 μ g/Kg	No cambio	N	[313]
	HDAC5	Miometrio de ratas Long-Evans expuestas durante gestación		150 μ g/Kg 300 μ g/Kg	Incremento proteína	N	[313]

	HDAC6	N					
	HDAC7	N					
	HDAC10	N					
Clase 3	SIRT1	Células bronquiales de humano BEAS 2	BaP	8 μ M – 0, 4, 8 y 24 h	Incremento mRNA y proteína	N	[315]
		Ratones hembra C57BL/6	BaP	1mg/ratón, 1 dosis/semana/4 semanas	Incremento proteína		
		Biopsias de cáncer pulmonar			Incremento proteína		
Clase 4	HDAC11	N					

N, no evaluado hasta el momento o no determinado, 2018.

5. Planteamiento del problema

Los HAPs son compuestos contaminantes a los cuales los organismos estamos expuestos de forma accidental o deliberada a través de sus distintas fuentes. Los efectos tóxicos por la exposición a HAPs, como lo es el desarrollo de cáncer, son debidos a sus metabolitos principalmente. El estudio de los efectos tóxicos de estos compuestos, así como de los procesos vinculados a su toxicidad, por ejemplo, su bioactivación por enzimas de la familia CYP1, permitirá un conocimiento más profundo y direccionado de las diversas patologías que de su exposición se desencadenan, así como de la prevención de estas.

La expresión de génica de la enzima CYP1A1, la cual tiene un papel crucial en la biotransformación de los HAPs, ha mostrado la posibilidad de estar bajo el control de mecanismos de regulación epigenética cuando se le ha evaluado en modelos celulares carcinogénicos humanos o en modelos de exposición crónica a HAPs o extractos de cigarrillos, lo cual sugiere que este gen responde en función del ambiente o el estado fisiológico en el que el organismo se encuentra inmerso, por tanto, determinada exposición a HAPs resultaría en menos o más toxicidad, o inclusive ser factor determinante para el establecimiento de alguna patología en particular. Pese a que en modelos murinos no se ha observado cambios en la metilación del DNA en el gen de *mCYP1A1*, posiblemente debido a diferencias en cuanto a presencia de islas CpG, la estructura de esta región regulatoria en *rCYP1A1* da pauta a la posibilidad de que en un modelo de línea celular de rata se observe modulación de expresión génica de este citocromo.

Por otro lado, distintos estados en la evolución de una neoplasia analizados en estudios epidemiológicos, así como la exposición crónica a HAPs en procesos de inducción de carcinogénesis química, muestran la disminución tiempo y concentración dependiente de la marca de metilación del DNA, aumento de la proteína DNMT1, e incremento proteico de algunas HDACs, lo cual está sugiriendo la posibilidad de que estos cambios puedan ocurrir desde tiempos tempranos de la exposición a los HAPs.

Los antecedentes mostrados nos condujeron a preguntarnos si la expresión génica de *CYP1A1* es modulada por cambios en el estado de metilación del DNA y si la exposición aguda a cuatro distintos HAPs podrían alterar los niveles proteicos de modificadores epigenéticos en células no cancerosas de hígado de rata.

“No es una pregunta tonta si tú no puedes contestarla”

“Las personas más subversivas son aquellas que hacen preguntas”

El mundo de Sofía de Jostein Gaarder

6. Hipótesis

Si la exposición subaguda a HAPs altera el nivel proteico de modificadores epigenéticos y de CYP1A1, entonces la exposición previa al inhibidor AzadC alterará la expresión de *CYP1A1*.

7. Objetivo

Obtener el perfil de cambios proteicos de modificadores epigenéticos en células epiteliales de hígado de rata después de su exposición subaguda a cuatro HAPs y a 5AzadC y replicar los efectos en un modelo *in vivo*.

Objetivos particulares

- Determinar las concentraciones efectivas de la exposición subaguda a BF, BaP, 3MC y DMBA para la inducción de *rCYP1A1*, en las cuales no se observe toxicidad en células epiteliales C9 de hígado de rata.
- Determinar la concentración letal 50 de 5AzadC en células epiteliales C9 de hígado de rata.
- Determinar la expresión basal e inducida de *rCYP1A1* en células epiteliales C9 de hígado de rata expuestas a HAPs y a 5AzadC.
- Determinar la concentración de las proteínas modificadoras de epigenética DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4 y SIRT1 después de la exposición subaguda de la línea celular C9 a los HAPs seleccionados.
- Determinar el estado de metilación del DNA global después de la exposición subaguda de la línea celular C9 a los HAPs seleccionados.
- Determinar la expresión basal e inducida de *rCYP1A1* en hígado de rata expuesta a HAPs y a 5AzadC.
- Determinar la expresión basal e inducida de *rCYP1A1* en hígado de ratón expuesto a HAPs y a 5AzadC.

8. Diseño experimental

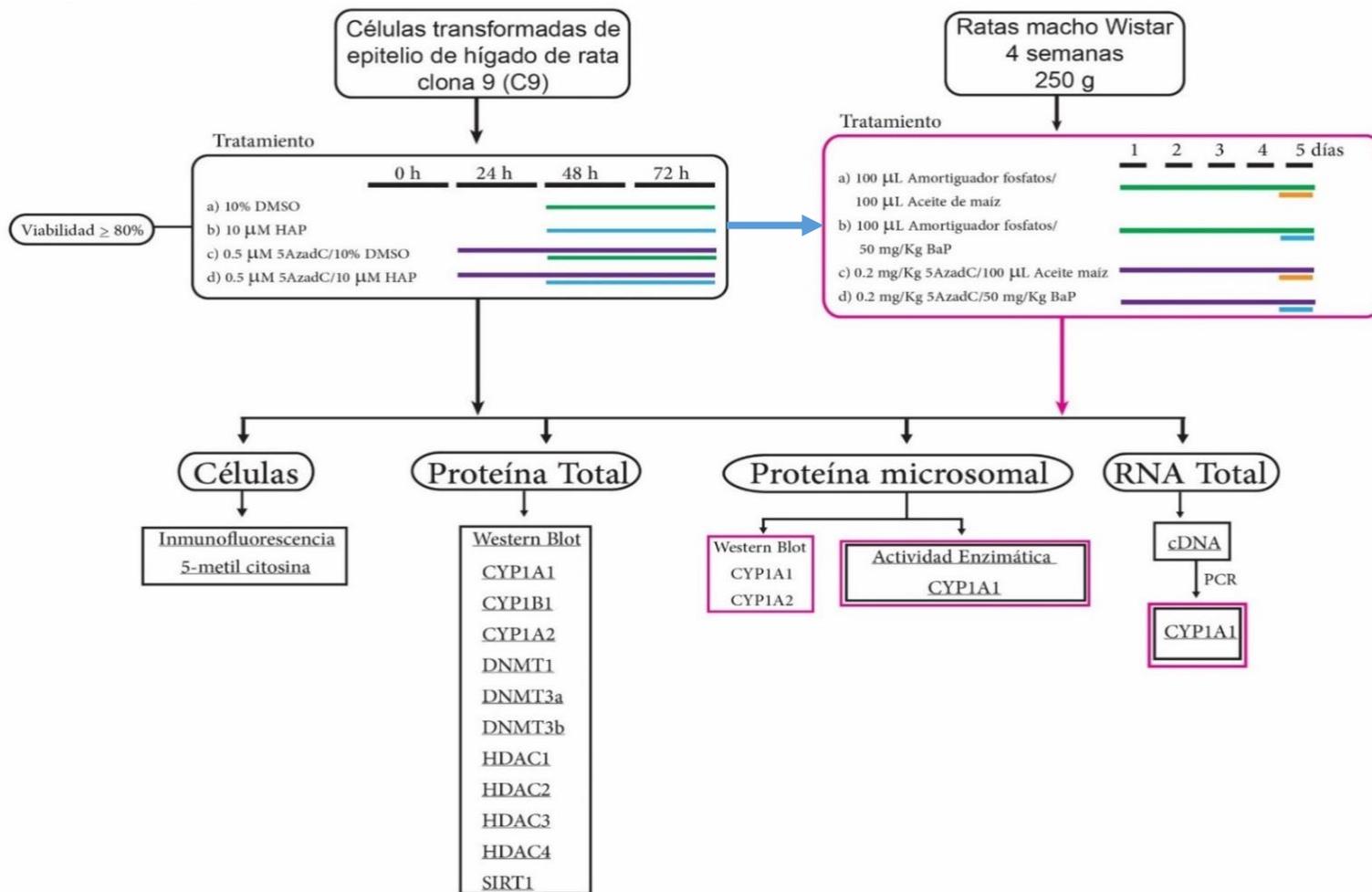


Figura 18. Diseño experimental.

Diseño para la determinación *in vitro* del efecto de HAPs sobre el nivel de proteínas de DNMTs y HDACs, y determinación *in vivo* del efecto de la inhibición de DNMTs sobre la expresión de CYP1A1.

El diseño experimental consistió en la evaluación *in vitro* de los efectos de los HAPs sobre el nivel de proteínas modificadoras de la epigenética y CYP1A1, así como la influencia de 5AzadC sobre la expresión de CYP1A1.

Para los experimentos *in vitro* trabajamos con la línea celular de epitelio de hígado de rata clona 9, las cuales tuvieron una duración de 96 horas. Los tratamientos fueron iniciados 24 horas después de la siembra de las células. El esquema de exposición a los compuestos fue el siguiente:

1. **Control:** 0.1% v/v de DMSO por 72 horas.
2. **HAPs:** 10 μ M de BF o BaP o DMBA o 3MC por las últimas 48 horas del experimento. Los HAPs estuvieron disueltos en DMSO, el cual tuvo una concentración final en cultivo celular de 0.1% v/v.
3. **HAP-5AzadC:** 0.5 μ M de 5AzadC disuelto en amortiguador de fosfatos pH 7.4 por 72 horas en co-exposición con 10 μ M BaP las últimas 48 h.
4. **5AzadC:** 0.5 μ M de 5AzadC disuelto en amortiguador de fosfatos pH 7.4 por 72 horas.

Al término del tiempo de los tratamientos, los cultivos fueron procesados para la determinación de RNA y proteína.

En base a los resultados obtenidos en el modelo hepático *in vitro* se decidió evaluar la influencia de 5AzadC sobre la expresión de CYP1A1 en hígado de rata y ratón. El protocolo experimental para uso de animales fue aprobado por el CICUAL con el número 239. Fueron utilizadas 24 ratas macho Wistar con peso de 200-250 g y 4 semanas de vida y 24 ratones macho Balb/c con peso de 20-25 g y 4 semanas de vida, obtenidos del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México. Se trabajaron 4 individuos por cada tratamiento, los cuales fueron administrados vía intraperitoneal cada 24 horas por 5 días bajo el siguiente esquema de tratamiento.

1. **Control:** 0.1 mL amortiguador de fosfatos pH=7.4 por 5 días y 0.1 mL aceite de maíz el quinto día.
2. **BaP:** 0.1 mL amortiguador de fosfatos pH=7.4 por 5 días y 50mg/Kg BaP una única dosis el quinto día.
3. **5AzadC – BaP:** 0.2 mg/Kg de 5AzadC disuelto en amortiguador de fosfatos pH 7.4 por 5 días y 50mg/Kg de BaP una única dosis el quinto día.
4. **5AzadC:** 0.2 mg/Kg de 5AzadC disuelto en amortiguador de fosfatos pH 7.4 por 5 días.

24 horas después de la última administración los animales fueron sometidos a eutanasia, se diseccionó a cada animal y se obtuvo su hígado, el cual fue procesado para determinación de cantidad de RNA, proteína y actividad enzimática de CYP1A1.

“Un filósofo sabe que en realidad sabe muy poco. Es por eso que constantemente se esfuerza por lograr una verdadera visión.”

El mundo de Sofía de Jostein Gaarder

9. Resultados

9.1. Caracterización del cultivo celular, tiempos de exposición y concentraciones de HAPs y 5AzadC

Para lograr corroborar la hipótesis planteada en este proyecto se tuvo como objetivos la evaluación del efecto de BF, BaP, 3MC y DMBA sobre las concentraciones proteicas de enzimas epigenéticas modificadoras, así como determinación del impacto de la alteración de la metilación del DNA sobre una de las enzimas que bioactiva a estos HAPs, el CYP1A1.

Lo primero que se realizó fue la determinación de las concentraciones no tóxicas de los distintos compuestos sobre las células C9. Previamente se caracterizó el cultivo celular, determinando que tiene un tiempo de 96h para alcanzar la confluencia, además de que estudios previos con BaP sobre esta línea celular han mostrado que este compuesto logró la máxima entrada a la célula y la máxima actividad EROD después de 4h y 16h de exposición, respectivamente [316]. Se utilizó el ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular después de la exposición por 48h a los cuatro distintos HAPs y a 5AzadC durante 72 h.

En la **Figura 19**, se muestra el efecto de la exposición por 48 horas a 0, 1×10^{-8} , 1×10^{-6} , 1×10^{-4} , 0.01 y 1 mM de cada HAP sobre la viabilidad celular de cultivos de 24 horas de células C9, determinado a través de la técnica de MTT. En dicha figura, podemos observar que a concentraciones menores a 10 μ M, ningún compuesto disminuyó la viabilidad celular de manera significativa en concentraciones menores a 1 mM. Con base en estos resultados y en los estudios previos, resumidos en la **Tabla 3**, así como el estudio realizado por Barhoumi en el que evaluó el comportamiento de BaP en células epiteliales C9 y determinó que se logra la máxima actividad EROD del compuesto a partir de las 16h de su exposición y con 10 μ M [316], concluimos que 10 μ M de cada HAP es una concentración adecuada en la cual no se observaron efectos citotóxicos.

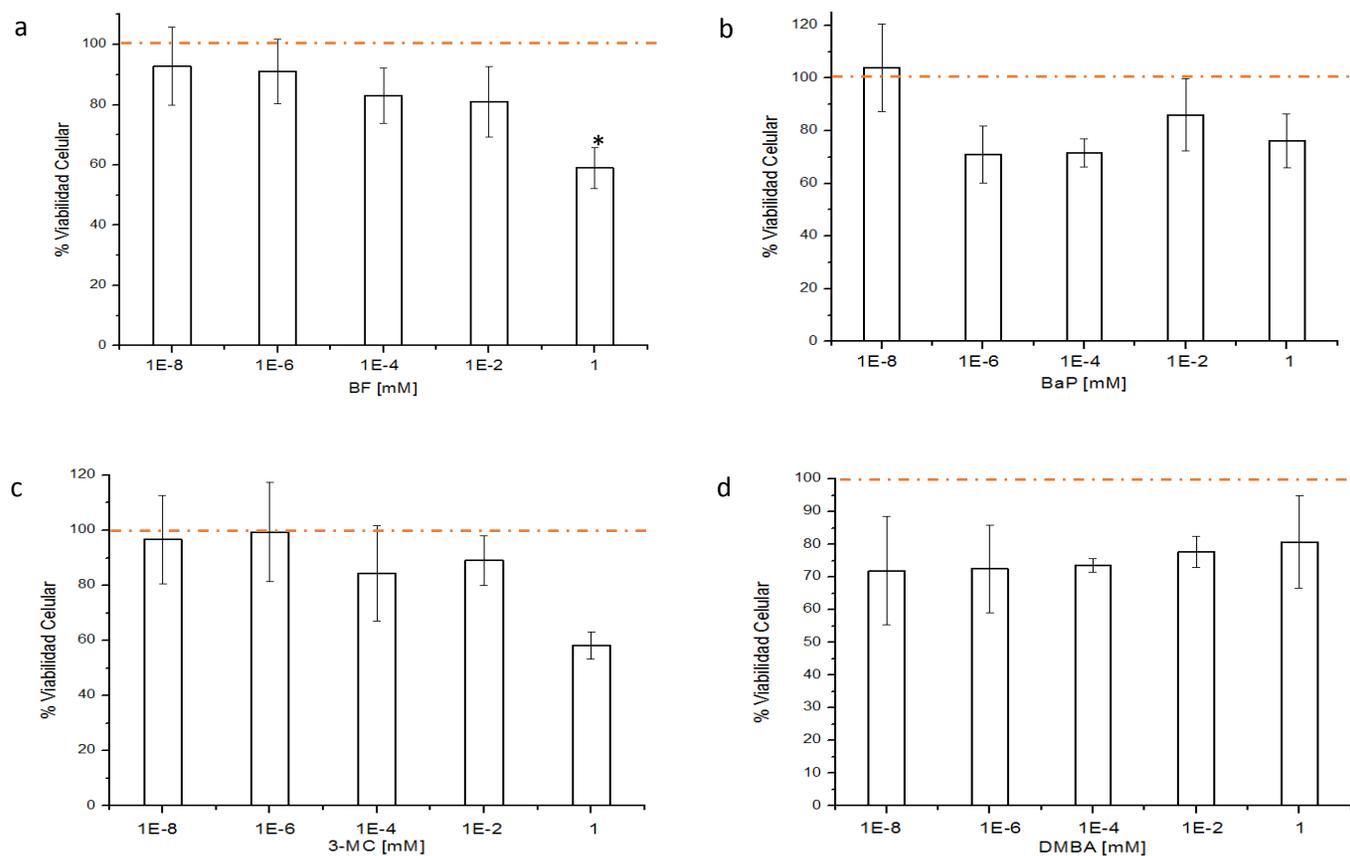


Figura 19. Efecto de distintas concentraciones de HAPs sobre la viabilidad celular del cultivo de C9.

Cultivos de 24 horas de células C9 fueron tratados con 0, 1×10^{-8} , 1×10^{-6} , 1×10^{-4} , 0.01 y 1 mM de a) BF, b) BaP, c) 3MC, d) DMBA, por 48 horas. Los compuestos fueron disueltos en DMSO, el cual tuvo una concentración final de 0.1% v/v en el medio de cultivo. La línea punteada roja indica el 100% de viabilidad. Los experimentos fueron realizados por triplicado, cada barra representa el promedio \pm desviación estándar. El asterisco * indica diferencia significativa versus el control con $P < 0.05$.

Otro objetivo que se planteó fue la determinación del efecto que alteraciones de mecanismos de regulación de epigenéticos, como la metilación de DNA, tuvieron sobre la expresión del gen de *CYP1A1* de rata, para lo cual se decidió modificar el patrón de metilación del DNA celular mediante la exposición de las células C9 a 5AzadC, inhibidor no competitivo de DNMTs. Dentro de las consecuencias que la acción inhibitoria de 5AzadC tiene sobre DNMTs se encuentra la disminución de la velocidad de proliferación celular, la cual correlaciona con la reducción del estado de metilación de genes epigenéticamente silenciados, reactivando su expresión. Este efecto ha sido observado cuando la concentración de 5AzadC logra al menos el 20% de inhibición de crecimiento celular [138,142,317]. De tal manera que se decidió continuar la estrategia experimental con una concentración de 5AzadC que causara disminución de la viabilidad celular no mayor al 20%, tanto solo como en co-exposición con el HAP. Para lo cual, se evaluó el efecto que este inhibidor tiene sobre la viabilidad celular del cultivo de células C9, ya sea solo o en co-exposición con BaP.

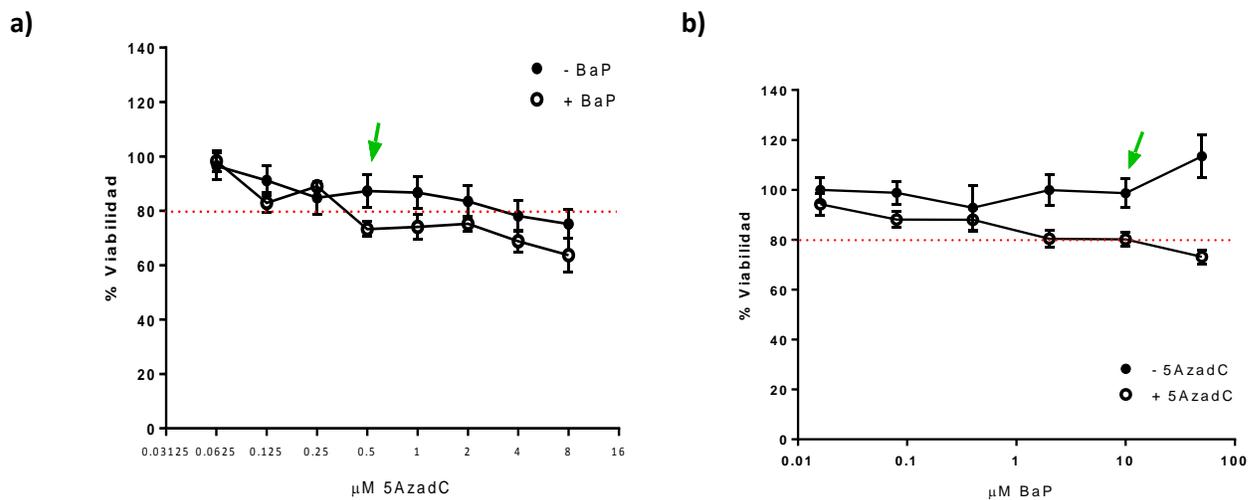


Figura 20. Efecto del co-tratamiento 5AzadC-BaP sobre la viabilidad de cultivos de células C9.

a) Cultivos de 24 horas de células C9 expuestos por 72 horas a 0, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, y 8 μM de 5AzadC fueron sometidos a co-tratamiento con y sin 10 μM de BaP por las últimas 48 horas. b) Cultivos de 24 horas de células C9 fueron tratados por 72 horas con y sin 0.5 μM de 5AzadC en co-exposición a 0, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM de BaP por las últimas 48 horas. 5AzadC fue disuelto en amortiguador de fosfatos y BaP en DMSO, estando este último en una concentración final en medio de cultivo de 0.1% v/v, ambos vehículos de disolución fueron usados como controles de sus respectivos solutos. Para más información revisar esquema experimental y metodología. Cada punto de las curvas representa el promedio de tres experimentos \pm error estándar.

En la **Figura 20** se muestra el resultado obtenido de la exposición de cultivos de 24 horas de células C9 a 0, 0.0312, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 μM de 5AzadC por 72 horas con y sin co-exposición a 10 μM de BaP por 48 horas. También se evaluó el comportamiento del cultivo celular ante la exposición a 0, 0.01, 0.1, 1, 10,

100 μM de BaP solo o en co-exposición con 0.5 μM de 5AzadC. De los experimentos mostrados en la **Figura 20** concluimos que 0.5 μM de 5AzadC, flechas verdes, en co-exposición con BaP como sin él, fue una concentración adecuada para continuar con los experimentos que involucraron la modificación de la metilación de DNA celular.

Una vez definidas las concentraciones de los HAPs y de 5AzadC, nuestro siguiente objetivo fue la corroboración del efecto de 5AzadC la disminución de la marca de 5mC, para lo cual se evaluó el estado de metilación del DNA global en las células C9 después de ser expuestas a 0.5 μM de 5AzadC por 72 horas. Haciendo uso de anticuerpos anti-5mC y mediante la determinación de la intensidad de fluorescencia generada por los anticuerpos secundarios, se determinó semicuantitativamente la cantidad de marca después de la exposición al anticuerpo anti-5mC. La **Figura 21 a** muestra el cambio en la metilación de DNA global en las células C9 inducido por la exposición a 5AzadC. De esta imagen concluimos que la concentración seleccionada es una concentración efectiva para lograr disminuir la metilación del DNA y con esto generar un estado de hipometilación del DNA celular.

Para completar la corroboración del efecto de 5AzadC sobre el estado de metilación del DNA global, se evaluó el nivel de mRNA del gen de la enzima convertidora de angiotensina de rata, *rAce*, cuya expresión ha sido reportada como sensible al estado de metilación de su región regulatoria en un modelo de células epiteliales hepáticas [318], el cual incrementa su expresión ante la disminución del estado de metilación del DNA por exposición de las células a 5AzadC. Bajo las condiciones de tratamiento del cultivo de células C9 con 5AzadC establecidas, 0.5 μM por 72 h, se observó el aumento de la expresión del gen *rAce*, como lo muestra en la **Figura 21 b**.

De los resultados reportados en la **Figura 21** se concluyó que la concentración de 5AzadC es efectiva para disminuir los niveles de metilación del DNA y incrementar la expresión del gen *rAce*, el cual es regulado por el estado de metilación de su región promotora como consecuencia del efecto hipometilante del DNA de 5AzadC.

Con esta serie de experimentos concluimos que los tiempos y concentraciones de exposición a los HAPs y a 5AzadC efectivas para tratar a las células C9 fueron 10 μM de cada uno de los HAPs por 48 h y 0.5 μM de 5AzadC por 72 horas.

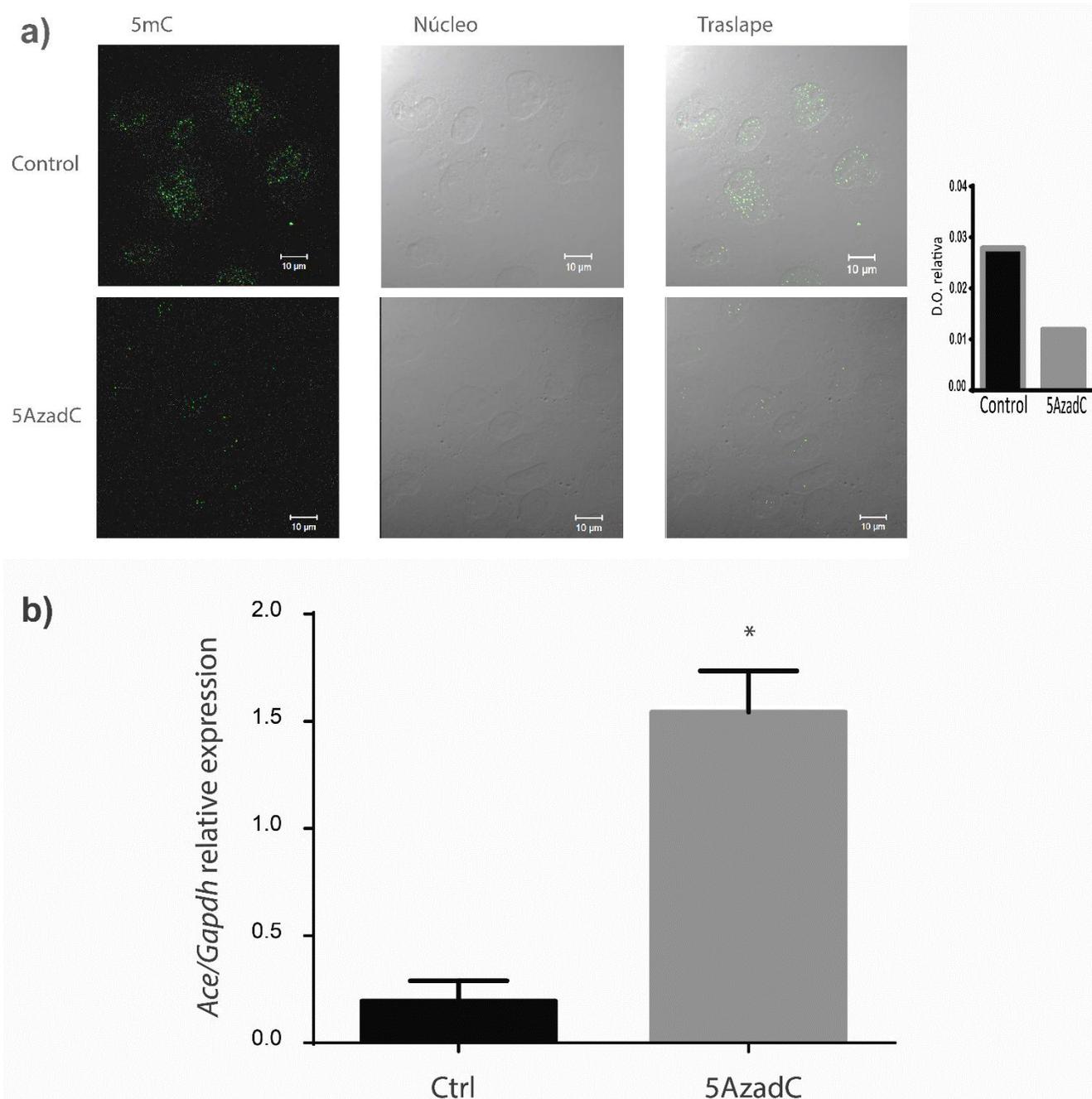


Figura 21. Efecto hipometilante de 5AzadC sobre el DNA de cultivos de células C9.

Cultivos de células C9 de 24 horas de crecimiento fueron expuestos a 100 μL de amortiguador de fosfatos, para el grupo control, o 0.5 μM 5AzadC, por 72 horas. **a)** Imágenes representativas de diez capturas realizadas con microscopio confocal de cultivos de células C9 previamente tratados con el inhibidor 5AzadC, expuestas a anticuerpo anti-5mC y anticuerpo secundario conjugado con Alexa®-488, resultado de un estudio exploratorio. **b)** Expresión del gen *Ace* en cultivos de células C9 previamente tratados con el inhibidor 5AzadC. Al término de los tratamientos, el RNA total fue obtenido y sometido a retrotranscripción para obtener cDNA, con este último se realizó qPCR con pruebas TaqMan específicas para los genes *rAce* y para *rGapdh*. Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes ± EE. El * muestra diferencia significativa con el control, $P < 0.05$.

9.2. 5AzadC y cuatro distintos HAPs modifican la expresión de isoformas de CYP

En la **Figura 17** se muestra el análisis de la región reguladora de *CYP1A1* entre el ser humano, ratón y rata, la cual difiere en cuanto al arreglo estructural de sitios de unión a AHR, los sitios conocidos como elementos de unión a xenobióticos XRE, así como en la presencia de islas CpG. La diferencia estructural en cuanto a islas CpG, así como a la sensibilidad a la metilación de la región reguladora en las distintas especies, rata, ratón y ser humano, nos llevaron a plantear el objetivo de determinar si el gen de *CYP1A1* en un modelo celular de rata no canceroso es susceptible a cambios en el estado de metilación del DNA. Para determinar esto, y dada la relación en la inducción génica de los genes de la familia de CYP1, se realizó un único análisis de escrutinio de los tres genes que componen a esta familia y uno no vinculado, el gen *rCYP2E1*. Para este estudio de escrutinio las células C9 fueron expuestas a 0.5 μM 5AzadC solo o en co-exposición con 10 μM BaP.

De los resultados que se muestran en la **Figura 22** se concluyó que 5AzadC por sí sola incrementa hasta 6 y 9 veces la expresión basal de *rCYP1A1* y *rCYP1A2*, mientras que *rCYP1B1* y *rCYP2E1* no cambian respecto al control, además de que la co-exposición 5AzadC-BaP promovió el incremento de la expresión inducida por BaP de *rCYP1A1* y de *rCYP1A2*, no así la de *rCYP1B1* y *rCYP2E1*.

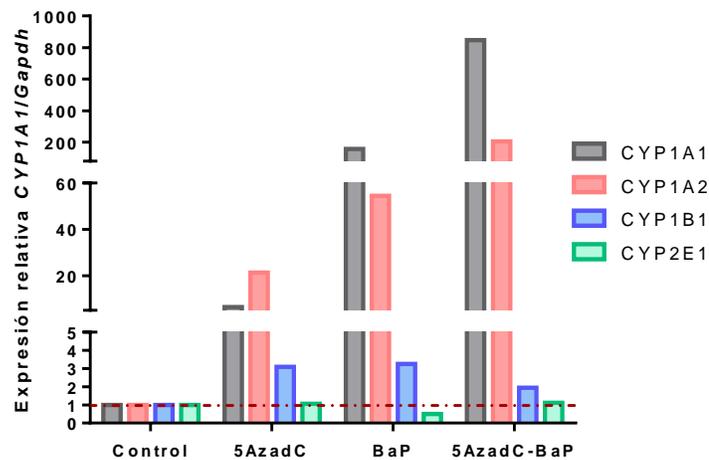


Figura 22. Efecto de la hipometilación del DNA global sobre la expresión de enzimas de la familia CYP1 y CYP2 en células C9.

Ensayo exploratorio de la expresión de *rCYP1A1*, *rCYP1A2*, *rCYP1B1*, y *rCYP2E1*, en células C9 expuestas a concentraciones finales de 0.1%v/v DMSO para grupo control por 72h, 0.5 μM 5AzadC disuelto en amortiguador de fosfatos por 72h, 10 μM BaP disuelto en DMSO por 48 h, y a 0.5 μM 5AzadC y 10 μM BaP conjuntamente. La línea punteada roja representa el control de tratamientos, en el cual las células no recibieron ningún tratamiento. Al término de los tratamientos el RNA total fue extraído y sometido a retrotranscripción para obtener cDNA, de este último se realizó experimentos de qPCR con sondas TaqMan específicas para *rCYP1A1*, *rCYP1A2*, *rCYP1B1*, *rCYP2E1*, y *rGapdh*. Cada barra representa el promedio de tres repeticiones de la reacción de qPCR de un experimento.

Ante los resultados obtenidos en la **Figura 22**, se decidió extender el estudio y evaluar el efecto de cuatro distintos HAPs, BF, BaP, 3MC y DMBA, sobre la expresión de *rCYP1A1* en células tratadas con y sin 5AzadC, con la finalidad de demostrar que el incremento de la expresión inducida de *rCYP1A1* es un comportamiento de los compuestos tipo HAP y no un mecanismo específico de cada compuesto.

La **Figura 23** muestra el efecto de la exposición a cada HAP y el de la hipometilación del DNA celular sobre la exposición a los cuatro HAPs seleccionados sobre la expresión de *rCYP1A1*. Como en la figura se observa, el control de 5AzadC no indujo la expresión de este citocromo, al contrario, se observa la disminución significativa de su expresión; cada HAP indujo significativamente la expresión; solo las co-exposiciones 5AzadC-BF, 5AzadC-BaP, y 5AzadC-DMBA incrementaron significativamente la expresión inducida por su respectivo HAP, mientras que la expresión inducida del citocromo por 3MC no mostró cambio significativo en el tratamiento 5AzadC-3MC. Con estos resultados se corroboró que la concentración de cada HAP fue efectiva para inducir la expresión de *rCYP1A1*. Además, se obtuvo que las co-exposiciones HAP-5AzadC tuvieron comportamientos dependientes de su respectivo HAP.

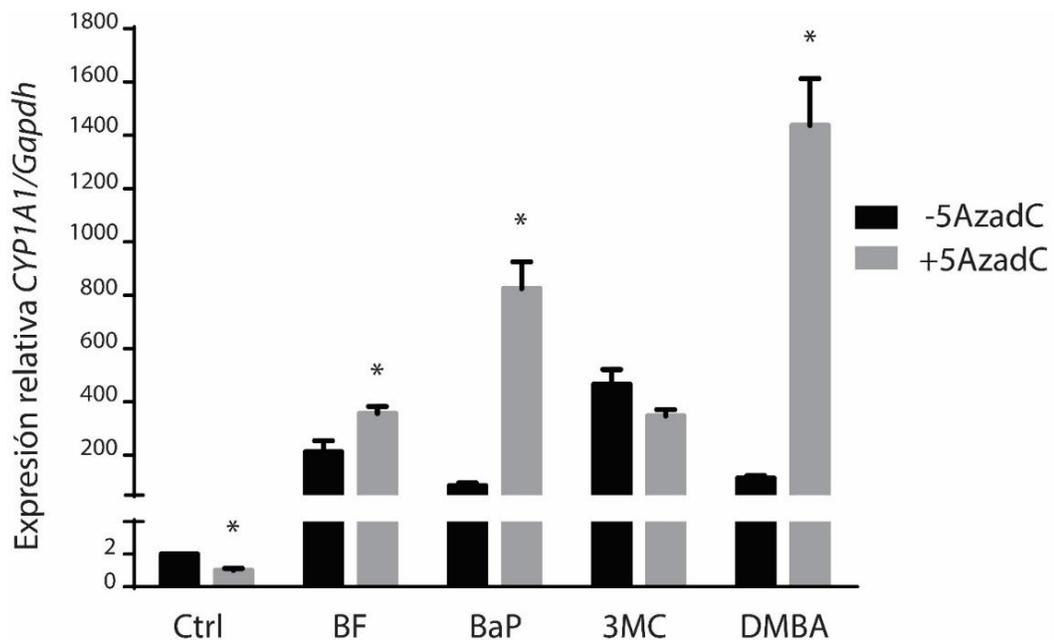


Figura 23. Efecto de la hipometilación del DNA sobre la expresión inducida de *rCYP1A1* por cuatro distintos HAPs.

Cultivos de células C9 de 24 horas fueron tratados con y sin 0.5 μ M de 5AzadC por 72 horas y por las últimas 48 horas fueron sometidos a co-exposición con DMSO, en un volumen final de 0.1%v/v en el grupo control o con 10 μ M de cada uno de los HAPs. Al término de los tratamientos, el RNA total fue extraído y sometido a retrotranscripción para obtener cDNA, el cual se hizo reaccionar con pruebas TaqMan específicas para *rCYP1A1* y *rGapdh*, y con TaqMan Master Mix para amplificar a estos genes mediante qPCR. Cada barra representa el promedio de al menos tres experimentos independientes \pm EE. El * significa la diferencia significativa entre tratamientos con y sin 5AzadC con $P < 0.05$.

9.3. Los niveles proteicos de DNMT1 y DNMT3b son modificados diferencialmente por cuatro distintos HAPs

Dentro de las proteínas vinculadas en el establecimiento de mecanismos de regulación epigenética, las DNMTs y HDACs son las más relevantes. En la **Tabla 4** se resumen los experimentos que al momento se han realizado del efecto de los HAPs sobre DNMTs, HDACs y metilación del DNA.

Dada la posible participación de los HAPs en la alteración de procesos epigenéticos se planteó evaluar la concentración proteica de las enzimas DNMT1, DNMT3a y después de que las células C9 fueron expuestas por 48 con los distintos HAPs.

En la **Figura 24** observamos que ninguno de los HAPs probados alteró los niveles proteicos de la enzima DNMT3a, conocida como enzima de metilación *de novo* del DNA; mientras el nivel proteico de DNMT1 presentó una tendencia al incremento ante la exposición de las células C9 a los HAPs, sin embargo, únicamente los tratamientos con BF y BaP incrementaron significativamente los niveles proteicos de esta metiltransferasa, la cual mantiene la marca de metilación del DNA a través de la duplicación celular; en lo que respecta DNMT3b, la tendencia del nivel proteico de esta enzima es al decremento ante la exposición a los HAPs, aunque, sólo BF causó la disminución significativa del nivel de proteína de esta enzima vinculada también con la metilación *de novo* del DNA.

Los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales sugieren que los HAPs alteran los niveles proteicos de la DNMT1 y DNMT3b a magnitudes dependientes del compuesto.

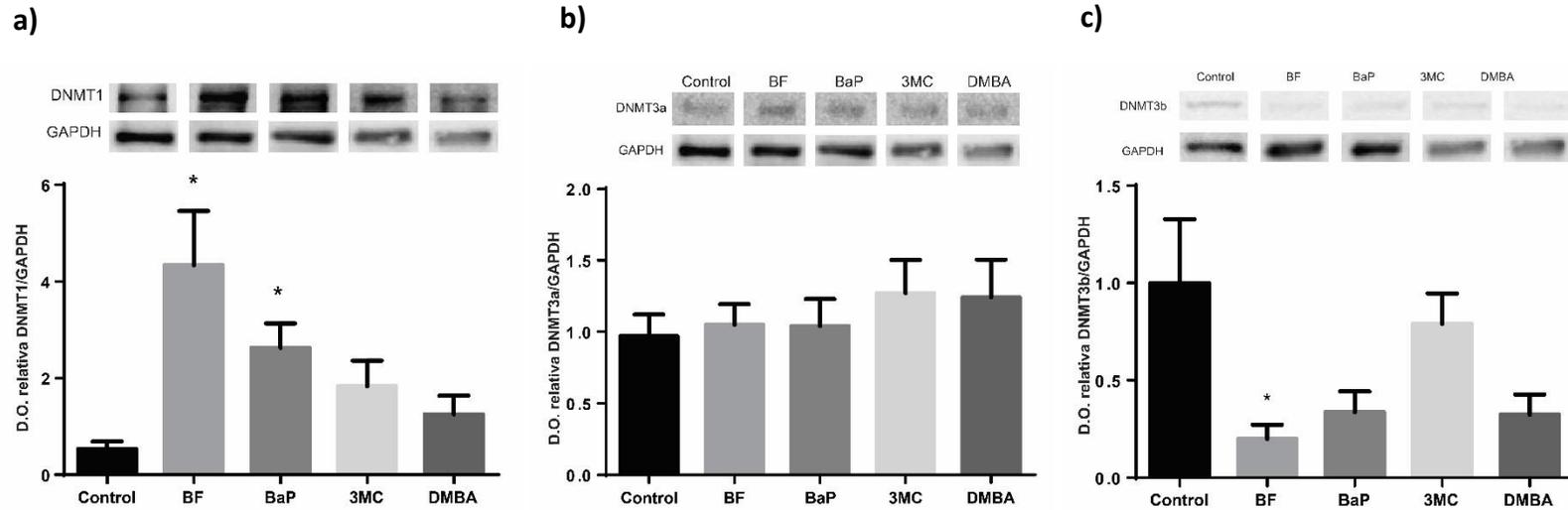


Figura 24. Efecto de cuatro HAPs sobre el nivel de proteína de DNMTs en células C9.

Cultivos de células C9 de 48 h de crecimiento fueron expuestos a 0.1%v/v DMSO para control experimental, o 10 μ M de BF, BaP, 3MC o DMBA, por 48 h. Al término de los tratamientos, la proteína total fue extraída y sometida a separación por electroforesis desnaturalizante, transferida a membrana de nitrocelulosa y expuesta a anticuerpos anti- GAPDH, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b. Cada barra es el promedio del índice de la densidad óptica de la banda de cada proteína de interés, a) DNMT1, b) DNMT3a y c) DNMT3b, entre su respectiva banda de GAPDH, de 4 experimentos independientes \pm EE. El * representa la diferencia significativa con respecto al control del experimento, $P < 0.05$.

9.4. La exposición subaguda a cuatro distintos HAPs no modifica el nivel proteico de tres HDACs clase I

Al igual que las DNMTs, los modificadores de las marcas de acetilación de histonas, como las HDACs, participan en la regulación de epigenética de genes. En la **tabla 4** se resumen resultados y conclusiones de estudios en los que se ha evaluado el efecto de determinados HAPs sobre la expresión o niveles proteicos de HDACs.

Se determinó los niveles proteicos de HDACs después de la exposición de células C9 a BF, BaP, 3MC y DMBA por 48 horas. La **Figura 25** muestra los niveles de proteína de las enzimas que componen a la clase I de HDACs y que fueron evaluadas en este trabajo, la HDAC1, HDAC2 y HDAC3. Bajo nuestras condiciones experimentales ninguna de las las concentraciones proteicas de estas enzimas fue alterada por los HAPs probados.

9.4.1. Los niveles proteicos de HDAC4 y SIRT1 son incrementados ante la exposición subaguda a HAPs

Recientemente las enzimas HDAC4 y SIRT1 han cobrado relevancia en el estudio de la toxicidad por HAPs debido a que han sido reconocidas como proteínas involucradas en los procesos de reparación del daño al DNA, además de que también están participando en la regulación del ciclo celular [315,319–321]. En la **tabla 4** se resumen los experimentos, resultados y conclusiones en los que han evaluado a estas proteínas después de la exposición a HAPs.

La concentración proteica de HDAC4 clase IIa se alteró después de que las células C9 fueron expuestas a los distintos HAPs por 48 horas. En la **Figura 26 a** se observa que la concentración proteica de esta enzima incrementó significativamente ante la exposición a BF y BaP, y que la exposición a 3MC y DMBA no generó cambios en comparación al control.

La enzima SIRT1 es una desacetilasa de histonas clase III. En la **Figura 26 b** se muestra que el nivel proteico de esta enzima incrementó significativamente en células C9 expuestas a BaP y DMBA por 48 horas, no así en la exposición a BF y 3MC.

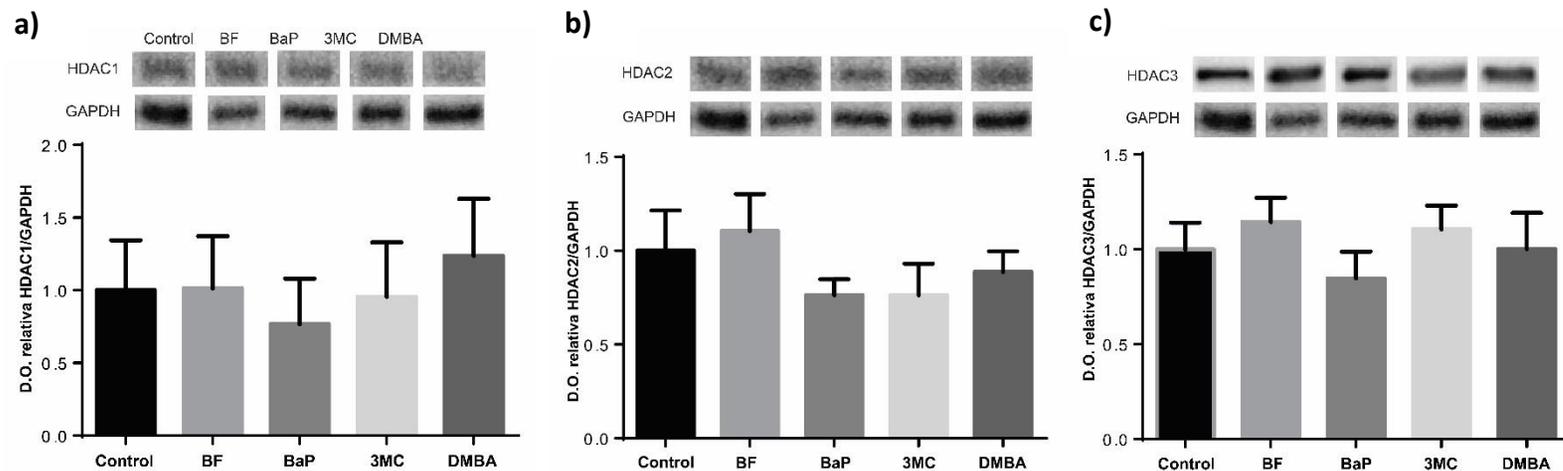


Figura 25. Efecto de HAPs sobre los niveles proteicos de HDACs clase I.

Cultivos de células C9 de 48 h de crecimiento fueron expuestos a 0.1% v/v DMSO, para control experimental, o 10 μ M de BF, BaP, 3MC o DMBA, por 48 h. Al término de los tratamientos, la proteína total fue extraída y sometida a separación por electroforesis desnaturizante, transferida a membrana de nitrocelulosa y expuesta a anticuerpos anti- GAPDH, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b. Cada barra es el promedio del índice de la densidad óptica de la banda de cada proteína de interés, a) HDAC1, b) HDAC2 y c) HDAC3, entre su respectiva banda de GAPDH, de 6 experimentos independientes \pm EE. El * representa la diferencia significativa con respecto al control del experimento, $P < 0.05$.

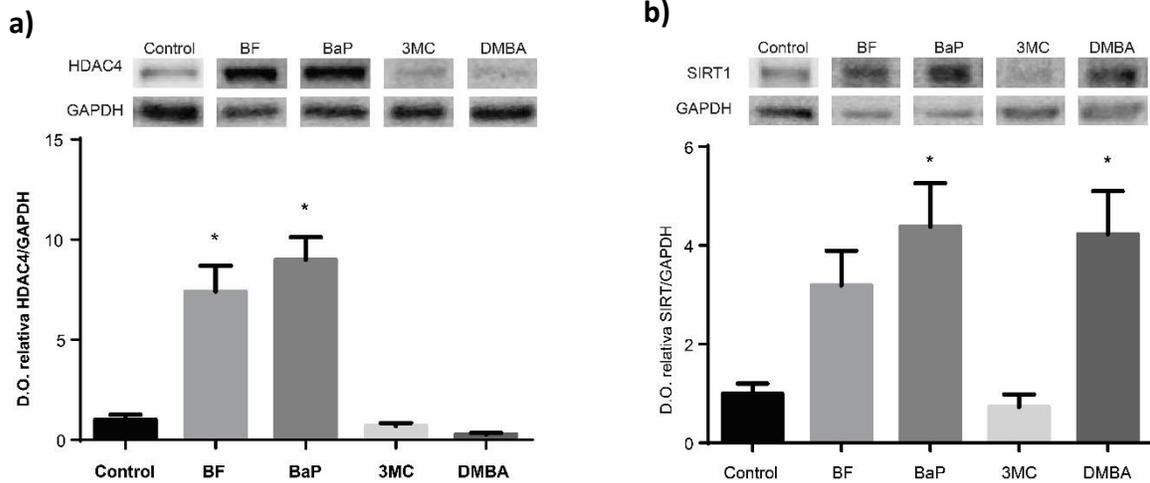


Figura 26. Efecto de cuatro HAPa sobre los niveles proteicos de HDACs clase II y III.

Cultivos de células C9 de 48 h de crecimiento fueron expuestos a 0.1% v/v DMSO, para control experimental, o 10 μ M de BF, BaP, 3MC o DMBA, por 48 h. Al término de los tratamientos, la proteína total fue extraída y sometida a separación por electroforesis desnaturalizante, transferida a membrana de nitrocelulosa y expuesta a anticuerpos anti- GAPDH, HDAC4, y SIRT1. Cada barra es el promedio del índice de la densidad óptica de la banda de cada proteína de interés, a) HDAC4, b) SIRT1, entre su respectiva banda de GAPDH, de 4 experimentos independientes \pm EE. El * representa la diferencia significativa con respecto al control del experimento, $P < 0.05$.

9.5. La exposición subaguda a BaP conduce a la hipometilación del DNA global de las células C9

Para evaluar el efecto de HAPs sobre el estado de metilación de DNA global en cultivos de células C9, se trabajó con BaP debido a la relevancia toxicológica que este compuesto tiene para el ser humano, así como porque existe mayor evidencia de su mecanismo de acción toxicológica. A su vez, se utilizó el inhibidor 5AzadC, dado el incremento proteico de DNMT1 obtenido en células C9 ante su exposición a BaP, para tener la acción de este compuesto como control positivo de la modulación del efecto de la enzima DNMT1 y determinar que el efecto del BaP sobre la DNMT1 efectivamente tiene algún impacto sobre el estado de metilación del DNA total.

La **Figura 27** muestra los resultados obtenidos del estudio del estado metilación del DNA celular. Del análisis de las capturas de las células C9 concluimos que los cultivos tratados con BaP presentan menos intensidad de señal de la marca de 5mC en comparación al control. El efecto de 5AzadC resultó en la disminución de señal de la marca de 5mC, la cual no resultó alterada por la co-exposición con BaP. De estos resultados concluimos que, bajo nuestras condiciones el BaP está promoviendo un estado de hipometilación del DNA celular, a la vez que promoviendo el incremento proteico de DNMT1.

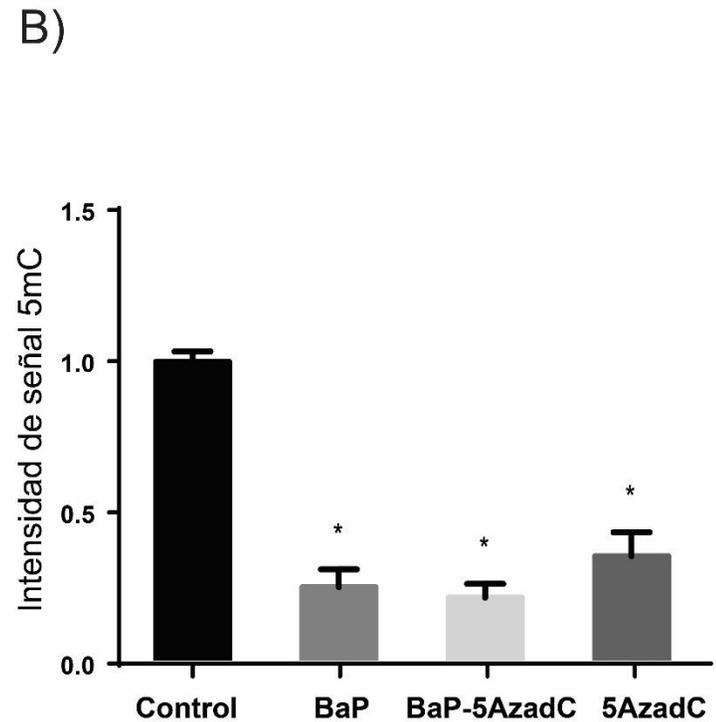
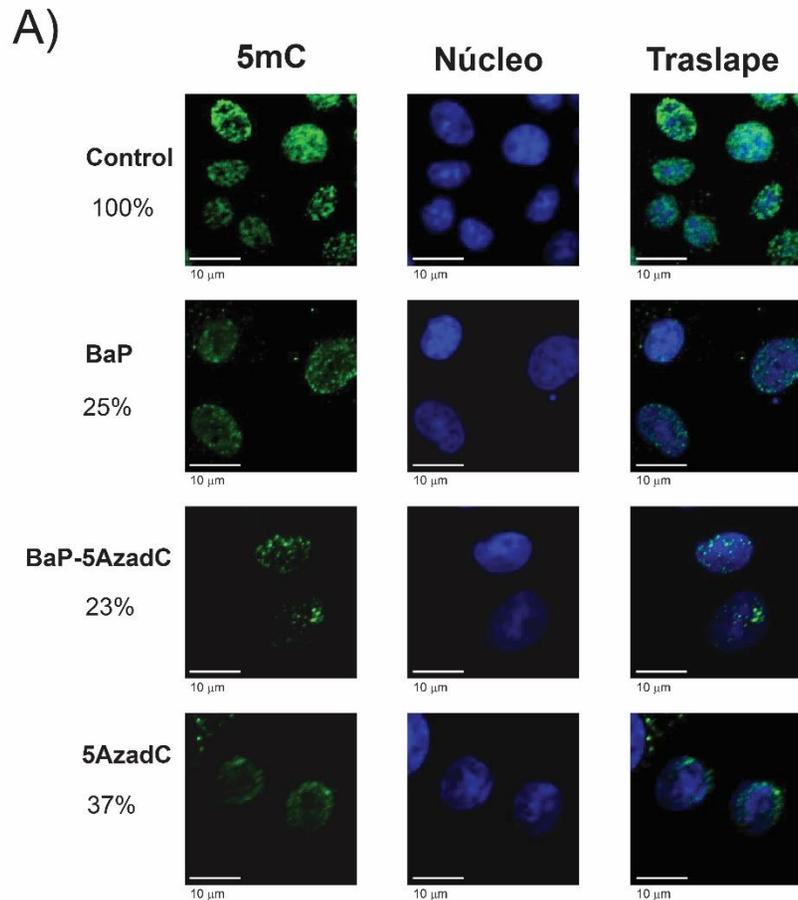


Figura 27. Efecto de BaP sobre el nivel de metilación del DNA de células C9 sin tratar o pretratadas con 5AzadC.

Cultivos de células C9 de 24 horas de crecimiento fueron expuestas a 0.1%v/v DMSO para grupo control por 72 h, 10 μ M BaP por 48 horas, 0.5 μ M 5AzadC por 72 horas, y 0.5 μ M 5AzadC por 72 horas con 10 μ M BaP por las últimas 48 horas. Al término de los tratamientos, las células fueron sometidas a fijación con para-formaldehído, bloqueadas con 0.3% de suero fetal de ratón, expuestas a anticuerpo anti-5mC, y reveladas con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa[®]-488. Las inmunocitoquímicas fueron capturadas con un microscopio de fluorescencia, y las imágenes resultantes analizadas con el programa libre del NIH, Image J. Cada imagen es representativa de diez campos capturados y analizados por cada experimento. Cada barra en el gráfico representa el promedio de intensidad de señal correspondiente a 5mC de dos experimentos independientes.

9.6. Efecto de la exposición subaguda a 5AzadC y BaP sobre CYP1A de hígado de rata

El incremento de la expresión de *rCYP1A1* en las co-exposiciones 5AzadC-HAP en cultivos de células C9 llevó a plantearnos la posibilidad de que en el modelo *in vivo* se podría presentar el mismo comportamiento que en el modelo *in vitro*.

9.6.1. La exposición subaguda vía intraperitoneal a 5AzadC-BaP no modifica los niveles de RNA ni proteicos de CYP1A1/2 de hígado de ratas

Nuestro siguiente objetivo fue la determinación de los niveles de expresión de *rCYP1A1* en ratas macho Wistar después de la administración intraperitoneal de BaP, 5AzadC o el co-tratamiento 5AzadC-BaP. La concentración de 5AzadC que se utilizó se encuentra por debajo de concentraciones que han mostrado toxicidad en modelos murinos y de rata, además de que fue evaluada por un estudio en paralelo en el que se logra el incremento de la expresión del gen *rACE* en hígado de rata [322], un gen que en otro estudio resultó ser modulado tiempo y concentración dependiente por el tratamiento con 5AzadC en hígado de rata [137,318].

La **Figura 28a** muestra el efecto de la 5AzadC sobre la expresión de *rCYP1A1* evaluado en RNA extraído de hígado de ratas, sometido a retrotranscripción y amplificado por la técnica de PCR tiempo real. En dicha figura se puede observar que este inhibidor de DNMTs incrementó significativamente la expresión basal de *rCYP1A1* y no afectó la expresión inducida por BaP.

Además de indicios de posible regulación epigenética mediante metilación del DNA, también se ha sugerido que el gen de *CYP1A1* presenta regulación epigenética mediante participación de micro RNAs, lo cual nos llevó a plantear la posibilidad de que, pese a los resultados de expresión génica, el RNA mensajero de la proteína de CYP1A1 podría experimentar regulación postraduccional que se vería reflejado en los niveles proteicos, dando distinto comportamiento ante el co-tratamiento 5AzadC-BaP. Nuestro siguiente objetivo fue determinar el nivel proteico de CYP1A1, así como su actividad etoxiresorufina-*O*-desetilasa después de la exposición a 5AzadC-BaP. En las **Figura 28b y c** se observa que el tratamiento con el inhibidor de DNMTs no afectó el nivel de proteína ni la actividad enzimática tanto basal como inducida por BaP.

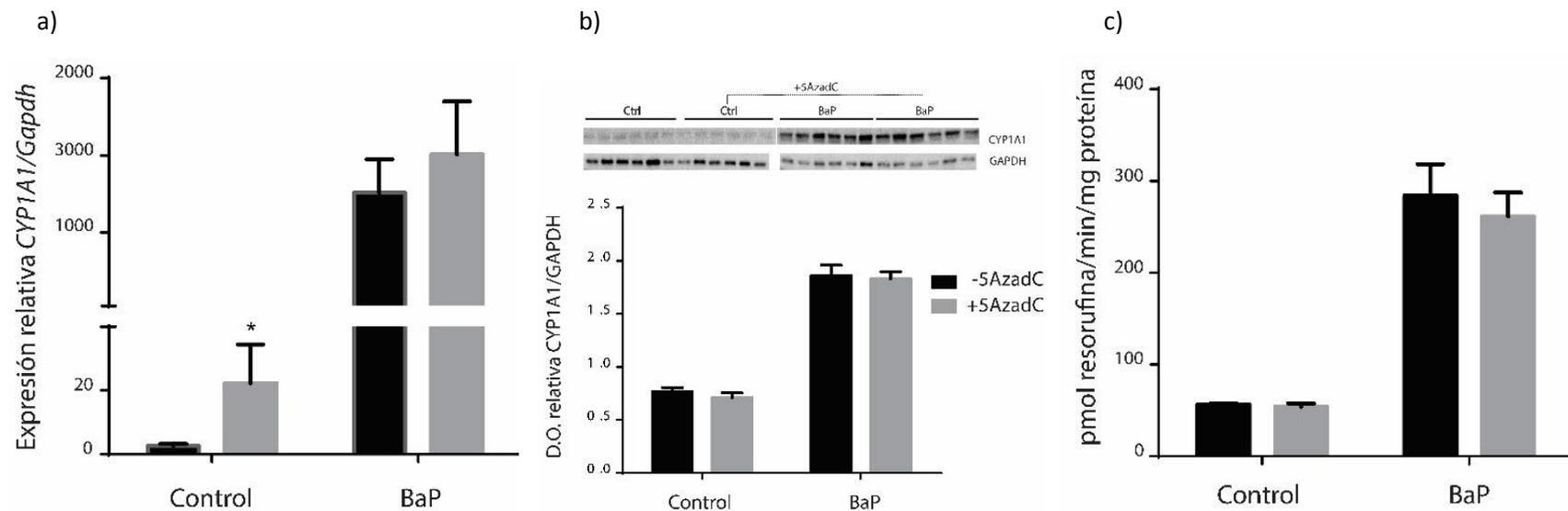


Figura 28. Efecto del inhibidor de DNMTs 5AzadC sobre la inducción de CYP1A1 por BaP en hígado ratas.

Grupos de seis ratas fueron tratadas con 100 μ L de amortiguador de fosfatos por 5 días más 100 μ L de aceite de maíz el quinto día para el grupo control; 1mg/Kg de 5AzadC por 5 días más 100 μ L de aceite de maíz el quinto día para el grupo control del tratamiento con este inhibidor; 100 μ L de amortiguador de fosfatos por 5 días más 50 mg/Kg de BaP el quinto día, 1mg/Kg de 5AzadC por 5 días más 50 mg/Kg de BaP el quinto día. a) Índice de mRNA de *rCYP1A1* versus *rGapdh* en hígado después de cada uno de los tratamientos; b) Índice de niveles de proteína de CYP1A1 versus GAPDH en hígado de rata después de los distintos tratamientos; c) actividad EROD de hígado de rata después de los distintos tratamientos. Cada barra es el promedio de seis ratas \pm error estándar. El * representa diferencia significativa entre grupos con y sin 5AzadC, $P < 0.05$.

CYP1A1 y CYP1A2 son genes presuntamente productos de una duplicación génica, los cuales no sólo poseen características estructurales proteicas similares, sino también de regulación génica, **Figura 4** y **Figura 7**. Sin embargo, *CYP1A2* sí tiene expresión basal en hígado, mientras que *CYP1A1* no. Tomando en cuenta que en nuestro experimento de escrutio en células C9 *rCYP1A2* resultó modulado por el co-tratamiento 5AzadC-BaP, **Figura 22**, nos preguntamos si *rCYP1A2* presenta el mismo comportamiento *in vivo*.

La **Figura 29** muestra los resultados obtenidos a nivel de proteína y actividad enzimática de CYP1A2 después de la administración de ratas con 5AzadC por cinco días en co-tratamiento con BaP el quinto día. En dicha figura se observa que al igual que lo obtenido con CYP1A1, el co-tratamiento con BaP-5AzadC no afectó la inducción de *rCYP1A2* por BaP.

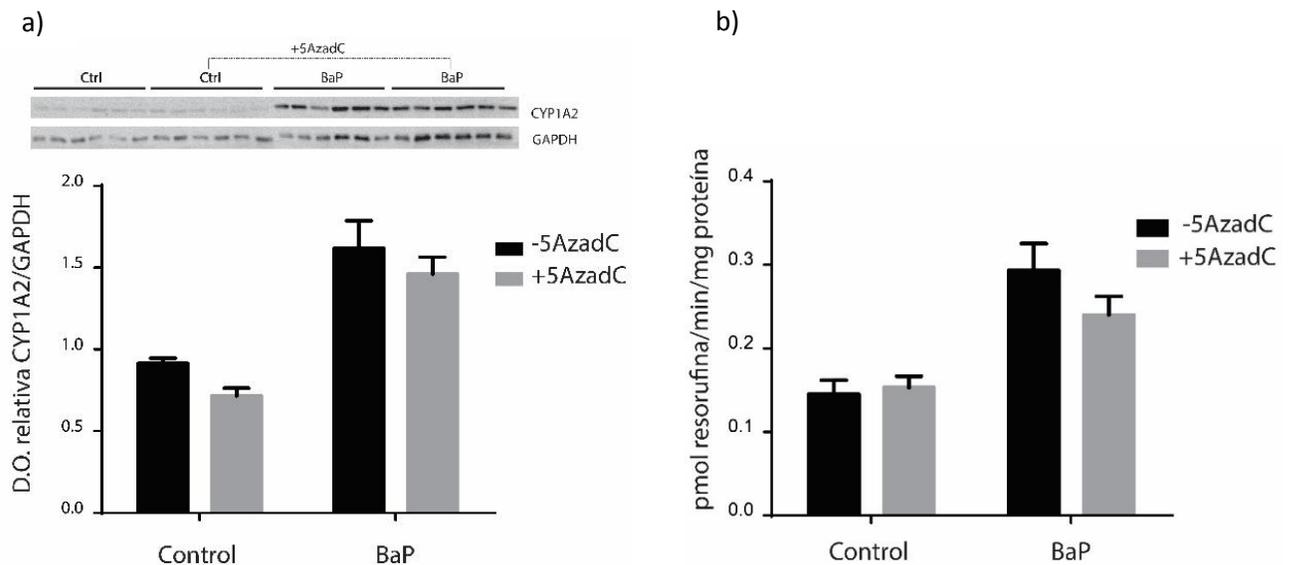


Figura 29. Efecto del inhibidor de DNMTs sobre la inducción de CYP1A2 de hígado de rata por BaP.

Grupos de seis ratas fueron tratadas con 100 μ L de amortiguador de fosfatos por 5 días más 100 μ L de aceite de maíz el quinto día para el grupo control; 0.2 mg/Kg de 5AzadC por 5 días más 100 μ L de aceite de maíz el quinto día para el grupo control del tratamiento con este inhibidor; 100 μ L de amortiguador de fosfatos por 5 días más 50 mg/Kg de BaP el quinto día, 0.2 mg/Kg de 5AzadC por 5 días más 50 mg/Kg de BaP el quinto día. a) Índice de niveles de proteína de CYP1A2 versus GAPDH en hígado de rata después de los distintos tratamientos; b) actividad EROD de hígado de rata después de los distintos tratamientos. Cada barra es el promedio de seis ratas \pm error estándar. El * representa diferencia significativa entre grupos con y sin 5AzadC, $P < 0.05$.

9.7. Efecto de la exposición subaguda vía intraperitoneal de 5AzadC-BaP sobre CYP1A1/2 de hígado de ratones

Estudios en el modelo de células epiteliales de hepatoma de ratón expuestos a Hepa1c1c7 a 2 μ M de AzadC por 72 horas determinaron que ni la expresión basal de *mCYP1A1* ni la inducida por 5 μ M de BaP son afectadas por este compuesto, adicional a que el gen de este citocromo no es modulado por metilación de la isla CpG que presenta la región promotora de *mCYP1A1*, **Figura 17**, [278].

Con la finalidad de corroborar nuestros resultados, decidimos evaluar la expresión de *mCYP1A1* en hígado de ratón con la premisa de que los antecedentes sugieren que este gen no está modulado por el estado de metilación en el que el modelo se encuentre. Para lograr este objetivo, grupos de seis ratones fueron expuestos vía intraperitoneal a una dosis diaria de 0.2 mg/Kg de 5AzadC por 5 días en co-tratamiento con una única dosis de 50 mg/Kg de BaP el quinto día. En la **Figura 30** se muestran los resultados obtenidos, en la cual se observa que 5AzadC no produjo cambios en la expresión génica, nivel de proteína o actividad enzimática basal de CYP1A1 de hígado de ratones ni tampoco en aquellos tratados con BaP.

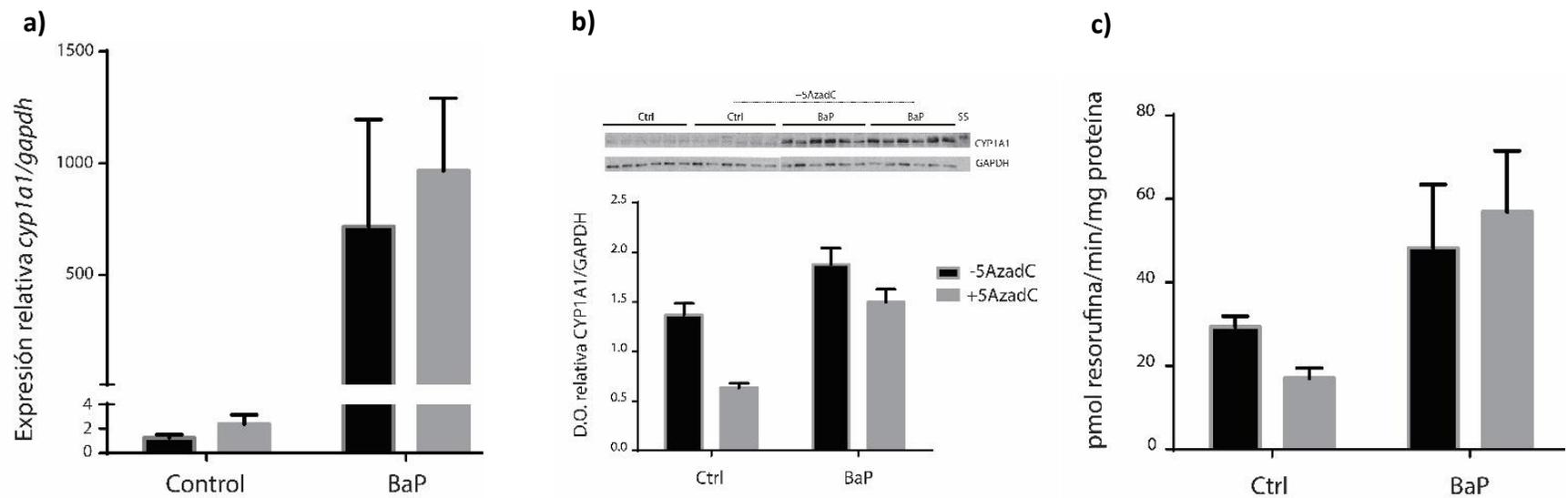


Figura 30. Efecto de 5AzadC sobre la inducción de CYP1A1 de ratón por BaP.

Grupos de seis ratones fueron tratados con 100 μ L de amortiguador de fosfatos por 5 días más 100 μ L de aceite de maíz el quinto día para el grupo control; 0.2 mg/Kg de 5AzadC por 5 días más 100 μ L de aceite de maíz el quinto día para el grupo control del tratamiento con este inhibidor; 100 μ L de amortiguador de fosfatos por 5 días más 50 mg/Kg de BaP el quinto día, 0.2 mg/Kg de 5AzadC por 5 días más 50 mg/Kg de BaP el quinto día. a) Índice de mRNA de *rCYP1A1* versus *rGapdh* en hígado después de cada uno de los tratamientos; b) Índice de niveles de proteína de CYP1A1 versus GAPDH en hígado de rata después de los distintos tratamientos; c) actividad EROD de hígado de rata después de los distintos tratamientos. Cada barra es el promedio de seis ratas \pm error estándar. El * representa diferencia significativa entre grupos con y sin 5AzadC, $P < 0.05$.

*“...la única cosa que necesitamos para ser buenos
filósofos es la facultad de preguntar...”
El mundo de Sofía de Jostein Gaarder*

10. Discusión

Los HAPs son compuestos tóxicos ampliamente distribuidos en el ambiente, algunos de los cuales están clasificados como carcinógenos tipo 1. Estos compuestos han sido de ayuda para dilucidar mecanismos bajo los cuales se desarrolla el proceso de carcinogénesis química, que si bien no son exactamente los mecanismos que se dan en todos los procesos de carcinogénesis dan pauta para el estudio de esta enfermedad.

En 1975, con base en la información que hasta ese momento se tenía, se estimaba que del 80 al 90% de los cánceres humanos eran la consecuencia del tipo de ambiente al que el sujeto estaba sometido [323]. Poco más de cuarenta años han pasado desde que se llegó a esa conclusión y vasta información, cada vez más específica ha sido descubierta desde ese entonces, la cual ha llevado a la estimación de que las mutaciones observadas durante la transformación de células normales a células neoplásicas son causadas en un 29% por factores ambientales, y que el 42% de los cánceres son prevenibles si se evita la de exposición a los factores de riesgo vinculados a estos [324]. Lo anterior mantiene latente el estudio de los mecanismos toxicológicos en los cuales se puede incidir para la prevención o reversión de los efectos por exposición a compuestos ambientales.

Históricamente el estudio de los HAPs en el modelo de carcinogénesis química ha mostrado, por un lado, que estos compuestos requieren ser biotransformados para ejercer su acción mutagénica y, por otro lado, que la acción inicial de estos para el desarrollo de cáncer es el establecimiento de mutaciones en genes claves. Sin embargo, cada vez son más estudios los que han ido mostrando la participación de procesos epigenéticos dentro de la toxicocinética y la toxicodinámica de los HAPs, ya que hay evidencias que sugieren la regulación de las enzimas que biotransforman a estos compuestos mediante procesos epigenéticos, como lo es la metilación del DNA, la cual es una marca epigenética susceptible a cambios ambientales. Pacientes fumadores

presentan cambios en la expresión de la enzima de CYP1A1 debido a la disminución del estado de metilación del DNA en la región regulatoria del gen de este citocromo [276]. Esta reducción está vinculada con la exposición a los contaminantes encontrados en el humo del cigarro, pues los pacientes no fumadores muestran niveles normales de metilación de las mismas regiones regulatorias evaluadas [276].

En contraparte, como complemento de los mecanismos toxicocinéticos de los HAPs, desde hace algunos años se planteó la posibilidad de que estos compuestos tienen efectos previos al establecimiento de las mutaciones, tales como inducción de la hipometilación del DNA de genes claves en el desarrollo del cáncer, como son los oncogenes *Ha-ras*, *c-myc* y *p53* [307,325], además de que en la evolución de un tejido normal a un tejido neoplásico maligno, ya sea inducido químicamente o con curso patológico proveniente de estudios epidemiológicos, se ha observado la disminución progresiva de la metilación del DNA global, el incremento del nivel proteico de DNMT1, disminución general de la acetilación de histonas H3 y H4, e incremento de HDACs, de tal manera que estos cambios ya son considerados como marcas distintivas del cáncer consistentemente [326–328].

Con la creciente evidencia sobre la relevancia de la alteración de procesos epigenéticos en el establecimiento de la célula neoplásica se ha propuesto que el cáncer se da en tres pasos: disrupción epigenética de las células progenitoras, mutación iniciadora, y plasticidad genética y epigenética [294]. Por lo cual, se sugiere a los compuestos carcinogénicos, tales como los HAPs, agentes con alta probabilidad de alterar a moduladores y modificadores epigenéticos. Entendiendo por modificador los productos de genes cambian directamente al epigenoma a través de mecanismos como metilación del DNA, transformaciones post-traduccionales de la cromatina o alteración de la estructura de la misma; un mediador se refiere a aquellos genes cuyos productos son el blanco de acción de los modificadores y que generalmente son claves en el establecimiento de la célula tumoral; y un modulador es aquel cuya acción es en vías de señalización y metabólicas que están actuando sobre las proteínas modificadoras y de los mediadores, y que sirven como vía por la cual los agentes ambientales, inflamatorios, de lesiones y otras formas de estrés están actuando para promover el establecimiento de la célula neoplásica [295].

Los antecedentes nos llevaron a preguntarnos si los cambios observados en la expresión de *hCYP1A1* vinculados a su estado de metilación del DNA en individuos expuestos crónicamente a humo de cigarro y los cambios en los niveles proteicos de modificadores epigenéticos observados en la exposición crónica a HAPs, ambos procesos establecidos progresivamente en líneas celulares cancerosas, también se presentarán como resultado de la exposición subaguda a estos compuestos.

10.1. Modulación de CYP1A1 por 5AzadC en modelos hepáticos

10.1.1. La expresión transcripcional de *rCYP1A1* es alterada por un estado de metilación del DNA disminuido en células epiteliales C9

Una de las paradojas de la toxicología es el hecho de que diversos xenobióticos inducen la expresión de las enzimas que los biotransformarán, los HAPs son parte de ese grupo de xenobióticos. Estos compuestos se unen al receptor AHR, lo cual activa al receptor para reubicarse en el núcleo y formar el heterodímero capaz de unirse a la región enhancer del gen de CYP1A1, cuya proteína biotransforma a los HAPs metabolitos hidroxilados que darán pauta a la formación de los metabolitos mutagénicos diol-epóxidos.

Los compuestos BaP, DMBA, bifenilos policlorados, etc., son biotransformados a compuestos mutagénicos, sin embargo, también tienen actividad mitogénica a través de diversas proteínas, causando múltiples daños en una célula, lo cual la conduce al inicio del proceso de anaplasia. Debido a esta acción mutagénica y mitogénica, estos compuestos son denominados carcinógenos completos [7]. La modulación de la expresión del gen de CYP1A1 permitirá mayor o menor generación de metabolitos mutagénicos, por tanto, su estudio resulta relevante para los procesos de quimioprevención.

Con base en la premisa de que la estructura de la región regulatoria de *rCYP1A1* posee dos islas CpG y que en estudios previos 5AzadC incrementó la cantidad proteica de CYP1A1 en un cultivo primario de hepatocitos de rata [329], en este estudio evaluamos si la expresión del gen de *rCYP1A1* de rata es modificado por el estado de metilación del DNA global inducido por 5AzadC.

Nuestros resultados sugieren que la exposición subaguda de células C9 a 5AzadC junto con los HAPs incrementa la expresión inducida de *rCYP1A1* por el respectivo HAP, mostrando la posibilidad de que este gen o alguno de los factores transcripcionales involucrados en su transcripción sea regulado por la metilación del DNA. En el año 2007 Schnekenburger realizó una serie de ensayos con los que determinó que el complejo DNMT1-HDAC1 está unido a la región promotora de *mCyp1a1* en células de hepatoma de ratón, actuando como un complejo represor de la expresión transcripcional basal [330]. En ese mismo estudio se descartó la posibilidad de que *mCyp1a1* estuviera regulado por metilación del DNA de su gen, ya que en la evaluación de esta marca mediante secuenciación no mostró cambios debidos a la exposición a BaP.

Otro de los mecanismos por los que el 5AzadC actúa es mediante la promoción de la degradación de la DNMT1 [141], de tal manera que sugerimos la posibilidad de que el complejo HDAC1-DNMT1 se vea afectado por la acción inhibitoria de 5AzadC, permitiendo el incremento de la inducción *rCYP1A1* en un estado de hipometilación del DNA celular promovido por 5AzadC.

10.1.2. La expresión transcripcional de *rCYP1A1* no es modificada por un estado de hipometilación del DNA hígado de rata

Posterior a los experimentos *in vitro*, nos planteamos evaluar expresión de CYP1A1 de hígado de rata ante la exposición a 5AzadC y al co-tratamiento 5AzadC-BaP. Lo anterior lo llevamos a cabo en ratas macho Wistar jóvenes, a las cuales se les administró vía intraperitoneal por cinco días 5AzadC y en co-tratamiento con BaP en el quinto día.

La vía principal por la que actúa la 5AzadC es a través de su incorporación al DNA, posterior inhibición de y degradación de DNMTs [142], lo cual en el hígado toma alrededor de un año, considerando la velocidad de proliferación de sus células [331]. Sin embargo, nuestra hipótesis estaba basada en los resultados sobre una vía de acción de la 5AzadC que promueve la degradación proteasomal de DNMT1 sin necesidad de incorporarse al DNA [141]. Además de que se verificó que 5AzadC induce la expresión de *rACE* [322], un gen que se expresa transcripcionalmente cuando pierde la metilación del DNA en su región promotora, de tal manera que indirectamente nos confirma la disminución de metilación del DNA por la exposición a 5AzadC.

El escalamiento del efecto de la 5AzadC sobre la expresión inducida de *rCYP1A1* en el modelo *in vitro* a un modelo *in vivo*, en nuestras condiciones, no generó cambio en la expresión génica ni proteica de este gen. Lo cual, sugiere que *in vivo* el efecto de 5AzadC no afecta la expresión de este citocromo. Sin embargo, nuestro diseño experimental no respondió completamente a la pregunta de si *in vivo* este citocromo es modulado por la metilación del DNA, ya que a la par de que se realizaban y concluían los experimentos aquí presentados, un equipo de investigadores japoneses publicaron resultados que sugieren la demetilación del promotor de *mCyp1a1* vía Tet-Tdg dependiente de la acción de Ahr [332].

La desmetilación de *mCYP1A1* sugiere una memoria de inducción de *mCyp1a1*, además de que muestra que el gen de este citocromo sí está siendo modulado por metilación del DNA, aunque siguiendo la vía de desmetilación a través de la acción de las proteínas Tet y Tdg. Como se observó en los resultados *in vitro*, la exposición a 5AzadC promovió el incremento de la expresión de *rCYP1A1* mostrando que este gen es sensible al estado de metilación del DNA, los hallazgos hasta ahora encontrados muestran que este gen es modulado por la metilación del DNA, aunque muy probablemente a través de modificación de la marca por desmetilación activa.

Nuestros estudios muestran la importancia de la evaluación temporal de la exposición a los compuestos que se están probando, ya que nuestro diseño experimental únicamente consideró la exposición aguda a BaP (una

sola dosis en el quinto día de tratamiento) en los modelos *in vivo*, ya que no hubo cambios en la expresión inducida de *rCYP1A1*.

Es importante mencionar que nuestro diseño experimental consideró el uso del inhibidor 5AzadC para promover un estado de hipometilación del DNA global, sin embargo esta estrategia no es mecánicamente igual a promover la desmetilación del DNA, ya que la inhibición de la DNMT1 considera la pérdida de metilación del DNA de forma pasiva a través de los múltiples ciclos de replicación celular, mientras que la desmetilación activa a través de TET-TDG es un mecanismo independiente del ciclo celular y, en términos generales, independiente de la acción de la DNMT1 [142].

10.1.3. La expresión transcripcional de *rCYP1A1* no es modificada por un estado de metilación del DNA disminuido hígado de ratón

Pese a los resultados negativos en la promoción de la expresión de *CYP1A1* de rata ante su exposición a 5AzadC-BaP, y tomando en cuenta los antecedentes de respuesta que se ha observado en células de hepatoma de ratón a nivel de metilación del DNA [278], nos propusimos evaluar el efecto del tratamiento 5AzadC-BaP en hígado de ratones Balb/c jóvenes en comparación con el tratamiento solo con BaP. Realizamos el mismo protocolo de administración que con ratas. Los resultados muestran que la combinación 5AzadC-BaP no es estadísticamente distinta de lo obtenido con BaP sólo, pese a que sí se observa un ligero incremento. La ausencia de efecto de 5AzadC sobre la expresión inducida de *rCYP1A1* de ratón concuerda con estudios en hepatoma de estos organismos en donde tampoco observan cambio en la expresión de este gen al ser expuesto a 5AzadC en combinación con BaP o TCDD, sin embargo, resultados recientes muestran que este gen sí es modulado por cambios en la metilación del DNA de su promotor, solo que a través de la secuencia de oxidación de 5mC a 5hmC, 5fC, 5caC, para regenerarse nuevamente a citosina [332].

10.2. Alteración del perfil proteico de modificadores epigenéticos en células C9 expuestas a HAPs durante 48 h

10.2.1. Disparidad en los cambios obtenidos en la concentración proteica de DNMTs y el estado de metilación del DNA por la exposición subaguda a HAPs en células epiteliales C9

Nuestros resultados muestran que algunos HAPs modulan los niveles proteicos de DNMTs en distintos grados. Para el caso de DNMT1, los cuatro HAPs probados incrementaron su nivel proteico, sin embargo, sólo BaP y BF lograron cambios estadísticamente significativos. El incremento de DNMT1 logrado después de la exposición de células C9 a BaP o BF podría ser una respuesta al daño al DNA debido a la acumulación de células en fase S del ciclo celular esperando a que su DNA sea reparado [333], sin embargo, los experimentos fueron terminados a las 96 h en donde no hubo disminución de más del 20% de la viabilidad celular (**figura 18**), lo cual debilita esta hipótesis porque a ese porcentaje de confluencia, alrededor del 80%, se espera que la mayoría de las células se encuentren G0-G1 [334].

También hay la posibilidad de que DNMT1 sea modificada por BaP o algunos de sus metabolitos, de tal manera que afecte la región N-terminal vinculada con su degradación proteasomal, promoviendo así su estabilidad proteica y por tanto acumulación independientemente de la fase del ciclo celular [123]. Aunque, por otro lado, son múltiples las proteínas vinculadas con la estabilidad de DNMT1, entre ellas se ha propuesto a MAD2, la cual es reguladora del ciclo celular, particularmente de la fase M-G2. El incremento de esta proteína en células expuestas a BaP se ha asociado con el aumento proteico de DNMT1 [284], ya que MAD2 podría estar participando en la inhibición de la degradación de DNMT1 al inhibir a CDC20, una proteína propuesta para el reconocimiento de DNMT1 para su ubiquitinación y posterior degradación [124].

Ante los resultados obtenidos y teniendo como antecedente la progresiva disminución de la metilación del DNA en el proceso de carcinogénesis química [292], nos planteamos la determinación del estado de metilación del DNA global, para lo cual decidimos exponer a las células C9 a BaP y mediante inmunofluorescencia de la marca del anticuerpo anti-5mC en las células C9 determinamos la marca de metilación de los sitios CpG. En concordancia con lo observado en el modelo de multitarcinogénesis, pero haciendo énfasis que nuestro estudio se realizó posterior a 48 h de exposición a BaP, nuestros resultados mostraron la reducción de la metilación del DNA global. El hecho de que el BaP promueva la pérdida de la

metilación del DNA celular en tiempos tan cortos apoya la hipótesis de la disrupción epigenética en etapas muy tempranas del proceso de carcinogénesis química.

A la par de que se concluían nuestros experimentos, otro grupo de investigación publicó un artículo cuyo objetivo es distinto al nuestro, pero que dentro de los experimentos que realizan determinan el estado de metilación del DNA global y niveles proteicos de DNMTs y HDACs clase I después de 24 horas de exposición de células epiteliales de bronquio humano a distintas concentraciones de BaP. Sus resultados concuerdan y apoyan nuestros resultados en células epiteliales de hígado de rata, es decir, obtienen hipometilación del DNA global, incremento proteico de DNMT1 y disminución de DNMT3b, así como aumento de HDAC2 y 3 [308].

El evento de hipometilación del DNA posterior a la exposición celular de C9 a BaP podría ser resultado de la respuesta celular ante el daño al DNA, el cual se manifiesta con el incremento de poli(ADP-ribosa) (PAR) y este a su vez es un inhibidor de la actividad catalítica de DNMT1, ya sea como molécula o unido a la poli(ADP-ribosa)-polimerasa 1 (PARP1). Esto se ha visto en células 16HBEC expuestas a BaP, en donde tal exposición conduce a la hipometilación del DNA a la vez que eleva los niveles de PAR [88,335].

Dicha hipometilación del DNA promovida por BaP ha mostrado tener repercusiones locales como lo es la pérdida local de metilación en los genes *c-Myc* y *cyp1a1*, sin embargo, esta pérdida de metilación local, al menos para *cyp1a1*, se ha demostrado que sigue la vía de desmetilación coordinada por Tet2/Tet3 y Tdg, dos modificadores epigenéticos [332].

10.2.2. Cambio en la concentración proteica de HDACs clase II y III por la exposición subaguda a HAPs en células epiteliales C9

El otro grupo de modificadores epigenéticos que en este trabajo evaluamos, fueron algunas proteínas de la familia de HDACs. Previamente se ha observado que las células cancerosas, en términos generales, experimentan la pérdida de acetilación de histonas, sugiriendo o bien un incremento en la capacidad catalítica de las HDACs o su aumento proteico, que es esto último lo que más ha sido evaluado y observado [327]. Las desacetilasas de histonas que en el presente trabajo se evaluaron fueron de la clase I de HDACs: HDAC1, 2 y 3; de la clase II: HDAC4; y de la clase III: SIRT1.

Posterior a la exposición de las células C9 a cada uno de los HAPs, obtuvimos que HDAC1, 2 y 3 no resultaron afectadas en ninguno de los tratamientos con HAPs. Esto resultó sorprendente, pues varios tipos de cáncer presentan sobreexpresión de estas proteínas, las cuales han sido vinculadas con incremento en la

proliferación celular, pérdida de la diferenciación y evasión de apoptosis [327,336]. Estos son eventos claves en la etapa de iniciación de carcinogénesis química. Además de que células alveolares expuestas a humo de cigarro mostraron degradación de estas proteínas cuatro horas después de su exposición al humo de cigarro [314], mientras que células epiteliales de bronquio humano expuestas a BaP por 24 horas incrementaron los niveles proteicos de HDAC2 y 3 [308].

Las HDACs también han sido involucrados en la modulación de procesos celulares como respuesta al daño al DNA, recombinación homóloga e integridad cromatínica [337], de tal manera que si desde el inicio de la exposición a los HAPs, estos estuvieran alterando los niveles proteicos de las HDACs también podrían estar permitiendo un ambiente adecuado para el establecimiento de mutaciones, pues procesos como reparación del DNA estaría viéndose afectados.

Continuamos nuestra búsqueda de HDACs afectados ante la exposición a los cuatro HAPs seleccionados, esta vez evaluamos a HDAC4 de la clase II, el cual ha mostrado recientemente ser partícipe en el mantenimiento de la fase G2 del ciclo celular [320,338]. Esta es una proteína citoplasmática, la cual, ante el daño al DNA se transporta al núcleo para llevar a cabo sus funciones proteicas [319]. En el presente estudio, como resultado del insulto causado por BaP y por BF, los niveles proteicos de HDAC4 aumentaron en ambas situaciones. El incremento sostenido de HDAC4 en el núcleo ha sido vinculado con el fallo en la reparación del DNA [320], y su sobreexpresión también ha sido reportada en varios tipos de cáncer [338].

La clase III de HDACs, particularmente SIRT1 ha sido identificado como oncogén y como gen supresor de tumor en los procesos carcinogénicos [339]. Sorpresivamente la exposición de las células C9 a BaP y DMBA produjo incremento en los niveles proteicos de esta enzima, no su exposición a 3MC y BF. La alteración proteica de SIRT1 ha sido vinculada con la promoción de la apoptosis posterior a un daño al DNA, aunque, la alteración de su capacidad catalítica también ha mostrado sensibilizar a las células en respuesta a daño por estrés oxidante [177].

El incremento de SIRT1 ante la exposición aguda a BaP y DMBA, posiblemente sea una respuesta normal para una correcta reparación del DNA, proceso en el que SIRT1 está participando mediante la estabilización de p53 en un estado inactivo [177,321,327]. Sin embargo, todo estímulo crónico, como lo es la exposición a HAPs en nuestro medio ambiente, puede finalmente llevar a la alteración de la proteína, lo cual significaría un nivel de SIRT1 permanentemente elevado, en un estado tipo oncogén, como se ha visto en varios tipos de cáncer [315,340].

11. Conclusiones

Tabla 5. Perfil proteico de CYP1A1 y modificadores epigenéticos en células C9 después de su exposición subaguda a cuatro HAPs.

Cel C9 – 10 μ M, 48 h	BF	BaP	3MC	DMBA	5AzadC
CYP1A1	+5AzadC Incrementa	+5AzadC Incrementa	+5AzadC NC	+5AzadC Incrementa	Incrementa
DNMT1	Incrementa	Incrementa	NC	NC	-
DNMT3a	NC	NC	NC	NC	-
DNMT3b	Disminuye	NC	NC	NC	-
HDAC1	NC	NC	NC	NC	-
HDAC2	NC	NC	NC	NC	-
HDAC3	NC	NC	NC	NC	-
HDAC4	Incrementa	Incrementa	NC	NC	-
SIRT1	NC	Incrementa	NC	Incrementa	-
Metilación del DNA	-	Disminuye	-	-	Disminuye

NC, no cambia

(-), no evaluado

El diseño experimental nos permitió lograr resultados que mostraron a los cuatro HAPs evaluados con la capacidad de modificar, cada uno en distinto grado, el nivel proteico de DNMT1, DNMT3b, HDAC4, y SIRT1. Adicionalmente, la exposición a BaP promovió la hipometilación del DNA celular, pese a que incrementó el nivel proteico de DNMT1. Estos cambios fueron logrados posterior a 48 h de exposición a los HAPs en células normales de epitelio de hígado de rata. Lo cual comprueba nuestra hipótesis de que los HAPs alteran el nivel proteico de modificadores epigenéticos.

La exposición de las mismas células a 5AzadC en combinación con los HAPs incrementó el mRNA de *rCYP1A1*, sin embargo, en el modelo hepático *in vivo* la combinación 5AzadC-BaP no generó ningún cambio en comparación a la exposición a BaP, lo cual también ocurrió en el modelo de hígado de ratón con una administración subaguda. Estos resultados muestran que, bajo nuestras condiciones, nuestra hipótesis de que cambios en el estado de metilación del DNA celular alteran la expresión de CYP1A1 de hígado de rata, fue comprobada en el modelo *in vitro*, pero no en el *in vivo*.

De este estudio concluimos que los HAPs modificaron el nivel proteico de modificadores epigenéticos y el estado de metilación del DNA celular, y aún con estos cambios su efecto sobre la expresión de *CYP1A1* se mantuvo en el modelo *in vivo* e inclusive fue incrementado en el modelo *in vitro*.

12. Perspectivas

De los resultados obtenidos en este estudio, así como de la información lograda por otros grupos de investigación, nos preguntarnos la importancia de la supresión de la actividad catalítica de DNMT1, así como del incremento de SIRT1 y HDAC4 en el proceso de toxicidad por HAPs.

También nos preguntamos el papel que la modificación de DNMT1, HDAC4 y SIRT1 estaría jugando en procesos que dan pauta al establecimiento de la célula transformada como lo son la proliferación celular exacerbada, la inhibición de la apoptosis, y la pérdida de la diferenciación celular.

Por otro lado, bajo nuestras condiciones no se lograron cambios en la expresión de *rCYP1A1* ante la administración de 5AzadC-BaP en modelos *in vivo* de rata y ratón, por lo cual, nos preguntamos cuál será el comportamiento de este gen en un estudio subcrónico, dada la participación de Tet2 y Tet3 en la desmetilación del DNA de la región promotora de *CYP1A1* en ratón.

Tomando en cuenta que la expresión de CYP1A1 fue incrementada en el co—tratamiento con 5AzadC en condiciones de cultivo celular, no preguntamos la posibilidad de que en situaciones patológicas en las que la proliferación celular del hígado esté incrementada y que la exposición a los HAPs promueva un estado de hipometilación del DNA celular se produzca un ambiente hepático mucho más susceptible al daño por los HAPs debido al incremento de su bioactivación.

Las evaluaciones que consideramos son necesarias para conocer más a fondo y apoyar contundentemente el efecto de los HAPs en exposiciones subagudas y subcrónicas son las siguientes.

- Niveles proteicos de DNMT1, DNMT3b, HDAC4 y SIRT1, estado de metilación del DNA y de acetilación de histonas en estudios subcrónicos y a diferentes concentraciones de los HAPs probados *in vitro* e *in vivo*.
- Estado catalítico de DNMT1 posterior a la exposición a los HAPs seleccionados.
- Mecanismo por el cual los HAPs promueven cambios en la metilación del DNA.
- Importancia del incremento de DNMT1, HDAC4 y SIRT1 en exposiciones de 0 – 72 h a HAPs en procesos celulares como proliferación, apoptosis y/o pérdida de la diferenciación.
- Efecto de hipometilación global del DNA inducida por BaP en la alteración de la expresión de oncogenes en exposiciones agudas y subagudas.

13. Materiales y Métodos

Materiales

Todos los reactivos usados para PCR tiempo real, el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488®, y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP fueron adquiridos de Invitrogen-Life Technologies (San Francisco, CA, USA). Los anticuerpos primarios contra CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, DNMT1, DNMT3a, HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC4 fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA). Los anticuerpos contra 5-metilcitosina, DNMT3b y SIRT1 fueron adquiridos de Abcam (San Francisco, CA, USA). El anticuerpo contra GAPDH fue adquirido de Millipore (Billerica, MA, USA). El medio DMEM y el antimicótico-antibiótico fueron obtenidos de Gibco-Life Technologies (San Francisco, CA, USA). La línea de células epiteliales clona 9 de hígado de rata, CRL-1439, fue comprada a ATCC (Manassas, VA, USA). El suero fetal bovino fue comprado de ByProducts (Guadalajara, Jal., México).

Los reactivos no enlistados en esta sección fueron adquiridos de Sigma Aldrich Co. (St. Luis, MO, USA).

Cultivo de células epiteliales clona 9 de hígado de rata

Se cultivó a las células en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico, a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

En la caracterización de la línea celular bajo las condiciones de trabajo dentro de nuestro laboratorio, se determinó que posee una fase lag de 24 h y tiempo de duplicación de 11 h. Ante estos resultados y los objetivos del proyecto se estableció la cantidad de 5x10⁵ células para la siembra inicial, con la cual se logra aproximadamente el 100% de confluencia en 96 horas.

Para el mantenimiento de la línea celular, se trabajó con un cultivo de 5x10⁵ células en dilución 1:10, con cambio de medio cada tercer día. Cuando el cultivo alcanzó aproximadamente el 100% de confluencia, se cosechó a las células con 0.25% de tripsina-EDTA. Para los tratamientos se utilizó el quinto pase de las células, de las cuales se sembraron 5x10⁵ células en cajas Petri de 100mm, 5x10⁴ células en placa de 24 pozos o 3x10³ en placa de 96 pozos en una dilución 1:10, con cambio diario del medio. Los experimentos tuvieron una duración de 96 horas. Los tratamientos fueron iniciados 24 horas después de la siembra de las células. El esquema de exposición a los compuestos fue el siguiente:

1. **Control:** 0.1% v/v de DMSO por 72 horas.
2. **HAPs:** 10 µM de BF o BaP o DMBA o 3MC por las últimas 48 horas del experimento. Los HAPs estuvieron disueltos en DMSO, el cual tuvo una concentración final en cultivo celular de 0.1% v/v.
3. **HAP-5AzadC:** 0.5 µM de 5AzadC disuelto en amortiguador de fosfatos pH 7.4 por 72 horas en co-exposición con 10µM BaP las últimas 48 h.

4. **5AzadC:** 0.5 μ M de 5AzadC disuelto en amortiguador de fosfatos pH 7.4 por 72 horas.

Al término del tiempo de los tratamientos, los cultivos fueron procesados para la determinación de RNA y proteína.

Viabilidad de las células epiteliales C9 después de su exposición subaguda a HAPs y 5AzadC

La viabilidad fue determinada mediante la capacidad mitocondrial de las células por reducir el MTT a formazán. Para determinar el efecto de los distintos tratamientos sobre la viabilidad de las células epiteliales C9, 24 horas después del último tratamiento las células fueron incubadas con 5 μ g/mL de MTT durante 1 hora, lavadas con PBS, y extraído el azul de formazán con DMSO 100% para determinar su absorbancia a 570 nm en el lector de placa Synergy HT®.

Obtención proteína total de células C9

A las 24 horas del último tratamiento se retiró el medio y las células fueron lavadas dos veces con amortiguador de fosfatos pH 7.4 y cosechadas en amortiguador de fosfatos pH 7.4 adicionado con inhibidores de proteasas. La suspensión de células resultante se centrifugó a 200 g por 5 minutos, el botón resultante se resuspendió en amortiguador RIPA adicionado con Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets®. La suspensión se sometió a tres ciclos sonicación, tres veces de diez segundos cada una y tres minutos de espera entre ciclo. La cantidad de proteína total se determinó mediante la técnica Bradford y las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

Animales

Los experimentos con animales fueron realizados bajo lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 y con la aprobación con el número de protocolo 239 por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Los animales que se usaron en este protocolo fueron 24 ratas macho Wistar con peso de 200-250 g y 4 semanas de vida y 24 ratones macho Balb/c con peso de 20-25 g y 4 semanas de vida obtenidos del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México. Se utilizaron 6 individuos por cada tratamiento, los cuales fueron administrados vía intraperitoneal cada 24 horas por 5 días bajo el siguiente esquema de tratamiento.

1. **Control:** 0.1 mL amortiguador de fosfatos pH=7.4 por 5 días y 0.1 mL aceite de maíz el quinto día.
2. **BaP:** 0.1 mL amortiguador de fosfatos pH=7.4 por 5 días y 50mg/Kg BaP una única dosis el quinto día.
3. **5AzadC – BaP:** 0.2 mg/Kg de 5AzadC disuelto en amortiguador de fosfatos pH 7.4 por 5 días y 50mg/Kg de BaP una única dosis el quinto día.
4. **5AzadC:** 0.2 mg/Kg de 5AzadC disuelto en amortiguador de fosfatos pH 7.4 por 5 días.

24 horas después de la última administración los animales fueron sometidos a eutanasia, se diseccionó a cada animal y se obtuvo su hígado, el cual fue procesado para determinación de cantidad de RNA, proteína y actividad enzimática de CYP1A1.

Obtención de fracción microsomal de hígado de rata.

Se obtuvo la fracción microsomal a partir de hígado de cada animal como a continuación se explica. Se realizó un homogenizado del tejido con solución de KCl 150mM, se centrifugó a 9000g por 15 minutos, el sobrenadante resultante se centrifugó a 100,000g por 1 hora, el botón resultante se resuspendió y homogenizó en un amortiguador de fosfatos pH=7.4 adicionado con sacarosa 250mM. Posteriormente, se centrifugó a 100,000g por 1 hora, el botón resultante se resuspendió en amortiguador de fosfatos pH=7.4 adicionado con EDTA 1mM, DTT 0.1mM y glicerol 20% v/v. A la fracción microsomal resultante se le determinó la cantidad de proteína total mediante la técnica de Bradford y se almacenó a -80°C para su posterior uso.

Actividad enzimática microsomal

Se determinó la actividad *O-etoxiresorufina desetilasa* de CYP1A1 a 80 μg de proteína microsomal mediante la técnica de Burke [341]. En una placa oscura de 96 pozos a 37°C se colocaron: 80 μg de proteína microsomal, 1.5 μM etoxiresorufina, 0.5mM NADPH en un volumen final de 200 μL de amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.6, MgCl_2 25mM. Se determinó la producción de resorufina cada 20 segundos por 15 minutos, con una longitud de onda de excitación de 530nm y emisión de 590nm en el lector de placa Synergy HT[®].

Electroforesis e inmunodetección.

Se realizó la separación de proteínas, 5 μg proteína microsomal y 150 μg proteína total de células, mediante una electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida al 7.5%. Se realizó la transferencia a una membrana de PDVF o nitrocelulosa a 100 voltios por 1 hora a 4°C . La membrana se bloqueó con una solución de Tween20 0.1% - TBS - Albúmina[®] al 5% por 3 horas.

Para realizar la inmunodetección se utilizaron anticuerpos contra CYP1A1 y GAPDH. Se expuso al primer anticuerpo (1:1000-4000), por toda la noche. El segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo y de ratón (1:5000-20000), respectivamente, se expusieron por 1 hora. Posteriormente las membranas fueron expuestas a luminol (Amersham[®] ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) por 15 segundos, las imágenes fueron obtenidas con el equipo Kodak Gel Logic 2000 Imaging System y analizadas con el programa libre ImageJ del Instituto Nacional de Salud de EUA [342].

Obtención y cuantificación de RNA.

Se extrajo RNA total de los cultivos celulares, así como de tejido de hígado de rata o ratón con Trizol® siguiendo las especificaciones del fabricante. La síntesis de cDNA se realizó con 1µg de RNA y con M-MVL Retrotranscriptasa (Invitrogene), como el fabricante lo indica. Posteriormente se realizó PCR tiempo real con Taq Man® Master Mix, sondas TaqMan para *CYP1A1* y *GAPDH* de rata y *cyp1a1* y *gapdh* de ratón, siguiendo las instrucciones del fabricante, en un equipo RotorGene Corbett 6000. Se realizaron curvas de eficiencia para cada sonda con sus respectivas muestras y se determinó la expresión relativa mediante el cálculo matemático $2^{-\Delta Ct}$ [343].

Inmunofluorescencia en células.

Un cultivo celular de 5×10^5 células fue sembrado en cajas petri de 100mm, teniendo dentro tres cubreobjetos de 1.5cm de diámetro. 24 horas después de su siembra, el cultivo fue tratado con 2.5µM de 5AzadC por 72 horas, solo o en co-tratamiento con 10 µM de HAP por las últimas 48 horas de cultivo. Se trabajó con controles de 1.25 µL agua y 1.25 µL de DMSO por mL de medio. 10 mL de medio. A las 24 horas del último tratamiento, los cubreobjetos fueron traspasados a una caja de 12 pozos para su posterior manipulación. Fueron fijados con p-formaldehído 4% en PBS por 20' a TA, bloqueados con solución de bloqueo (PBS-Tritón X100 0.3%-1% suero del animal en el que el 2°Ac está hecho), toda la noche a 4°C. Posteriormente fueron expuestos al Ac primario anti-5'-metilcitosina 1:1000, por toda la noche a 4°C. Después expuestos al 2°Ac AlexaFluor® 488 y finalmente montados en portaobjetos con Vectashield con DAPI de Vector. La fluorescencia fue detectada con el microscopio de fluorescencia Plympus BX51-WI y las imágenes resultantes fueron analizadas con el programa libre ImageJ del Instituto Nacional de Salud de EUA [342].

Estadística

Los datos obtenidos de los estudios de niveles de proteínas fueron comparados contra los grupos control mediante ANOVA de una vía y Dunnett como prueba pos-hoc para comparaciones múltiples. Los datos obtenidos de expresión génica, actividad enzimática e inmunofluorescencia fueron analizados mediante ANOVA de una vía y Tukey como prueba pos-hoc para comparaciones múltiples. La prueba Levene fue utilizada para determinar la homogeneidad de varianza, los datos que resultaron ser heterogéneos en varianza fueron sometidos a la prueba t de Welch. La significancia estadística fue establecida para una $P < 0.05$. Los datos reportados en las figuras representan los promedios de experimentos en el caso de líneas celulares o de animales para los estudios *in vivo* \pm error estándar. Los análisis fueron realizados con el paquete informático SAS 9.0.

14. Referencias

- [1] K.-H. Kim, S.A. Jahan, E. Kabir, R.J.C. Brown, A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects, *Environ. Int.* 60 (2013) 71–80. doi:10.1016/j.envint.2013.07.019.
- [2] Y. Zhang, S. Dong, H. Wang, S. Tao, R. Kiyama, Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors, *Environ. Pollut.* 213 (2016) 809–824. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.050.
- [3] J.R. Brown, J.L. Thornton, Percivall Pott (1714-1788) and Chimney Sweepers' Cancer of the Scrotum, *Br. J. Ind. Med.* 14 (1957) 68–70. doi:10.1136/oem.14.1.68.
- [4] D. Penney, V. Benignus, S. Kephelopoulou, D. Kotzias, M. Kleinman, Agnes Verrier, Guidelines for Indoor Air Quality - selected pollutants, 2010. doi:10.1186/2041-1480-2-S2-I1.
- [5] A.H. Conney, Induction of Microsomal Enzymes by Foreign Chemicals and Carcinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture, *Cancer Res.* 42 (1982) 4875–4917.
- [6] M.E. Peterson, P.A. Talcott, *Small Animal Toxicology*, Third Edition, 2012. doi:10.1016/C2010-0-67099-4.
- [7] C.D. Klaassen, *The Basic Science of Poisons*, 2001.
- [8] C. Xu, C.Y.-T. Li, A.-N.T. Kong, Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics, *Arch. Pharm. Res.* 28 (2005) 249–268. doi:10.1007/BF02977789.
- [9] K. Nakata, Y. Tanaka, T. Nakano, T. Adachi, H. Tanaka, T. Kaminuma, T. Ishikawa, Nuclear Receptor-Mediated Transcriptional Regulation in Phase I, II, and III Xenobiotic Metabolizing Systems, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21 (2006) 437–457. doi:10.2133/dmpk.21.437.
- [10] D.W. Nebert, K. Wikvall, W.L. Miller, Human cytochromes P450 in health and disease., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368 (2013) 20120431. doi:10.1098/rstb.2012.0431.
- [11] D.F. V Lewis, E. Watson, B.G. Lake, Evolution of the cytochrome P450 superfamily: Sequence alignments and pharmacogenetics, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 410 (1998) 245–270. doi:10.1016/S1383-5742(97)00040-9.
- [12] H. Sezutsu, G. Le Goff, R. Feyereisen, Origins of P450 diversity, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368 (2013) 20120428–20120428. doi:10.1098/rstb.2012.0428.
- [13] D.R. Nelson, A world of cytochrome P450s, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368 (2013) 20120430–20120430. doi:10.1098/rstb.2012.0430.
- [14] D.W. Nebert, M. Adesnik, M.J. Coon, R.W. Estabrook, F.J. Gonzalez, F.P. Guengerick, I.C. Gunsalus, E.F. Johnson, B. Kemper, W. Levin, I.R. Phillips, R. Sato, M.R. Waterman, The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature, *DNA.* 6 (1987) 1–11. doi:10.1089/dna.1987.6.1.
- [15] D.R. Nelson, L. Koymans, T. Kamataki, J.J. Stegeman, R. Feyereisen, D.J. Waxman, M.R. Waterman, O. Gotoh, M.J. Coon, R.W. Estabrook, I.C. Gunsalus, D.W. Nebert, P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature, *Pharmacogenetics.* 6 (1996) 1–42. doi:10.1097/00008571-199602000-00002.
- [16] D.C. Lamb, M.R. Waterman, Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368 (2013) 20120434–20120434. doi:10.1098/rstb.2012.0434.
- [17] S.L. Kelly, D.E. Kelly, P.T.R.S. B, S.L. Kelly, D.E. Kelly, S.L. Kelly, D.E. Kelly, Microbial cytochromes P450 : biodiversity and biotechnology . Where do cytochromes P450 come from , what do they do and what can they do for us ? , *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368 (2013). doi:doi.org/10.1098/rstb.2012.0476.
- [18] A.W. Munro, H.M. Girvan, K.J. McLean, Variations on a (t)heme—novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily, *Nat. Prod. Rep.* 24 (2007) 585–609. doi:10.1039/B604190F.
- [19] I.S. Kil, S.K. Lee, K.W. Ryu, H.A. Woo, M.C. Hu, S.H. Bae, S.G. Rhee, Feedback Control of Adrenal Steroidogenesis via H2O2-Dependent, Reversible Inactivation of Peroxiredoxin III in Mitochondria, *Mol. Cell.* 46 (2012) 584–594. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.030.

- [20] M. Uhlén, L. Fagerberg, B.M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C.A. Szgyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J.O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J.M. Schwenk, M. Hamsten, K. Von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. Von Heijne, J. Nielsen, F. Pontén, Tissue-based map of the human proteome, *Science* (80-.). 347 (2015) 1260419–1260419. doi:10.1126/science.1260419.
- [21] U.M. Zanger, M. Schwab, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacol. Ther.* 138 (2013) 103–141. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.
- [22] D.E. Ryan, P.E. Thomas, D. Korzeniowski, W. Levin, Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital, and 3-methylanthrene, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 1365–1374.
- [23] D.E. Ryan, P.E. Thomas, W. Levin, Properties of Liver Microsomal Cytochrome P450 From Rats Treated With Isosafrole, Microsomes, *Drug Oxidations Chem. Carcinog.* 255 (1980) 167–170. doi:10.1016/B978-0-12-187701-9.50032-2.
- [24] O. Savass, K.K. Bhattacharyya, M. Christou, D.L. Alexander, C.R. Jefcoaten, Mouse Cytochrome P-450EF, Representative of a New, (1994) 14905–14911.
- [25] T.R. Sutter, Y.M. Tang, C.L. Hayes, Y.Y.P. Wo, E.W. Jabs, X. Li, H. Yin, C.W. Cody, W.F. Greenlee, Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 13092–13099.
- [26] M. Nukaya, C.A. Bradfield, Conserved genomic structure of the Cyp1a1 and Cyp1a2 loci and their dioxin responsive elements cluster, *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 654–659. doi:10.1016/j.bcp.2008.10.026.
- [27] D.W. NEBERT, D.R. NELSON, M. ADESNIK, M.J. COON, R.W. ESTABROOK, F.J. GONZALEZ, F.P. GUENGERICH, I.C. GUNSALUS, E.F. JOHNSON, B. KEMPER, W. LEVIN, I.R. PHILLIPS, R. SATO, M.R. WATERMAN, The P450 Superfamily: Updated Listing of All Genes and Recommended Nomenclature for the Chromosomal Loci, *Dna.* 8 (1989) 1–13. doi:10.1089/dna.1.1989.8.1.
- [28] T. Shimada, A. Sugie, M. Shindo, T. Nakajima, E. Azuma, M. Hashimoto, K. Inoue, Tissue-specific induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in engineered C57BL/6J mice of arylhydrocarbon receptor gene, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187 (2003) 1–10. doi:10.1016/S0041-008X(02)00035-2.
- [29] T. Shimada, C.L. Hayes, H. Yamazaki, S. Amin, S.S. Hecht, F.P. Guengerich, T.R. Sutler, Activation of Chemically Diverse Procarcinogens P-450 IBI1 by Human Cytochrome, *City.* (1996) 2979–2984. doi:10.1016/0041-008X(89)90251-2.
- [30] Y. Wang, R. An, G.K. Umanah, H. Park, K. Nambiar, S.M. Eacker, B. Kim, L. Bao, M.M. Harraz, C. Chang, R. Chen, J.E. Wang, T.-I. Kam, J.S. Jeong, Z. Xie, S. Neifert, J. Qian, S.A. Andrabi, S. Blackshaw, H. Zhu, H. Song, G. -I. Ming, V.L. Dawson, T.M. Dawson, A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1, *Science* (80-.). 354 (2016) aad6872-aad6872. doi:10.1126/science.aad6872.
- [31] D. Fu, J.A. Calvo, L.D. Samson, Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents, *Nat. Rev. Cancer.* 12 (2012). doi:10.1038/nrc3185.
- [32] A.J. Lee, M.X. Cai, P.E. Thomas, A.H. Conney, B.T. Zhu, Characterization of the oxidative metabolites of 17 β -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome P450 isoforms, *Endocrinology.* 144 (2003) 3382–3398. doi:10.1210/en.2003-0192.
- [33] X. Ma, J.R. Idle, K.W. Krausz, F.J. Gonzalez, Metabolism of melatonin by human cytochromes P450, *Drug Metab. Dispos.* 33 (2005) 489–494. doi:10.1124/dmd.104.002410.
- [34] C. Arnold, A. Konkel, R. Fischer, W.-H. Schunck, Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids., *Pharmacol. Rep.* 62 (2010) 536–547.
- [35] D. Schwarz, P. Kisselev, S.S. Ericksen, G.D. Szklarz, A. Chernogolov, H. Honeck, W.H. Schunck, I. Roots, Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: Highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 1445–1457. doi:10.1016/j.bcp.2003.12.023.
- [36] R. Santes-Palacios, D. Ornelas-Ayala, N. Cabañas, A. Marroquín-Pérez, A. Hernández-Magaña, S. Del Rosario Olguín-Reyes, R. Camacho-Carranza, J.J. Espinosa-Aguirre, Regulation of Human Cytochrome P4501A1 (hCYP1A1): A Plausible Target for Chemoprevention?, *Biomed Res. Int.* 2016 (2016). doi:10.1155/2016/5341081.

- [37] V. Werlinder, M. Backlund, a Zhukov, M. Ingelman-Sundberg, Transcriptional and post-translational regulation of CYP1A1 by primaquine., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297 (2001) 206–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259546>.
- [38] H.M. Korashy, A.O.S. El-Kadi, Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals, *Toxicol. Sci.* 88 (2005) 39–51. doi:10.1093/toxsci/kfi282.
- [39] H.M. Korashy, A.O.S. El-Kadi, Transcriptional and posttranslational mechanisms modulating the expression of the cytochrome P450 1A1 gene by lead in HepG2 cells: A role of heme oxygenase, *Toxicology.* 291 (2012) 113–121. doi:10.1016/j.tox.2011.11.006.
- [40] J.W. Park, J.R. Reed, W.L. Backes, The localization of cytochrome P450s CYP1A1 and CYP1A2 into different lipid microdomains is governed by their N-terminal and internal protein regions, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 29449–29460. doi:10.1074/jbc.M115.687103.
- [41] A.A. Walsh, G.D. Szklarz, E.E. Scott, Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 12932–12943. doi:10.1074/jbc.M113.452953.
- [42] P. Urban, G. Truan, D. Pompon, Access channels to the buried active site control substrate specificity in CYP1A P450 enzymes, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850 (2015) 696–707. doi:10.1016/j.bbagen.2014.12.015.
- [43] A. Poland, E. Glover, Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 4936–4946.
- [44] D.P. Jackson, A.D. Joshi, C.J. Elferink, Ah receptor pathway intricacies; signaling through diverse protein partners and DNA-motifs, *Toxicol. Res.* 4 (2015) 1143–1158. doi:10.1039/C4TX00236A.
- [45] L. Wu, J.P. Whitlock, Mechanism of dioxin action: Ah receptor-mediated increase in promoter accessibility in vivo., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 4811–4815. doi:10.1073/pnas.89.11.4811.
- [46] A.J. Watson, O. Hankinson, Dioxin- and Ah receptor-dependent protein binding to xenobiotic responsive elements and G-rich DNA studied by in vivo footprinting, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 6874–6878.
- [47] J.P. Whitlock, Induction of Cytochrome P4501a1, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1999) 103–125. doi:10.1146/annurev.pharmtox.39.1.103.
- [48] W.B. Pratt, The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217 (1998) 420–434. doi:10.3181/00379727-217-44252.
- [49] B.K. Meyer, M.G. Pray-Grant, J.P. Vanden Heuvel, G.H. Perdew, Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity., *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 978–988. doi:10.1128/MCB.18.2.978.
- [50] I.A. Murray, A.D. Patterson, G.H. Perdew, Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: Friend and foe, *Nat. Rev. Cancer.* 14 (2014) 801–814. doi:10.1038/nrc3846.
- [51] T. Ikuta, H. Eguchi, T. Tachibana, Y. Yoneda, K. Kawajiri, Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 2895–904. doi:10.1074/JBC.273.5.2895.
- [52] N. Tsuji, K. Fukuda, Y. Nagata, H. Okada, A. Haga, S. Hatakeyama, S. Yoshida, T. Okamoto, M. Hosaka, K. Sekine, K. Ohtaka, S. Yamamoto, M. Otaka, E. Grave, H. Itoh, The activation mechanism of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by molecular chaperone HSP90, *FEBS Open Bio.* 4 (2014) 796–803. doi:10.1016/j.fob.2014.09.003.
- [53] S. Li, X. Pei, W. Zhang, H.Q. Xie, B. Zhao, Functional analysis of the dioxin response elements (DREs) of the murine CYP1A1 gene promoter: Beyond the core DRE sequence, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 6475–6487. doi:10.3390/ijms15046475.
- [54] C. Esser, A. Rannug, The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology, *Pharmacol. Rev.* 67 (2015) 259–279. doi:10.1124/pr.114.009001.
- [55] N. Guigal, E. Seree, V. Bourgarel-Rey, Y. Barra, Induction of CYP1A1 by Serum Independent of AhR Pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267 (2000) 572–576. doi:10.1006/bbrc.1999.1959.
- [56] P.H. Villard, F. Barlesif, M. Armand, T.M.A. Dao, J.M. Pascussi, F. Fouchier, S. Champion, C. Dufour, C. Giniès, A. Khalil, M.J. Amiot, Y. Barra, E. Seree, CYP1A1 induction in the colon by serum: Involvement of the PPAR α pathway and evidence for a new specific human PPRE α site, *PLoS One.* 6 (2011) 2–9. doi:10.1371/journal.pone.0014629.

- [57] B. Mackowiak, H. Wang, Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1859 (2016) 1130–1140. doi:10.1016/j.bbagr.2016.02.006.
- [58] P. Schulthess, A. Löffler, S. Vetter, L. Kreft, M. Schwarz, A. Braeuning, N. Blüthgen, Signal integration by the CYP1A1 promoter - A quantitative study, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 5318–5330. doi:10.1093/nar/gkv423.
- [59] G. Felsenfeld, A Brief History of Epigenetics, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2014). doi:10.1101/cshperspec.a018200.
- [60] C.D. Allis, *Epigenetics*, 2007.
- [61] G. Felsenfeld, M. Groudine, Controlling the double helix, *Nature.* 421 (2003) 448–453. doi:10.1038/nature01411.
- [62] H. Swift, The organization of genetic material in eukaryotes: progress and prospects., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 38 (1974) 963–979.
- [63] S. Henikoff, M.M. Smith, Histone variants and epigenetics, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2015). doi:10.1101/cshperspect.a019364.
- [64] C. Jiang, B.F. Pugh, Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics, *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 161–172. doi:10.1038/nrg2522.
- [65] J.S. Hagood, REVIEWS Beyond the Genome : Epigenetic Mechanisms in Lung Remodeling, (2014) 177–185. doi:10.1152/physiol.00048.2013.
- [66] M.G. Goll, F. Kirpekar, K.A. Maggert, J.A. Yoder, C.L. Hsieh, X. Zhang, K.G. Golic, S.E. Jacobsen, T.H. Bestor, Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2, *Science* (80-.). (2006). doi:10.1126/science.1120976.
- [67] M. Schaefer, T. Pollex, K. Hanna, F. Tuorto, M. Meusburger, M. Helm, F. Lyko, RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage, *Genes Dev.* (2010). doi:10.1101/gad.586710.
- [68] F. Tuorto, F. Herbst, N. Alerasool, S. Bender, O. Popp, G. Federico, S. Reitter, R. Liebers, G. Stoecklin, H.-J. Groner, G. Dittmar, H. Glimm, F. Lyko, The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis, *EMBO J.* (2015). doi:10.15252/embj.201591382.
- [69] X. Cheng, R.M. Blumenthal, Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective, *Structure.* 16 (2008) 341–350. doi:10.1016/j.str.2008.01.004.
- [70] O. Mortusewicz, L. Schermelleh, J. Walter, M.C. Cardoso, H. Leonhardt, Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 8905–8909. doi:10.1073/pnas.0501034102.
- [71] T. Chen, E. Li, Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 301 (2006) 179–201. doi:10.1007/3-540-31390-7_6.
- [72] F. Syeda, R.L. Fagan, M. Wean, G. V. Avvakumov, J.R. Walker, S. Xue, S. Dhe-Paganon, C. Brenner, The replication focus targeting sequence (RFTS) domain is a DNA-competitive inhibitor of Dnmt1, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 15344–15351. doi:10.1074/jbc.M110.209882.
- [73] K. Takeshita, I. Suetake, E. Yamashita, M. Suga, H. Narita, A. Nakagawa, S. Tajima, Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 9055–9059. doi:10.1073/pnas.1019629108.
- [74] Z.M. Svedruzić, Mammalian cytosine DNA methyltransferase Dnmt1: enzymatic mechanism, novel mechanism-based inhibitors, and RNA-directed DNA methylation., *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 92–106. doi:10.2174/092986708783330700.
- [75] W. Qin, P. Wolf, N. Liu, S. Link, M. Smets, F. La Mastra, I. Forné, G. Pichler, D. Hörl, K. Fellinger, F. Spada, I.M. Bonapace, A. Imhof, H. Harz, H. Leonhardt, DNA methylation requires a DNMT1 ubiquitin interacting motif (UIM) and histone ubiquitination, *Cell Res.* 25 (2015) 911–929. doi:10.1038/cr.2015.72.
- [76] G. V. Avvakumov, J.R. Walker, S. Xue, Y. Li, S. Duan, C. Bronner, C.H. Arrowsmith, S. Dhe-Paganon, Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1, *Nature.* 455 (2008) 822–825. doi:10.1038/nature07273.
- [77] M. Bostick, J.K. Kim, P.-O. Esteve, A. Clark, S. Pradhan, S.E. Jacobsen, UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells, *Science* (80-.). 317 (2007) 1760–1764. doi:10.1126/science.1147939.

- [78] J. Sharif, M. Muto, S. Takebayashi, I. Suetake, A. Iwamatsu, T.A. Endo, J. Shinga, Y. Mizutani-Koseki, T. Toyoda, K. Okamura, S. Tajima, K. Mitsuya, M. Okano, H. Koseki, The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA, *Nature*. 450 (2007) 908–912. doi:10.1038/nature06397.
- [79] K. Arita, M. Ariyoshi, H. Tochio, Y. Nakamura, M. Shirakawa, Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism, *Nature*. 455 (2008) 818–821. doi:10.1038/nature07249.
- [80] C. Qian, S. Li, J. Jakoncic, L. Zeng, M.J. Walsh, M.M. Zhou, Structure and hemimethylated CpG binding of the SRA domain from human UHRF1, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 34490–34494. doi:10.1074/jbc.C800169200.
- [81] A. Rottach, C. Frauer, G. Pichler, I.M. Bonapace, F. Spada, H. Leonhardt, The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification, *Nucleic Acids Res.* 38 (2009) 1796–1804. doi:10.1093/nar/gkp1152.
- [82] J. Cheng, Y. Yang, J. Fang, J. Xiao, T. Zhu, F. Chen, P. Wang, Z. Li, H. Yang, Y. Xu, Structural insight into coordinated recognition of trimethylated histone H3 lysine 9 (H3K9me3) by the plant homeodomain (PHD) and tandem tudor domain (TTD) of UHRF1 (ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) protein, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 1329–1339. doi:10.1074/jbc.M112.415398.
- [83] E. Citterio, R. Papait, F. Nicassio, M. Vecchi, P. Gomiero, R. Mantovani, P.P. Di Fiore, I.M. Bonapace, Np95 Is a Histone-Binding Protein Endowed with Ubiquitin Ligase Activity, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 2526–2535. doi:10.1128/MCB.24.6.2526-2535.2004.
- [84] P. Karagianni, L. Amazit, J. Qin, J. Wong, ICBP90, a Novel Methyl K9 H3 Binding Protein Linking Protein Ubiquitination with Heterochromatin Formation, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 705–717. doi:10.1128/MCB.01598-07.
- [85] S. Xie, J. Jakoncic, C. Qian, UHRF1 double Tudor domain and the adjacent PHD finger Act together to recognize K9me3-containing histone H3 tail, *J. Mol. Biol.* 415 (2012) 318–328. doi:10.1016/j.jmb.2011.11.012.
- [86] J. Flynn, J.F. Glickman, N.O. Reich, Murine DNA cytosine-C5 methyltransferase: Pre-steady- and steady-state kinetic analysis with regulatory DNA sequences, *Biochemistry*. 35 (1996) 7308–7315. doi:10.1021/bi9600512.
- [87] C.X. Song, K.E. Szulwach, Y. Fu, Q. Dai, C. Yi, X. Li, Y. Li, C.H. Chen, W. Zhang, X. Jian, J. Wang, L. Zhang, T.J. Looney, B. Zhang, L.A. Godley, L.M. Hicks, B.T. Lahn, P. Jin, C. He, Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine, *Nat. Biotechnol.* (2011). doi:10.1038/nbt.1732.
- [88] A. Reale, G. De Matteis, G. Galleazzi, M. Zampieri, P. Caiafa, Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers, *Oncogene*. 24 (2005) 13–19. doi:10.1038/sj.onc.1208005.
- [89] M. Rouleau, Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 815–825. doi:10.1242/jcs.01080.
- [90]? ?eljko M. Svedru??i??, C. Wang, J. V. Kosmoski, M.J. Smerdon, Accommodation and repair of a UV photoproduct in DNA at different rotational settings on the nucleosome surface, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 40051–40057. doi:10.1074/jbc.M509478200.
- [91] J. Song, M. Teplova, S. Ishibe-Murakami, D.J. Patel, Structure-Based Mechanistic Insights into DNMT1-Mediated Maintenance DNA Methylation, *Science* (80-.). 335 (2012) 709–712. doi:10.1126/science.1214453.
- [92] J.C. Wu, D. V. Santi, Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 4778–4786.
- [93] L. Chen, A.M. Macmilan, G.L. Verdine, Mutational Separation of DNA Binding from Catalysis in a DNA Cytosine Methyltransferase, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 5318–5319. doi:10.1021/ja00065a063.
- [94] S. Klimasauskas, S. Kumar, R.J. Roberts, X. Cheng, HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix, *Cell*. 76 (1994) 357–369. doi:10.1016/0092-8674(94)90342-5.
- [95] Q. Du, Z. Wang, V.L. Schramm, Human DNMT1 transition state structure, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 2916–2921. doi:10.1073/pnas.1522491113.
- [96] L.S. Chuang, H.I. Ian, T.W. Koh, H.H. Ng, G. Xu, B.F. Li, Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1., *Science*. 277 (1997) 1996–2000. doi:10.1126/science.277.5334.1996.
- [97] F. Fuks, W.A. Burgers, A. Brehm, L. Hughes-Davies, T. Kouzarides, DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity., *Nat. Genet.* 24 (2000) 88–91. doi:10.1038/71750.

- [98] M.R. Rountree, K.E. Bachman, S.B. Baylin, DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci., *Nat. Genet.* 25 (2000) 269–277. doi:10.1038/77023.
- [99] H. Kimura, K. Shiota, Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4806–4812. doi:10.1074/jbc.M209923200.
- [100] Y. Schlesinger, R. Straussman, I. Keshet, S. Farkash, M. Hecht, J. Zimmerman, E. Eden, Z. Yakhini, E. Ben-Shushan, B.E. Reubinoff, Y. Bergman, I. Simon, H. Cedar, Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer, *Nat. Genet.* 39 (2007) 232–236. doi:10.1038/ng1950.
- [101] S. Pradhan, G. Do Kim, The retinoblastoma gene product interacts with maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and modulates its activity, *EMBO J.* 21 (2002) 779–788. doi:10.1093/emboj/21.4.779.
- [102] P.-O. Estève, H.G. Chin, S. Pradhan, Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 1000–1005. doi:10.1073/pnas.0407729102.
- [103] L. Jeffery, S. Nakielny, Components of the DNA methylation system of chromatin control are RNA-binding proteins, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 49479–49487. doi:10.1074/jbc.M409070200.
- [104] S.M. Carty, Hyperphosphorylated C-terminal Repeat Domain-associating Proteins in the Nuclear Proteome Link Transcription to DNA/Chromatin Modification and RNA Processing, *Mol. Cell. Proteomics.* 1 (2002) 598–610. doi:10.1074/mcp.M200029-MCP200.
- [105] R.Z. Jurkowska, T.P. Jurkowski, A. Jeltsch, Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases, *ChemBioChem.* (2011). doi:10.1002/cbic.201000195.
- [106] H. Gowher, A. Jeltsch, Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: The enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpA sites, *J. Mol. Biol.* (2001). doi:10.1006/jmbi.2001.4710.
- [107] H. Denis, M.N. Ndlovu, F. Fuks, Regulation of mammalian DNA methyltransferases: A route to new mechanisms, *EMBO Rep.* (2011). doi:10.1038/embor.2011.110.
- [108] E.S. Kang, C.W. Park, J.H. Chung, Dnmt3b, de Novo DNA methyltransferase, interacts with SUMO-1 and Ubc9 through its N-terminal region and is subject to modification by SUMO-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001). doi:10.1006/bbrc.2001.6057.
- [109] Y. Ling, U.T. Sankpal, A.K. Robertson, J.G. McNally, T. Karpova, K.D. Robertson, Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by SUMO-1 modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription, *Nucleic Acids Res.* (2004). doi:10.1093/nar/gkh195.
- [110] B. Lee, M.T. Muller, SUMOylation enhances DNA methyltransferase 1 activity, *Biochem. J.* (2009). doi:10.1042/BJ20090142.
- [111] J. Wang, S. Hevi, J.K. Kurash, H. Lei, F. Gay, J. Bajko, H. Su, W. Sun, H. Chang, G. Xu, F. Gaudet, E. Li, T. Chen, The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation, *Nat. Genet.* (2009). doi:10.1038/ng.268.
- [112] P.O. Estève, Y. Chang, M. Samaranayake, A.K. Upadhyay, J.R. Horton, G.R. Feehery, X. Cheng, S. Pradhan, A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability, *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2011). doi:10.1038/nsmb.1939.
- [113] J.F. Glickman, J.G. Pavlovich, N.O. Reich, Peptide mapping of the murine DNA methyltransferase reveals a major phosphorylation site and the start of translation, *J. Biol. Chem.* (1997). doi:10.1074/jbc.272.28.17851.
- [114] R. Goyal, P. Rathert, H. Laser, H. Gowher, A. Jeltsch, Phosphorylation of serine-515 activates the mammalian maintenance methyltransferase Dnmt1, *Epigenetics.* (2007). doi:10.4161/epi.2.3.4768.
- [115] I. Kameshita, M. Sekiguchi, D. Hamasaki, Y. Sugiyama, N. Hatano, I. Suetake, S. Tajima, N. Sueyoshi, Cyclin-dependent kinase-like 5 binds and phosphorylates DNA methyltransferase 1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2008). doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.113.
- [116] Y. Sugiyama, N. Hatano, N. Sueyoshi, I. Suetake, S. Tajima, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, I. Kameshita, The DNA-binding activity of mouse DNA methyltransferase 1 is regulated by phosphorylation with casein kinase 1 δ/ϵ , *Biochem. J.* (2010). doi:10.1042/BJ20091856.

- [117] E. Hervouet, P. Peixoto, R. Delage-Mourroux, M. Boyer-Guittaut, P.F. Cartron, Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma, *Clin. Epigenetics*. (2018). doi:10.1186/s13148-018-0450-y.
- [118] R. Deplus, L. Blanchon, A. Rajavelu, A. Boukaba, M. Defrance, J. Luciani, F. Rothé, S. Dedeurwaerder, H. Denis, A.B. Brinkman, F. Simmer, F. Müller, B. Bertin, M. Berdasco, P. Putmans, E. Calonne, D.W. Litchfield, Y. De Launoit, T.P. Jurkowski, H.G. Stunnenberg, C. Bock, C. Sotiriou, M.F. Fraga, M. Esteller, A. Jeltsch, F. Fuks, Regulation of DNA methylation patterns by CK2-mediated phosphorylation of Dnmt3a, *Cell Rep*. (2014). doi:10.1016/j.celrep.2014.06.048.
- [119] C. Choudhary, C. Kumar, F. Gnad, M.L. Nielsen, M. Rehman, T.C. Walther, J. V. Olsen, M. Mann, Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions, *Science* (80-.). (2009). doi:10.1126/science.1175371.
- [120] Z. Du, J. Song, Y. Wang, Y. Zhao, K. Guda, S. Yang, H.Y. Kao, Y. Xu, J. Willis, S.D. Markowitz, D. Sedwick, R.M. Ewing, Z. Wang, DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination, *Sci. Signal*. (2010). doi:10.1126/scisignal.2001462.
- [121] S.C. Kim, R. Sprung, Y. Chen, Y. Xu, H. Ball, J. Pei, T. Cheng, Y. Kho, H. Xiao, L. Xiao, N. V. Grishin, M. White, X.J. Yang, Y. Zhao, Substrate and Functional Diversity of Lysine Acetylation Revealed by a Proteomics Survey, *Mol. Cell*. (2006). doi:10.1016/j.molcel.2006.06.026.
- [122] A. Di Ruscio, A.K. Ebralidze, T. Benoukraf, G. Amabile, L.A. Goff, J. Terragni, M.E. Figueroa, L.L. De Figueiredo Pontes, M. Alberich-Jorda, P. Zhang, M. Wu, F. D'Alò, A. Melnick, G. Leone, K.K. Ebralidze, S. Pradhan, J.L. Rinn, D.G. Tenen, DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation, *Nature*. (2013). doi:10.1038/nature12598.
- [123] A.T. Agoston, P. Argani, S. Yegnasubramanian, A.M. De Marzo, M.A. Ansari-Lari, J.L. Hicks, N.E. Davidson, W.G. Nelson, Increased protein stability causes DNA methyltransferase 1 dysregulation in breast cancer., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 18302–18310. doi:10.1074/jbc.M501675200.
- [124] A.T. Agoston, P. Argani, A.M. De Marzo, J.L. Hicks, W.G. Nelson, Retinoblastoma pathway dysregulation causes DNA methyltransferase 1 overexpression in cancer via MAD2-mediated inhibition of the anaphase-promoting complex, *Am. J. Pathol.* (2007). doi:10.2353/ajpath.2007.060779.
- [125] S. Feng, S.J. Cokus, X. Zhang, P.-Y. Chen, M. Bostick, M.G. Goll, J. Hetzel, J. Jain, S.H. Strauss, M.E. Halpern, C. Ukomadu, K.C. Sadler, S. Pradhan, M. Pellegrini, S.E. Jacobsen, Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2010). doi:10.1073/pnas.1002720107.
- [126] A. Zemach, I.E. McDaniel, P. Silva, D. Zilberman, Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation, *Science* (80-.). (2010). doi:10.1126/science.1186366.
- [127] S.H. Stricker, A. Köferle, S. Beck, From profiles to function in epigenomics, *Nat. Rev. Genet.* (2016). doi:10.1038/nrg.2016.138.
- [128] S.B. Baylin, J.G. Herman, J.R. Graff, P.M. Vertino, J.-P. Issa, Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia, *Adv. Cancer Res.* 72 (1997) 141–182. doi:10.1016/j.asj.2016.04.001.
- [129] Y. -I Kim, A. Giuliano, K.D. Hatch, A. Schneider, M.A. Nour, G.E. Dallal, J. Selhub, J.B. Mason, Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma, *Cancer*. (1994). doi:10.1002/1097-0142(19940801)74:3<893::AID-CNCR2820740316>3.0.CO;2-B.
- [130] B.P. Madakashira, K.C. Sadler, DNA methylation, nuclear organization, and cancer, *Front. Genet.* (2017). doi:10.3389/fgene.2017.00076.
- [131] L.D. Moore, T. Le, G. Fan, DNA methylation and its basic function, *Neuropsychopharmacology*. (2013). doi:10.1038/npp.2012.112.
- [132] J. Plimi, F. Sorm, Synthesis of 2'-deoxy-D-ribofuranosyl-5-azacytidine, *Chem. Commun.* 29 (1964) 2576–2577.
- [133] J. Quddus, K.J. Johnson, J. Gavalchin, E.P. Amento, C.E. Chrisp, R.L. Yung, B.C. Richardson, Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice, *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 38–53. doi:10.1172/JCI116576.
- [134] F. Sorm, J. Veseley, Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hematopoietic tissues in AKR mice, *Neoplasma*. 15 (1968) 329–343.

- [135] R.L. Momparler, Pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine), *Semin. Hematol.* 42 (2005). doi:10.1053/j.seminhematol.2005.05.002.
- [136] R.L. Momparler, S. Côté, N. Eliopoulos, Pharmacological approach for optimization of the dose schedule of 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) for the therapy of leukemia., *Leukemia.* 11 Suppl 1 (1997) S1-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130684>.
- [137] M. Karahoca, R.L. Momparler, Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'- deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy, *Clin. Epigenetics.* (2013). doi:10.1186/1868-7083-5-3.
- [138] H.M. Kantarjian, J.P.J. Issa, Decitabine dosing schedules, *Semin. Hematol.* 42 (2005). doi:10.1053/j.seminhematol.2005.05.006.
- [139] J. Bouchard, R.L. Momparler, Incorporation of 5-Aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase., *Mol. Pharmacol.* 24 (1983) 109–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6191192>.
- [140] R. Juttermann, E. Li, R. Jaenisch, Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 11797–11801. doi:10.1073/pnas.91.25.11797.
- [141] K. Ghoshal, J. Datta, S. Majumder, S. Bai, H. Kutay, T. Motiwala, S.T. Jacob, 5-Aza-Deoxycytidine Induces Selective Degradation of DNA Methyltransferase 1 by a Proteasomal Pathway That Requires the KEN Box, Bromo-Adjacent Homology Domain, and Nuclear Localization Signal, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 4727–4741. doi:10.1128/MCB.25.11.4727-4741.2005.
- [142] C. Stresemann, F. Lyko, Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine, *Int. J. Cancer.* 123 (2008) 8–13. doi:10.1002/ijc.23607.
- [143] B.I. Carr, S. Rahbar, Y. Asmeron, A. Riggs, C.D. Winberg, Carcinogenicity and haemoglobin synthesis induction by cytidine analogues, *Br J Cancer.* 57 (1988) 395–402. doi:10.1038/bjc.1988.89.
- [144] K. Ghoshal, S. Bai, DNA methyltransferase as targets for cancer therapy, *Drugs of Today.* 43 (2007) 395. doi:10.1358/dot.2007.43.6.1062666.
- [145] E. Verdin, M. Ott, 50 Years of Protein Acetylation: From Gene Regulation To Epigenetics, *Metabolism and Beyond*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16 (2014) 258–264. doi:10.1038/nrm3931.
- [146] T.R. Hebbes, A.W. Thorne, C. Crane-Robinson, A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin, *EMBO J.* 7 (1988) 1395–1402. doi:10.1007/BF00777468.
- [147] B.D. Strahl, C.D. Allis, The language of covalent histone modifications., *Nature.* 403 (2000) 41–5. doi:10.1038/47412.
- [148] Y. Zhang, D. Reinberg, Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails, *Genes Dev.* 15 (2001) 2343–2360. doi:10.1101/gad.927301.
- [149] Y. Chen, R. Sprung, Y. Tang, H. Ball, B. Sangras, S.C. Kim, J.R. Falck, J. Peng, W. Gu, Y. Zhao, Lysine Propionylation and Butyrylation Are Novel Post-translational Modifications in Histones, *Mol. Cell. Proteomics.* 6 (2007) 812–819. doi:10.1074/mcp.M700021-MCP200.
- [150] S.J. Nowak, V.G. Corces, Phosphorylation of histone H3: A balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation, *Trends Genet.* 20 (2004) 214–220. doi:10.1016/j.tig.2004.02.007.
- [151] Z.-W. Sun, C.D. Allis, Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast, *Nature.* 418 (2002) 104–108. doi:10.1038/nature00883.
- [152] D. Nathan, K. Ingvarsdottir, D.E. Sterner, G.R. Bylebyl, M. Dokmanovic, J.A. Dorsey, K.A. Whelan, M. Krsmanovic, W.S. Lane, P.B. Meluh, E.S. Johnson, S.L. Berger, Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications, *Genes Dev.* 20 (2006) 966–976. doi:10.1101/gad.1404206.
- [153] G. Golderer, P. Gröbner, ADP-ribosylation of core histones and their acetylated subspecies., *Biochem. J.* 277 (Pt 3 (1991) 607–10. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1151284&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [154] H.M. Liebich, E. Gesele, C. Wirth, J. W???, K. Jobst, A. Lakatos, Non???enzymatic glycation of histones, *Biol. Mass Spectrom.* 22 (1993) 121–123. doi:10.1002/bms.1200220204.

- [155] J.S. Stanley, J.B. Griffin, J. Zemleni, Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation., *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 5424–5429. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02481.x.
- [156] G.T. Wondrak, D. Cervantes-Laurean, E.L. Jacobson, M.K. Jacobson, Histone carbonylation in vivo and in vitro., *Biochem. J.* 351 Pt 3 (2000) 769–777. doi:10.1042/0264-6021:3510769.
- [157] P. Bjerling, R.A. Silverstein, G. Thon, A. Caudy, S. Grewal, K. Ekwall, Functional Divergence between Histone Deacetylases in Fission Yeast by Distinct Cellular Localization and In Vivo Specificity, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 2170–2181. doi:10.1128/MCB.22.7.2170-2181.2002.
- [158] X.J. Yang, S. Grégoire, Metabolism, cytoskeleton and cellular signalling in the grip of protein Nε- and O-acetylation, *EMBO Rep.* (2007). doi:10.1038/sj.embor.7400977.
- [159] P. a Wade, Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin., *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 693–698. doi:10.1093/hmg/10.7.693.
- [160] J. Taunton, C.A. Hassig, S.L. Schreiber, A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p., *Science (80-.)*. 272 (1996) 408–411. doi:10.1126/science.272.5260.408.
- [161] Y. Furukawa, T. Kawakami, K. Sudo, J. Inazawa, A. Matsumine, T. Akiyama, Y. Nakamura, Isolation and mapping of a human gene (RPD3L1) that is homologous to RPD3, a transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*., *Cytogenet. Cell Genet.* 73 (1996) 130–133. doi:10.1159/000134323.
- [162] Y. Zhang, H.H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird, D. Reinberg, Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation, *Genes Dev.* 13 (1999) 1924–1935. doi:10.1101/gad.13.15.1924.
- [163] W. Fischle, F. Dequiedt, M. Fillion, M.J. Hendzel, W. Voelter, E. Verdin, Human HDAC7 Histone Deacetylase Activity is Associated with HDAC3 in Vivo, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 35826–35835. doi:10.1074/jbc.M104935200.
- [164] W.M. Yang, S.C. Tsai, Y. Der Wen, G. Fejé, E. Seto, Functional domains of histone deacetylase-3, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 9447–9454. doi:10.1074/jbc.M105993200.
- [165] A.J.M. de RUIJTER, A.H. van GENNIP, H.N. CARON, S. KEMP, A.B.P. van KUILENBURG, Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family, *Biochem. J.* 370 (2003) 737–749. doi:10.1042/bj20021321.
- [166] M. Haberland, R.L. Montgomery, E.N. Olson, physiology : implications for disease and therapy, 10 (2011) 32–42. doi:10.1038/nrg2485.The.
- [167] X. Zhou, V.M. Richon, R. a Rifkind, P. a Marks, Identification of a transcriptional repressor related to the noncatalytic domain of histone deacetylases 4 and 5., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 1056–1061. doi:10.1073/pnas.97.3.1056.
- [168] a H. Wang, N.R. Bertos, M. Vezmar, N. Pelletier, M. Crosato, H.H. Heng, J. Th'ng, J. Han, X.J. Yang, HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor., *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 7816–7827. doi:10.1128/MCB.19.11.7816.
- [169] S.G. Gray, T.J. Ekström, The Human Histone Deacetylase Family, *Exp. Cell Res.* 262 (2001) 75–83. doi:10.1006/excr.2000.5080.
- [170] C. Hubbert, A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.-F. Wang, T.-P. Yao, HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase, *Nature.* 417 (2002) 455–458. doi:10.1038/417455a.
- [171] C. Hildmann, D. Riester, A. Schwienhorst, Histone deacetylases - An important class of cellular regulators with a variety of functions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75 (2007) 487–497. doi:10.1007/s00253-007-0911-2.
- [172] D.D. Fischer, R. Cai, U. Bhatia, F. a M. Asselbergs, C. Song, R. Terry, N. Trogani, R. Widmer, P. Atadja, D. Cohen, Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6656–66. doi:10.1074/jbc.M108055200.
- [173] H.-Y. Kao, C.-H. Lee, A. Komarov, C.C. Han, R.M. Evans, Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 187–193. doi:10.1074/jbc.M108931200.
- [174] E.C. Forsberg, E.H. Bresnick, Histone acetylation beyond promoters: Long-range acetylation patterns in the chromatin world, *BioEssays.* 23 (2001) 820–830. doi:10.1002/bies.1117.

- [175] E. Ford, R. Voit, G. Liszt, C. Magin, I. Grummt, L. Guarente, Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription, *Genes Dev.* 20 (2006) 1075–1080. doi:10.1101/gad.1399706.
- [176] A. Vaquero, M.B. Scher, H.L. Dong, A. Sutton, H.L. Cheng, F.W. Alt, L. Serrano, R. Sternglanz, D. Reinberg, SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis, *Genes Dev.* 20 (2006) 1256–1261. doi:10.1101/gad.1412706.
- [177] E. Fiorino, M. Giudici, A. Ferrari, N. Mitro, D. Caruso, E. De Fabiani, M. Crestani, The sirtuin class of histone deacetylases: Regulation and roles in lipid metabolism, *IUBMB Life.* 66 (2014) 89–99. doi:10.1002/iub.1246.
- [178] A.C. West, R.W. Johnstone, New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment, *J Clin Invest.* 124 (2014) 30–39. doi:10.1172/JCI69738.30.
- [179] K.J. Falkenberg, R.W. Johnstone, Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders., *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 673–91. doi:10.1038/nrd4360.
- [180] F. Flick, B. L??scher, Regulation of sirtuin function by posttranslational modifications, *Front. Pharmacol.* 3 FEB (2012) 1–13. doi:10.3389/fphar.2012.00029.
- [181] J.E. Bolden, M.J. Peart, R.W. Johnstone, Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors., *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 769–84. doi:10.1038/nrd2133.
- [182] J. Du, Y. Zhou, X. Su, J.J. Yu, S. Khan, H. Jiang, J. Kim, J. Woo, J.H. Kim, B.H. Choi, B. He, W. Chen, R.A. Cerione, J. Auwerx, Q. Hao, H. Lin, Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase, *Science* (80-.). 334 (2012) 806–809. doi:10.1126/science.1207861.Sirt5.
- [183] G. Liszt, E. Ford, M. Kurtev, L. Guarente, Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP ribosyltransferase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 21313–21320.
- [184] M.F. Barber, E. Michishita-Kioi, Y. Xi, L. Tasselli, M. Kioi, Z. Moqtaderi, R.I. Tennen, S. Paredes, N.L. Young, K. Chen, K. Struhl, B.A. Garcia, O. Gozani, W. Li, K.F. Chua, SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation, *Nature.* 487 (2012) 114–118. doi:10.1038/nature11043.
- [185] M.C. Haigis, R. Mostoslavsky, K.M. Haigis, K. Fahie, D.C. Christodoulou, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, G.D. Yancopoulos, M. Karow, G. Blander, C. Wolberger, T.A. Prolla, R. Weindruch, F.W. Alt, L. Guarente, SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells, *Cell.* 126 (2006) 941–954. doi:10.1016/j.cell.2006.06.057.
- [186] T.L. Newkirk, A.A. Bowers, R.M. Williams, Discovery, biological activity, synthesis and potential therapeutic utility of naturally occurring histone deacetylase inhibitors., *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 1293–1320. doi:10.1039/b817886k.
- [187] T. Nakagawa, L. Guarente, Sirtuins at a glance., *J. Cell Sci.* 124 (2011) 833–838. doi:10.1242/jcs.081067.
- [188] F. Joanna, L.A. van Grunsven, V. Mathieu, S. Sarah, D. Sarah, V. Karin, V. Tamara, R. Vera, Histone deacetylase inhibition and the regulation of cell growth with particular reference to liver pathobiology., *J. Cell. Mol. Med.* 13 (2009) 2990–3005. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00831.x.
- [189] L. Calderón-Garcidueñas, R.J. Kulesza, R.L. Doty, A. D’Angiulli, R. Torres-Jardón, Megacities air pollution problems: Mexico City Metropolitan Area critical issues on the central nervous system pediatric impact, *Environ. Res.* (2015). doi:10.1016/j.envres.2014.12.012.
- [190] H.I. Abdel-Shafy, M.S.M. Mansour, A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, *Egypt. J. Pet.* (2016). doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011.
- [191] M. Alavanja, J.A. Baron, R.C. Brownson, P.A. Buffler, D.M. DeMarini, M. V. Djordjevic, R. Doll, E.T.H. Fontham, Y.T. Gao, N. Gray, P.C. Gupta, A. Hackshaw, S.S. Hecht, K. Husgafvel-Pursiainen, E. Matos, R. Peto, D.H. Phillips, J.M. Samet, G. Stoner, M.J. Thun, J. Trédaniel, P. Vineis, H.E. Wichmann, A.H. Wu, D. Zaridze, Tobacco smoke and involuntary smoking, in: *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Humans*, 2004. doi:10.1007/978-1-61737-995-6_3.
- [192] IARC, Benzo[b]fluoreno, *Monogr Eval Carcinog Chem Hum.* 32 (1983) 183–7.
- [193] A. Hawliczek, B. Nota, P. Cenijn, J. Kamstra, B. Pieterse, R. Winter, K. Winkens, H. Hollert, H. Segner, J. Legler, Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish

Danio rerio, *Reprod. Toxicol.* 33 (2012) 213–223. doi:10.1016/j.reprotox.2011.11.001.

- [194] K. Misaki, S. Matsui, T. Matsuda, Metabolic enzyme induction by HepG2 cells exposed to oxygenated and nonoxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chem. Res. Toxicol.* 20 (2007) 277–283. doi:10.1021/tx060197u.
- [195] J. Piskorska-Pliszczynska, B. Keys, S. Safe, M.S. Newman, The cytosolic receptor binding affinities and ahh induction potencies of 29 polynuclear aromatic hydrocarbons, *Toxicol. Lett.* 34 (1986) 67–74. doi:10.1016/0378-4274(86)90146-3.
- [196] J.W. Cook, C.L. Hewett, I. Hieger, The Isolation of a Cancer-producing Hydrocarbon from Coal Tar, *Res. Inst. Cancer Hosp. February (1933)* 395–405. doi:10.1039/jr9330000395.
- [197] R.L. Cooper, A.J. Lindsey, 3,4-Benzopyrene and other polycyclic hydrocarbons in cigarette smoke, *Br. J. Cancer.* (1955).
- [198] I. Lasnitzki, The effect of 3-4-benzopyrene on human foetal lung grown in vitro, *Br. J. Cancer.* (1956).
- [199] I. Risk Information System, Toxicological Review of Benzo[a]pyrene Toxicological Review of Benzo[a]pyrene Toxicological Review of Benzo[a]pyrene, (2017). https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0136tr.pdf.
- [200] P.E.R. Ermala, P., Setala, K., Ekwall, Gastric absorption of 3,4-benzopyrene. The Effect of Physiological Processes on Absorption I., (1951) 753–757.
- [201] S. Calcutt, G., Payne, THE INTRACELLULAR METABOLISM OF 3 : 4 BENZOPYRENE : FURTHER EXAMINATION OF THE SUPERNATANT FRACTION FROM MOUSE LIVER., *Br. J. Cancer.* (1954) 561–565.
- [202] J.G. Chalmers, THE ADSORPTION OF 3 : 4-BENZOPYRENE AND ITS FLUORESCENT METABOLITES ON SERUM PROTEINS., (1955).
- [203] N. Verma, M. Pink, A.W. Rettenmeier, S. Schmitz-Spanke, Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity, *Proteomics.* 12 (2012) 1731–1755. doi:10.1002/pmic.201100466.
- [204] J.D. Sun, R.K. Wolff, G.M. Kanapilly, Deposition, retention, and biological fate of inhaled benzo(a)pyrene adsorbed onto ultrafine particles and as a pure aerosol, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65 (1982) 231–244. doi:10.1016/0041-008X(82)90005-9.
- [205] D.R. Bevan, E.H. Weyand, Compartmental analysis of the disposition of benzo[a]pyrene in rats, *Carcinogenesis.* 9 (1988) 2027–2032. doi:10.1093/carcin/9.11.2027.
- [206] H. V Gelboin, Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: Role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes., *Physiol. Rev.* 60 (1980) 1107–1166. wos:A1980KP46600003.
- [207] J.M. Pezzuto, M.A. Lea, C.S. Yang, Binding of Metabolically Activated Benzo(A)Pyrene to Nuclear Macromolecules, *Cancer Res.* 36 (1976) 3647–3653.
- [208] N.E. Geacintov, M. Cosman, B.E. Hingerty, S. Amin, S. Broyde, D.J. Patel, NMR solution structures of stereoisomeric covalent polycyclic aromatic carcinogen-DNA adducts: Principles, patterns, and diversity, *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 111–146. doi:10.1021/tx9601418.
- [209] D.M. Jerina, A. Chadha, A.M. Cheh, M.E. Schurdak, A.W. Wood, J.M. Sayer, Covalent bonding of bay-region diol epoxides to nucleic acids, *Adv Exp Med Biol.* 283 (1991) 533–553.
- [210] C.-E. Boström, P. Gerde, A. Hanberg, B. Jernström, C. Johansson, T. Kyrklund, A. Rannug, M. Törnqvist, K. Victorin, R. Westerholm, Cancer Risk Assessment, Indicators, and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ambient Air, *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 451–489. doi:10.1289/ehp.02110s3451.
- [211] M.W. Anderson, Activation of the Ki-ras protooncogene in spontaneously occurring and chemically induced lung tumors of the strain A mouse, 86 (1989) 3070–3074.
- [212] S. Nesnow, M.J. Mass, J.A. Ross, A.J. Galati, G.R. Lambert, C. Gennings, J. Carter, G.D. Stoner, Lung tumorigenic interactions in strain A/J mice of five environmental polycyclic aromatic hydrocarbons, in: *Environ. Health Perspect.*, 1998: pp. 1337–1346.
- [213] S. Nesnow, J.A. Ross, M.J. Mass, G.D. Stoner, Mechanistic relationships between DNA adducts, oncogene mutations, and lung tumorigenesis in strain a mice, in: *Exp. Lung Res.*, 1998: pp. 395–405. doi:10.3109/01902149809087376.
- [214] S. Nesnow, J.A. Ross, G.D. Stoner, M.J. Mass, Mechanistic linkage between DNA adducts, mutations in oncogenes and

- tumorigenesis of carcinogenic environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mice, *Toxicology*. 105 (1995) 403–413. doi:10.1016/0300-483X(95)03238-B.
- [215] M.J. Mass, J.A. Ross, S. Nesnow, A.J. Jeffers, G. Nelson, A.J. Galati, G.D. Stoner, Ki-ras oncogene mutations in tumors and DNA adducts formed by benz[*j*]aceanthrylene and benzo[*a*]pyrene in the lungs of strain A/J mice, *Mol. Carcinog.* 8 (1993) 186–192. doi:10.1002/mc.2940080309.
- [216] P. Keohavong, Q. Lan, W.M. Gao, D.M. DeMarini, M.J. Mass, X.M. Li, B.C. Roop, J. Weissfeld, D. Tian, J.L. Mumford, K-ras mutations in lung carcinomas from nonsmoking women exposed to unvented coal smoke in China, *Lung Cancer*. 41 (2003) 21–27. doi:10.1016/S0169-5002(03)00125-9.
- [217] D.M. DeMarini, S. Landi, D. Tian, N.M. Hanley, X. Li, F. Hu, B.C. Roop, M.J. Mass, P. Keohavong, W. Gao, M. Olivier, P. Hainaut, J.L. Mumford, Lung tumor KRAS and TP53 mutations in nonsmokers reflect exposure to PAH-rich coal combustion emissions, *Cancer Res.* 61 (2001) 6679–6681.
- [218] E.L. Cavalieri, E.G. Rogan, Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons., *Xenobiotica*. 25 (1995) 677–88. doi:10.3109/00498259509061885.
- [219] P.D. Devanesan, S. Higginbotham, F. Ariese, R. Jankowiak, M. Suh, G.J. Small, E.L. Cavalieri, E.G. Rogan, Depurinating and stable benzo[*a*]pyrene-DNA adducts formed in isolated rat liver nuclei, *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 1113–1116. doi:10.1021/tx9600513.
- [220] E.L. Cavalieri, E.G. Rogan, The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation, *Pharmacol. Ther.* 55 (1992) 183–199. doi:10.1016/0163-7258(92)90015-R.
- [221] M. a Trush, T.M. Penning, G. Dryhurst, T.J. Monks, Role of Quinones in Toxicology 欵?AU - Bolton, Judy L, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 135–160. doi:10.1021/tx9902082.
- [222] T.M. Penning, M.E. Burczynski, C.F. Hung, K.D. McCoull, N.T. Palackal, L.S. Tsuruda, Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: Generation of reactive and redox active o-quinones, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 1–18. doi:10.1021/tx980143n.
- [223] J.H. Park, A.B. Troxel, R.G. Harvey, T.M. Penning, Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the Aldo-Keto-Reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-Oxo-dGuo via reactive oxygen species, *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2006) 719–728. doi:10.1021/tx0600245.
- [224] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons, U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. Public Heal. Serv. (1995) 18. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69-p.pdf>.
- [225] S. Payne, THE PATHOLOGICAL EFFECTS OF THE INTRAPERITONEAL INJECTION OF 3 : 4-BENZOPYRENE INTO RATS AND MICE, (1957).
- [226] F. Caiment, S. Gaj, S. Claessen, J. Kleinjans, High-throughput Data integration of RNA-miRNA-circRNA reveals novel insights into mechanisms of benzo[*a*]pyrene-induced carcinogenicity, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 2525–2534. doi:10.1093/nar/gkv115.
- [227] T. Souza, D. Jennen, J. van Delft, M. van Herwijnen, S. Kyratoupolos, J. Kleinjans, New insights into BaP-induced toxicity: role of major metabolites in transcriptomics and contribution to hepatocarcinogenesis, *Arch. Toxicol.* 90 (2016) 1449–1458. doi:10.1007/s00204-015-1572-z.
- [228] T. Shimada, A. Sugie, T. Yamada, H. Kawazoe, M. Hashimoto, E. Azuma, T. Nakajima, K. Inoue, Y. Oda, Dose-response studies on the induction of liver cytochromes P4501A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons in arylhydrocarbon-responsive C57BL/6J mice, *Xenobiotica*. 33 (2003) 957–971. doi:D2RPAM8UJ75XK0GR [pii]\r10.1080/0049825031000140896.
- [229] N.L. Chepelev, A.S. Long, W.J. Bowers, R. Gagné, A. Williams, B. Kuo, D.H. Phillips, V.M. Arlt, P.A. White, C.L. Yauk, Transcriptional profiling of the mouse hippocampus supports an NMDAR-mediated neurotoxic mode of action for benzo[*a*]pyrene, *Environ. Mol. Mutagen.* 57 (2016) 350–363. doi:10.1002/em.22020.
- [230] N. Trushin, S. Alam, K. El-Bayoumy, J. Krzeminski, S.G. Amin, J. Gullett, C. Meyers, B. Prokopczyk, Comparative metabolism of benzo[*a*]pyrene by human keratinocytes infected with high-risk human papillomavirus types 16 and 18 as episomal or integrated genomes., *J. Carcinog.* 11 (2012) 1–9. doi:10.4103/1477-3163.92309.

- [231] M.J. Shear, The production of tumors in mice with hydrocarbons, *Cancer Res.* 40 (1938) 211–228.
- [232] N. TOXNET, 3-Methylcholanthrene, (2018). <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+2942> (accessed October 12, 2018).
- [233] N.C. for B.I. PubChem, 3-Methylcholanthrene, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1674> (accessed October 12, 2018).
- [234] J.M. Rice, R.M. Kovatch, M. Anderson, Intraperitoneal mesotheliomas induced in mice by a polycyclic aromatic hydrocarbon, *J. Toxicol. Environ. Health.* 27 (1989) 153–160. doi:10.1080/15287398909531285.
- [235] E. Bingham, B. Cohrssen, C.H. Powell, Patty's Toxicology 6th edition, in: *Patty's Toxicol.*, 2012: pp. 355–358. <https://books.google.com.eg/books?id=1mk3lFvtBSQC&pg=PA355&lpg=PA355&dq=germanium+forms&source=bl&ots=eSfHJSSScd&sig=dzmMGdFifebV8loGp-R-ww8y-xM&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwi76vOVn6vZAhWQb1AKHQweA40Q6AEIZTAF#v=onepage&q=germanium forms&f=false>.
- [236] C.L. Searle, ed., *Chemical carcinogens*, ACS monograph 173, American Chemical Society, 1973.
- [237] M.S. Miller, A.B. Jones, S.S. Park, L.M. Anderson, The formation of 3-methylcholanthrene-initiated lung tumors correlates with induction of cytochrome P4501A1 by the carcinogen in fetal but not adult mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104 (1990) 235–245. doi:10.1016/0041-008X(90)90298-9.
- [238] T.. Shepard, *Catalog of teratogenic agents*, 13th ed., The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, 2010.
- [239] H.P. Witschi, Enhancement of tumor formation in mouse lung by dietary butylated hydroxytoluene, *Toxicology.* 21 (1981) 95–104. doi:10.1016/0300-483X(81)90120-7.
- [240] P. Bernfeld, F. Homburger, Skin painting studies in Syrian hamsters, *Prog Exp Tumor Res.* 26 (1983) 128–53.
- [241] L.T. Larionow, *On the Fate of Carcinogenic Hydrocarbons in the Animal Body*, (1947).
- [242] J.G. Chalmers, P.R. Peacock, CLXXVII . FURTHER EVIDENCE REGARDING THE ELIMINATION OF CERTAIN POLYCYCLIC HYDROCARBONS FROM THE ANIMAL BODY ., *Biochem. J.* (1936) 1242–1249.
- [243] A. Eastman, J. Sweetenham, E. Bresnick, Comparison of in vivo and in vitro binding of polycyclic hydrocarbons to DNA, *Chem. Biol. Interact.* (1978). doi:10.1016/0009-2797(78)90095-9.
- [244] C.F.A. Van Sliedregt, A., Van Bezooijen, Effecto fo different doses of 3-methylcholanthrene on the Localization of the 3-Methylcholanthrene-Inducible Isoenzymes of Cytochrome P450 Within the Centrilobular and Periportal Zones of the Rat Liver, *Biochem. Pharmacol.* 39 (1990) 1–6.
- [245] W. Miao, Y. Jin, X. Lin, Z. Fu, Differential expression of the main polycyclic aromatic hydrocarbon responsive genes in the extrahepatic tissues of mice, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37 (2014) 885–894. doi:10.1016/j.etap.2014.03.001.
- [246] D.W. Poland, Alan, Glover, Edward, Robinson Joseph R., Nebert, Genetic Expression of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity. Induction of monooxygenase activities and cytochrome P1 450 formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice genetically “nonresponsive” to other aromatic hydrocarbons, *J. Biol. Chem.* (1974).
- [247] B. Moorthy, Persistent Expression of 3-Methylcholanthrene-Inducible Cytochromes P4501A in Rat Hepatic and Extrahepatic, *Pharmacology.* 294 (2000) 313–322.
- [248] S.R. Kondraganti, K. Muthiah, W. Jiang, R. Barrios, B. Moorthy, Effects of 3-methylcholanthrene on gene expression profiling in the rat using cDNA microarray analyses, *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005) 1634–1641. doi:10.1021/tx050085n.
- [249] I.S. Fazili, W. Jiang, L. Wang, E. a Felix, T. Khatlani, X. Coumoul, R. Barouki, B. Moorthy, Persistent induction of cytochrome P4501A1 in human hepatoma cells by 3-methylcholanthrene: evidence for sustained transcriptional activation of the CYP1A1 promoter., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333 (2010) 99–109. doi:10.1124/jpet.109.162222.
- [250] S. Safe, 3-methylcholanthrene induces differential recruitment of aryl hydrocarbon receptor to human promoters, *Toxicol. Sci.* 117 (2010) 1–3. doi:10.1093/toxsci/kfq193.
- [251] M.R. Osborne, P. Brookes, H. Lee, R.G. Harvey, The reaction of a 3-methylcholanthrene diol epoxide with dna in relation to the binding of 3-methylcholanthrene to the dna of mammalian cells, *Carcinogenesis.* 7 (1986) 1345–1350. doi:10.1093/carcin/7.8.1345.

- [252] J.S. Rhim, J. Fujita, J.B. Park, Activation of H- ras oncogene in 3-methylcholanthrene-transformed human cell line, *Carcinogenesis*. 8 (1987) 1165–1167. doi:10.1093/carcin/8.8.1165.
- [253] M. Abdelrahim, E. Ariazi, K. Kim, S. Khan, R. Barhoumi, R. Burghardt, S. Liu, D. Hill, R. Finnell, B. Wlodarczyk, V.C. Jordan, S. Safe, 3-Methylcholanthrene and other aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor α , *Cancer Res*. 66 (2006) 2459–2467. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3132.
- [254] S.H. Juan, J.L. Lee, P.Y. Ho, Y.H. Lee, W. Sen Lee, Antiproliferative and antiangiogenic effects of 3-methylcholanthrene, an aryl-hydrocarbon receptor agonist, in human umbilical vascular endothelial cells, *Eur. J. Pharmacol.* 530 (2006) 1–8. doi:10.1016/j.ejphar.2005.11.023.
- [255] P.M. Nguyen, D. Wang, Y. Wang, Y. Li, J.A. Uchizono, W.K. Chan, P23 co-chaperone protects the aryl hydrocarbon receptor from degradation in mouse and human cell lines, *Biochem. Pharmacol.* 84 (2012) 838–850. doi:10.1016/j.bcp.2012.06.018.
- [256] C.C. Chang, Y.M. Sue, N.J. Yang, Y.H. Lee, S.H. Juan, 3-Methylcholanthrene, an AhR agonist, caused cell-cycle arrest by histone deacetylation through a RhoA-dependent recruitment of HDAC1 and pRb2 to E2F1 complex, *PLoS One*. 9 (2014) 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0092793.
- [257] A.K. Singh, M.P. Kashyap, V. Kumar, V.K. Tripathi, D.K. Yadav, F. Khan, S. Jahan, V.K. Khanna, S. Yadav, A.B. Pant, 3-methylcholanthrene induces neurotoxicity in developing neurons derived from human CD34+thy1+ stem cells by activation of aryl hydrocarbon receptor, *NeuroMolecular Med.* 15 (2013) 570–592. doi:10.1007/s12017-013-8243-0.
- [258] E.B.M. Khlood, H. Miyoshi, H. Iwata, A. Kazusaka, Y. Kon, Al.H. Abou Hadid, E.K. Moustafe, M.H. Ghonim, S. Fujita, Effects of concurrent exposure to 3-methylcholanthrene and vitamin A on fetal development in rats, *Jpn. J. Vet. Res.* 46 (1999) 13–23.
- [259] P. Sims, The metabolism of 3-methylcholanthrene and some related compounds by rat-liver homogenates., *Biochem. J.* 98 (1966) 215–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5938646><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1264818>.
- [260] M. Shou, S.K. Yang, 1-Hydroxy- and 2-hydroxy-3-methylcholanthrene: regioselective and stereoselective formations in the metabolism of 3-methylcholanthrene and enantioselective disposition in rat liver microsomes, *Carcinogenesis*. 11 (1990) 933–940.
- [261] N. TOXNET, 7,12-Dimetilben[a]antraceno, (2018). <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+2938> (accessed October 12, 2018).
- [262] J.A. Laher, J.M., Barrowman, Role of the lymphatic system in the transport of absorbed 7,12-dimethylbenzanthracene in rat, *Lipids*. 22 (1987) 152–5.
- [263] W. Flesher, . OF RADIOACTIVITY IN THE TISSUES RATS AFTER ORAL ADMINISTRATION, 318 (1967) 1821–1831.
- [264] S. Prodi, G., Rocchi, P., Grilli, Binding of 7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene and Benzo (a) pyrene to Nucleic Acids and Proteins of Organs in Rats ', 30 (1970) 1020–1023.
- [265] M.B. Gruenstein, M., Meranze, D.R., Thatcher, D., Shimkin, Carcinogenic Effects of Intra gastric 3-Methyl- anthracene in Wistar and Sprague-Dawley, *J. Natl. Cancer Inst.* (1965).
- [266] K. Brown, A. Buchmann, A. Balmain, Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 538–42. doi:10.1073/pnas.87.2.538.
- [267] H. Zarbl, S. Sukumar, A. V Arthur, D. Martin-Zanca, M. Barbacid, Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats, *Nature*. 315 (1985).
- [268] T. Tominaga, P.R. Libby, T.L. Dao, An Early Effect of 7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene Mammary Gland DNA Synthesis1 on Rat, 30 (1970) 118–122.
- [269] R.L. Tomsak, R.T. Cook, Metabolism of 7,12,-dimethylbenz(a)anthracene by normal and regenerating rat livers., *Br. J. Cancer*. 35 (1977) 713–21.
- [270] S. Marvanova, J. Vondráč, L. Trilecová, P. Krc, J. Topinka, Z. Nováková, A. Milcová, M. Machala, Toxic Effects of Methylated Benz [a] anthracenes in Liver Cells, *Cell*. (2008) 503–512.
- [271] C. Huggins, M. Sotokichi, Selective adrenal necrosis and apoplexy induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, (1961).

- [272] B.Y.E. Ford, C. Huggins, Selective destruction in testis induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, (1963).
- [273] J. Gao, L. a Mitchell, F.T. Lauer, S.W. Burchiel, p53 and ATM/ATR regulate 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced immunosuppression., *Mol. Pharmacol.* 73 (2008) 137–146. doi:10.1124/mol.107.039230.DMBA.
- [274] P. Sims, Epoxy derivatives of Aromatic Polycyclic Hydrocarbons: The preparation and metabolism of epoxides related to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Biochem. J.* (1973) 405–413.
- [275] J. DiGiovanni, M.R. Juchau, Biotransformation and bioactivation of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (7, 12-DMBA)., *Drug Metab. Rev.* 11 (1980) 61–101. doi:10.3109/03602538008994022.
- [276] S. Anttila, J. Hakkola, P. Tuominen, E. Elovaara, K. Husgafvel-Pursiainen, A. Karjalainen, A. Hirvonen, T. Nurminen, Methylation of Cytochrome P4501A1 Promoter in the Lung Is Associated with Tobacco Smoking, *Cancer Res.* 63 (2003) 8623–8628.
- [277] S.T. Okino, D. Pookot, L.C. Li, H. Zhao, S. Urakami, H. Shiina, M. Igawa, R. Dahiya, Epigenetic inactivation of the dioxin-responsive Cytochrome P4501A1 gene in human prostate cancer, *Cancer Res.* 66 (2006) 7420–7428. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0504.
- [278] M. Schnekenburger, L. Peng, A. Puga, HDAC1 bound to the Cyp1a1 promoter blocks histone acetylation associated with Ah receptor-mediated trans-activation, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1769 (2007) 569–578. doi:10.1016/j.bbaexp.2007.07.002.
- [279] A.M. Waterhouse, J.B. Procter, D.M.A. Martin, M. Clamp, G.J. Barton, Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench, *Bioinformatics.* 25 (2009) 1189–1191. doi:10.1093/bioinformatics/btp033.
- [280] D. Takai, P.A. Jones, The CpG island searcher: a new WWW resource, *Silico Biol.* 3 (2003) 235–240. doi:2003030021 [pii].
- [281] X. Messeguer, R. Escudero, D. Farré, O. Núñez, J. Martínez, M.M. Albà, PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches, *Bioinformatics.* 18 (2002) 333–334. doi:10.1093/bioinformatics/18.2.333.
- [282] R.W. Robertson, L. Zhang, D.S. Pasco, J.B. Fagan, Aryl hydrocarbon-induced interactions at multiple DNA elements of diverse sequence - a multicomponent mechanism for activation of cytochrome P4501A1 (CYP1A1) gene transcription, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 1741–1749. doi:10.1093/nar/22.9.1741.
- [283] S. Kress, J. Reichert, M. Schwarz, Functional analysis of the human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) gene enhancer., *Eur. J. Biochem.* 258 (1998) 803–812.
- [284] L.A. Damiani, C.M. Yingling, S. Leng, P.E. Romo, J. Nakamura, S.A. Belinsky, Carcinogen-induced gene promoter hypermethylation is mediated by DNMT1 and causal for transformation of immortalized bronchial epithelial cells, *Cancer Res.* 68 (2008) 9005–9014. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1276.
- [285] L. W.-B., A. L., C. Z.-H., Z. Z.-Y., Z. Y.-H., Y. X.-Y., X. Y.-L., C. J., L. J.-Y., Molecular analysis of DNA repair gene methylation and protein expression during chemical-induced rat lung carcinogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2011).
- [286] V.L. Wilson, R.A. Smith, J. Longoria, M.A. Liotta, C.M. Harper, C.C. Harris, Chemical Carcinogen-Induced Decreases in Genomic 5-Methyldeoxycytidine Content of Normal Human Bronchial Epithelial-Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 3298–3301. doi:10.1073/pnas.84.10.3298.
- [287] V.L. Wilson, Inhibition of DNA Methylation by Chemical Carcinogens In Vitro, *Cell.* 32 (1983) 239–246.
- [288] M. Esteller, ABERRANT DNA METHYLATION AS A CANCER-INDUCING MECHANISM, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 629–656. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095832.
- [289] M. Ehrlich, M.A. Gama-Sosa, L.H. Huang, R.M. Midgett, K.C. Kuo, R.A. Mccune, C. Gehrke, Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells, *Nucleic Acids Res.* (1982). doi:10.1093/nar/10.8.2709.
- [290] A.P. Feinberg, B. Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts, *Nature.* (1983). doi:10.1007/s00542-017-3276-1.
- [291] S.E. Goelz, B. Vogelstein, S.R. Hamilton, A.P. Feinberg, Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms, *Science* (80-.). (1985). doi:10.1126/science.2579435.

- [292] W. Liu, J. Liu, L. Ao, Z. Zhou, Y. Zhou, Z. Cui, H. Yang, J. Cao, Dynamic changes in DNA methylation during multistep rat lung carcinogenesis induced by 3-methylcholanthrene and diethylnitrosamine., *Toxicol. Lett.* 189 (2009) 5–13. doi:10.1016/j.toxlet.2009.04.022.
- [293] J.N. Lapeyre, M.S. Walker, F.F. Becker, DNA methylation and methylase levels in normal and malignant mouse hepatic tissues, *Carcinogenesis*. (1981). doi:10.1093/carcin/2.9.873.
- [294] A.P. Feinberg, R. Ohlsson, S. Henikoff, The epigenetic progenitor origin of human cancer, *Nat. Rev. Genet.* 7 (2006) 21–33. doi:10.1038/nrg1748.
- [295] A.P. Feinberg, M.A. Koldobskiy, A. Göndör, Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression, *Nat. Rev. Genet.* 17 (2016) 284–299. doi:10.1038/nrg.2016.13.
- [296] M. Nakajima, M. Iwanari, T. Yokoi, Effects of histone deacetylation and DNA methylation on the constitutive and TCDD-inducible expressions of the human CYP1 family in MCF-7 and HeLa cells, *Toxicol. Lett.* 144 (2003) 247–256. doi:10.1016/S0378-4274(03)00216-9.
- [297] S.R. Beedanagari, R.T. Taylor, O. Hankinson, Differential regulation of the dioxin-induced Cyp1a1 and Cyp1b1 genes in mouse hepatoma and fibroblast cell lines, *Toxicol. Lett.* 194 (2010) 26–33. doi:10.1016/j.toxlet.2010.01.019.
- [298] S.R. Beedanagari, R.T. Taylor, P. Bui, F. Wang, D.W. Nickerson, O. Hankinson, Role of epigenetic mechanisms in differential regulation of the dioxin-inducible human CYP1A1 and CYP1B1 genes., *Mol. Pharmacol.* 78 (2010) 608–616. doi:10.1124/mol.110.064899.
- [299] X. Tekpli, S. Zienolddiny, V. Skaug, L. Stangeland, A. Haugen, S. Mollerup, DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung, *Int. J. Cancer.* 131 (2012) 1509–1516. doi:10.1002/ijc.27421.
- [300] S.U. Vorrink, D.R. Hudachek, F.E. Domann, Epigenetic determinants of CYP1A1 induction by the aryl hydrocarbon receptor agonist 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126), *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 13916–13931. doi:10.3390/ijms150813916.
- [301] H.-J. Park, Y.-J. Choi, J.W. Kim, H.-S. Chun, I. Im, S. Yoon, Y.-M. Han, C.-W. Song, H. Kim, Differences in the Epigenetic Regulation of Cytochrome P450 Genes between Human Embryonic Stem Cell-Derived Hepatocytes and Primary Hepatocytes, *PLoS One.* 10 (2015) e0132992. doi:10.1371/journal.pone.0132992.
- [302] L. Xu, T.S. Ruh, M.F. Ruh, Effect of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A on the responsiveness of rat hepatocytes to dioxin, *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997) 951–957. doi:10.1016/S0006-2952(97)00113-5.
- [303] L.A. Hooven, B. Mahadevan, C. Keshava, C. Johns, C. Pereira, D. Desai, S. Amin, A. Weston, W.M. Baird, Effects of suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A on induction of cytochrome P450 enzymes and benzo[a]pyrene DNA adduct formation in human cells, *Bioorg Med Chem Lett.* 15 (2005) 1283–1287. doi:10.1016/j.bmcl.2005.01.032.
- [304] T. Henkens, P. Papeleu, G. Elaut, M. Vinken, V. Rogiers, T. Vanhaecke, Trichostatin A, a critical factor in maintaining the functional differentiation of primary cultured rat hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218 (2007) 64–71. doi:10.1016/j.taap.2006.10.012.
- [305] V.L. Wilson, P.A. Jones, Chemical carcinogen-mediated decreases in DNA 5-methylcytosine content of BALB/3T3 cells, *Carcinogenesis*. 5 (1984) 1027–1031. doi:10.1093/carcin/5.8.1027.
- [306] D.T.W. Wongs, J.A. Hartigan, D.K. Biswasp, Mechanism of Induction of Human Chorionic Gonadotropin in Lung Tumor Cells in Culture, 259 (1984) 10738–10744.
- [307] M.J. Mass, S. Schorschinsky, J.A. Lasley, D.K. Beemanl, S.J. Austin, Consistent oncogene methylation changes in epithelial cells chemically transformed in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 (1989) 693–699.
- [308] B. Xia, L. Yang, H. Huang, L. Pang, X. Yang, Y. Yi, X. Ren, J. Li, Z. Zhuang, J. Liu, Repression of Biotin-Related Proteins by Benzo [a] Pyrene-Induced Epigenetic Modifications in Human Bronchial Epithelial Cells, *Int. J. Toxicol.* 35 (2016) 336–343. doi:10.1177/1091581816637071.
- [309] W. bin Liu, Z. hong Cui, L. Ao, Z. yuan Zhou, Y. hong Zhou, X. yan Yuan, Y. long Xiang, J. yi Liu, J. Cao, Aberrant methylation accounts for cell adhesion-related gene silencing during 3-methylcholanthrene and diethylnitrosamine induced multistep rat lung carcinogenesis associated with overexpression of DNA methyltransferases 1 and 3a, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 251

(2011) 70–78. doi:10.1016/j.taap.2010.12.002.

- [310] I. Teneng, D.E. Montoya-Durango, J.L. Quertermous, M.E. Lacy, K.S. Ramos, Reactivation of L1 retrotransposon by benzo(a)pyrene involves complex genetic and epigenetic regulation, *Epigenetics*. 6 (2011) 355–367. doi:10.4161/epi.6.3.14282.
- [311] H. Huang, G. Hu, J. Cai, B. Xia, J. Liu, X. Li, W. Gao, J. Zhang, Y. Liu, Z. Zhuang, Role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase silencing in DNA hypomethylation induced by benzo(a)pyrene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452 (2014) 708–714. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.146.
- [312] C.L. Yauk, A. Polyzos, A. Rowan-Carroll, I. Kortubash, A. Williams, O. Kovalchuk, Tandem repeat mutation, global DNA methylation, and regulation of DNA methyltransferases in cultured mouse embryonic fibroblast cells chronically exposed to chemicals with different modes of action, *Environ. Mol. Mutagen.* 49 (2008) 26–35. doi:10.1002/em.
- [313] A. Laknaur, T.L. Foster, L.E. Bobb, A. Ramesh, G.M. Ladson, D.B. Hood, A. Al-Hendy, C. Thota, Altered expression of histone deacetylases, inflammatory cytokines and contractile-associated factors in uterine myometrium of Long Evans rats gestationally exposed to benzo[a]pyrene, *J. Appl. Toxicol.* 36 (2016) 827–835. doi:10.1002/jat.3216.
- [314] D. Adenuga, H. Yao, T.H. March, J. Seagrave, I. Rahman, Histone deacetylase 2 is phosphorylated, ubiquitinated, and degraded by cigarette smoke, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40 (2009) 464–473. doi:10.1165/rcmb.2008-0255OC.
- [315] J. Lu, M. Zhang, Z. Huang, S. Sun, Y. Zhang, SIRT1 in B[a]P-induced lung tumorigenesis, 6 (2015).
- [316] R. Barhoumi, Analysis of Benzo[a]pyrene Partitioning and Cellular Homeostasis in a Rat Liver Cell Line, *Toxicol. Sci.* (2000). doi:10.1093/toxsci/53.2.264.
- [317] C. Stresemann, B. Brueckner, T. Musch, H. Stopper, F. Lyko, Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines, *Cancer Res.* (2006). doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2821.
- [318] G. Rivière, D. Lienhard, T. Andrieu, D. Vieau, B.M. Frey, F.J. Frey, Epigenetic regulation of somatic angiotensin-converting enzyme by DNA methylation and histone acetylation, *Epigenetics*. 6 (2011) 479–490. doi:10.4161/epi.6.4.14961.
- [319] V. Basile, R. Mantovani, C. Imbriano, DNA damage promotes histone deacetylase 4 nuclear localization and repression of G2/M promoters, via p53 C-terminal lysines, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 2347–2357. doi:10.1074/jbc.M507712200.
- [320] G.D. Kao, W.G. McKenna, M.G. Guenther, R.J. Muschel, M.A. Lazar, T.J. Yen, Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response, *J. Cell Biol.* 160 (2003) 1017–1027. doi:10.1083/jcb.200209065.
- [321] Y.C. Wen, D.H. Wang, C.Y. RayWhay, J. Luo, W. Gu, S.B. Baylin, Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses, *Cell*. 123 (2005) 437–448. doi:10.1016/j.cell.2005.08.011.
- [322] A. Hernández-Magaña, Influencia de la 5-aza-2-desoxicitidina sobre la inducción de citocromo P450 (CYP1A1) por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno, Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.
- [323] C. Heidelberger, Chemical carcinogenesis, *Annu. Rev. Biochem.* 44 (1975) 79–121.
- [324] C. Tomasetti, L. Li, B. Vogelstein, Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention, *Science* (80-.). 355 (2017) 1330–1334. doi:10.1126/science.aaf9011.
- [325] T. Hirano, B. Franzen, H. Kato, Y. Ebihara, G. Auer, Genesis of squamous cell lung carcinoma. Sequential changes of proliferation, DNA ploidy, and p53 expression, *Am. J. Pathol.* 144 (1994) 296–302.
- [326] S.B. Baylin, P.A. Jones, A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications, *Nat. Rev. Cancer.* (2011). doi:10.1038/nrc3130.
- [327] Y.L. and E. Seto, HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy, *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3 (2016) 37–41. doi:10.4161/epi.3.1.5736.
- [328] M. Esteller, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps, *Nat. Rev. Genet.* (2007). doi:10.1038/nrg2005.
- [329] J.E. Fraczek, M. Vinken, D. Tourwé, T. Vanhaecke, V. Rogiers, Synergetic effects of DNA demethylation and histone deacetylase inhibition in primary rat hepatocytes., *Invest. New Drugs.* 30 (2012) 1715–24. doi:10.1007/s10637-011-9659-8.

- [330] M. Schnekenburger, G. Talaska, A. Puga, Chromium Cross-Links Histone Deacetylase 1-DNA Methyltransferase 1 Complexes to Chromatin, Inhibiting Histone-Remodeling Marks Critical for Transcriptional Activation, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 7089–7101. doi:10.1128/MCB.00838-07.
- [331] F. Marongiu, M.P. Serra, M. Sini, M. Marongiu, A. Contini, E. Laconi, Cell turnover in the repopulated rat liver: Distinct lineages for hepatocytes and the biliary epithelium, *Cell Tissue Res.* 356 (2014) 333–340. doi:10.1007/s00441-014-1800-5.
- [332] H.Z. Ameny, C. Tohyama, S. Ohsako, Dioxin induces Ahr-dependent robust DNA demethylation of the Cyp1a1 promoter via Tdg in the mouse liver, *Sci. Rep.* 6 (2016). doi:10.1038/srep34989.
- [333] D. Stellas, V.L. Souliotis, M. Bekyrou, D. Smirlis, M. Kirsch-Volders, F. Degrassi, E. Cundari, S.A. Kyrtopoulos, Benzo[a]pyrene-induced cell cycle arrest in HepG2 cells is associated with delayed induction of mitotic instability, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 769 (2014) 59–68. doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.07.004.
- [334] O. Hayes, B. Ramos, L.L. Rodríguez, A. Aguilar, T. Badía, F.O. Castro, Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle, *Anim. Reprod. Sci.* (2005). doi:10.1016/j.anireprosci.2004.11.011.
- [335] H.Y. Huang, J.F. Cai, Q.C. Liu, G.H. Hu, B. Xia, J.Y. Mao, D.S. Wu, J.J. Liu, Z.X. Zhuang, Role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell fate in response to benzo(a)pyrene, *Exp. Cell Res.* 318 (2012) 682–690. doi:10.1016/j.yexcr.2012.01.007.
- [336] S. Parbin, S. Kar, A. Shilpi, D. Sengupta, M. Deb, S.K. Rath, S.K. Patra, Histone Deacetylases, *J. Histochem. Cytochem.* 62 (2014) 11–33. doi:10.1369/0022155413506582.
- [337] W.P. Roos, A. Krumm, Survey and Summary: The multifaceted influence of histone deacetylases on DNA damage signalling and DNA repair, *Nucleic Acids Res.* (2016). doi:10.1093/nar/gkw922.
- [338] Z. Wang, G. Qin, T.C. Zhao, HDAC4: Mechanism of regulation and biological functions, *Epigenomics.* 6 (2014) 139–150. doi:10.2217/epi.13.73.
- [339] C.X. Deng, SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor?, *Int. J. Biol. Sci.* 5 (2009) 147–152. doi:10.7150/ijbs.5.147.
- [340] M. Ouaiissi, F. Silvy, C. Loncle, D.F. Da Silva, C.M. Abreu, E. Martinez, P. Berthézene, S. Cadra, Y.P. Le Treut, J. Hardwigsen, B. Sastre, I. Sielezneff, L. Benkoel, J. Delgrande, A. Ouaiissi, J. Iovanna, D. Lombardo, E. Mas, Further characterization of HDAC and SIRT gene expression patterns in pancreatic cancer and their relation to disease outcome, *PLoS One.* (2014). doi:10.1371/journal.pone.0108520.
- [341] M.D. Burke, R.T. Mayer, Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O dealkylation which is preferentially inducible by 3 methylcholanthrene, *Drug Metab. Dispos.* (1974). doi:10.1080/02603594.2015.1059827.
- [342] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods.* (2012). doi:10.1038/nmeth.2089.
- [343] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method, *Methods.* (2001). doi:10.1006/meth.2001.1262.

15. Artículo publicado: "Sub-acute exposure effect of selected polycyclic aromatic hydrocarbons on protein levels of epigenetic modifiers in non-cancerous hepatic model"

Biomedical Research 2018; 29 (12): 2663-2671

ISSN 0970-938X
www.biomedres.info

Sub-acute exposure effect of selected polycyclic aromatic hydrocarbons on protein levels of epigenetic modifiers in non-cancerous hepatic model.

Sitlali del Rosario Olguín-Reyes, Sandra Luz Hernández-Ojeda, Tzipe Govezensky, Rafael Camacho-Carranza, Jesús Javier Espinosa-Aguirre*

Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Institute of Biomedical Research, National Autonomous University of Mexico, University City, Coyoacán, México

Abstract

It has been proposed that in the first stage of carcinogenesis, the progenitor cell may have epigenetics changes before acquisition of mutations, driving the cell to acquire malignant characteristics. Some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are carcinogenic compounds, like benzo(a)fluorene, benzo(a)pyrene, 3-methylcholanthrene, and 7, 12-dimethylbenzanthracene, which can also produce such mutations, therefore, that epigenetic changes may be favoured in the presence of these molecules. Here, normal rat liver epithelial cell cultures were exposed in a sub-acute way to these selected PAH in order to evaluate changes in the level of proteins involved in the modification of epigenetic changes, such as epigenetic modifiers proteins. In spite that these compounds are structurally related, have similar metabolism pathways and are ligands of same nuclear receptor, they exhibit a different pre-mutational insult to DNA. In consequence, the results show that at least BaP, BF and DMBA modified with a different pattern the protein levels of epigenetic modifiers proteins.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons, Global DNA methylation, DNA methyltransferases, Histone deacetylases, SIRT1, 5-aza-2-deoxycytidine.

Accepted on May 24, 2018

Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) are anthropogenic compounds found in several sources, such as cigarette smoke, coal tar, charcoal cooked food, to mention a few [1]. They display a wide range of modes of action for toxicity, such as interaction and activation of nuclear receptors, causing repression or activation of gene transcription. Despite that, they are best known as mutagenic and carcinogenic compounds, because their metabolites produce covalent bonds with DNA, which can become in fixed mutations through cell divisions [2]. An example of such covalent bonds between DNA and PAH is given by population living in industrialized areas which present elevated PAH-DNA adduct levels in their blood leukocytes [3-5].

Previously, it has been proposed that cumulative mutations will eventually arise to the initiating mutation in the progenitor cell, allowing to carcinogenesis, but even when the prototypical PAH mutagen benzo(a)pyrene (BaP) has 53.1×10^{-8} relative adduct levels in normal human fibroblast cell culture exposed to 10 μ M for 72 h, it achieves as much as 0.92% rate of mutation [6], while in its epithelial-mesenchymal transition model it takes 1 μ M BaP 24 weeks to present cell transformation [7]. Thus, although DNA damage occurs fast, loss of cell identity takes months of exposure to the carcinogenic compound.

Additionally, some studies proved that epigenetic changes are acquired by non-mutated normal tissues under chemical exposure from which tumor arises, such an example is provided by mutations in p53, which is a marker for lung carcinogenesis [8]. Establishment of mutations on p53 is a late event in lung carcinogenesis, while DNA methylation changes are observed at early stages of this process [9]. It is proposed that epigenetic changes in a progenitor cell precede the initiating mutation [10,11]. Thus, efforts must be done to determine changes in epigenetic processes, as well as changes in the modifiers of those processes, at early time exposure to mutagenic agents in order to determine how they are improving the establishment of progenitor cell.

Epigenetic processes modulate gene expression along life time, they are inherited, involved in the development of several diseases, and can be modulated by environment [12]. Among the proteins that govern epigenetic mechanisms the main groups are DNA methyltransferases (DNMTs) and histone deacetylases (HDACs) [13]. The former group is involved in DNA methylation, which is a mode of gene regulation characterized by methylation at C-5 position of cytosine in CpG dinucleotides, being a marker for either recruitment or prevention of transcriptional factors as well as modifiers of chromatin for gene repression. The latter are involved in histone deacetylation reaction, which play a critical role in

formation of a euchromatin state, therefore facilitating gene expression, additionally, aside from histone proteins, they also catalyze deacetylation reactions at other kind of proteins [14].

DNMTs and HDACs are designated as epigenetic modifiers by the tumor progenitor theory. This theory suggests that the structure of chromatin suffers changes at very early stages in the cancer process and involves epigenetic modulators, modifiers and mediators, rather than simply mutations as an initiation mechanism for carcinogenesis. Epigenetic modifiers are those proteins involved directly in alteration of DNA methylation, chromatin remodeling or structure of chromatin, such as DNMTs and HDACs. These epigenetic modifiers lay their actions over epigenetic mediators, which are genes or proteins that can drive tumors or its progenitor cells towards a neoplastic state, like the insulin like growth factor 2 or WNT signaling members [10,13].

Epigenetic modifiers and mediators can be modulated by processes like cellular signaling and metabolic pathways, which are classified as epigenetic modulators, examples are p53 and RAS signaling. In addition, cellular status, like inflammation, oxidant stress or injury by environmental chemicals, biological and physical agents, can affect the action of epigenetic modifiers and modulators [10,13]. Thus, the present study aimed to profile protein level changes of selected epigenetic modifiers after exposure to four selected PAH compounds.

To address our aim, we selected four well known PAH carcinogens that have been studied thoroughly for several years, BaP, 3-methylcholanthrene (3MC), dimethylbenz (a) anthracene (DMBA), and benzofluorene (BF). These compounds are classical substrates and inducers of cytochrome P450 enzymes (CYP), particularly the isoforms CYP1B1 and CYP1A1 [15], which in turn generate highly reactive metabolites, which react with proteins and DNA, leading to mutagenesis and carcinogenesis [16]. In addition to these effects, they are estrogenic compounds, modulators of cell cycle, proliferation and even modulators of angiogenesis [17-20].

Some studies conducted in cancerous cell cultures showed that BaP can modify DNA methylation and protein levels of DNMTs. Although different mechanisms of action were suggested, DNA hypomethylation was a constant result among those studies, while the effect of BaP over DNMTs protein level was not the same among those studies [21,22]. Actually, it is proposed that cancer cells exhibited global DNA hypomethylation at early mutagen/carcinogen exposure [23], thus, experimental studies must be performed in non-cancerous cells in order to determine early epigenetic changes by carcinogenic compounds in cells with an epigenome nearly unaltered. Then, to reach our experimental purposes, we chose the normal rat liver cell line C9 (C9 cells) because it is metabolically active and have similar epigenetic status to hepatocytes primary cultures [24]. There are very few reports addressing the PAH effects on DNMTs, HDACs, or any other epigenetic modifier protein in hepatic cells. Indirect studies have been performed to make a relationship between PAH

exposure and DNA methylation changes in specific genes such as *c-Myc* proto-oncogene and *RRSSF1A* tumor suppressor gene, which are involved in human hepatocellular carcinoma (HCC) establishment. In this cellular model, *c-Myc* is overexpressed according to its DNA hypomethylation, while *RRSSF1A* mRNA and protein are inversely related to its DNA hypermethylation, and those conditions are related with the increase of PAH-adducts [25-27]. In another hand, a study conducted in murine hepatoma cancer cells exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) showed that this compound induces *cyp1a1* promoter DNA hypomethylation, consequently TCDD increases gene expression of this cytochrome 3 to 5 times in subsequent dioxin exposures. Surprisingly, the DNA demethylation of the *cyp1a1* promoter by TCDD required the recruitment of the epigenetic modifiers proteins Tet2 and Tet3, which are enzymes involved in active DNA demethylation achieved through the conversion of 5-methyl group of CpG into hydroxymethyl moiety that is recognized by thymidine DNA glycosylase, base excision repair, and then replaced with an unaltered cytosine [28]. These studies support the hypothesis that PAHs are able to change epigenetic modifiers proteins conferring a cell environment suitable for the establishment of neoplastic cell.

As was reported for BaP in cancerous cell models, 3MC was also able to alter DNMT1 protein level and DNA methylation, but in a multistage model for lung carcinogenesis [29,30]. Thus, we selected the DNMT protein family to be profiled after C9 cell culture exposure to BaP, BF, 3MC and DMBA. We also determined if the protein levels of these epigenetic modifiers can be translated into alteration of global DNA methylation, which was determined *via* detection of the immunofluorescence mark for 5-methylcytosine.

The other main group of enzymes belonging to the epigenetic modifiers group are HDACs. They have been implicated in the DNA damage response, homologous recombination, and chromatin integrity [31]. Increased activity of these enzymes may allow loss of acetylation, particularly loss of global monoacetylation at histone 4, which is common in human tumor cells [23]. Furthermore, *in vitro* and *in vivo* studies reported changes in HDAC1 and HDAC2 protein levels after exposure to cigarette smoke and 3MC [32,33]; also, even when the studies were not related to PAH exposure, hepatic models have been studied to find the role that HDACs are playing in liver cancer process. From those studies, HDAC1, 2, 3, 5, 6 were found to be involved in anti-apoptotic and proliferative processes in liver cancer cell lines [34-41]. Therefore, we selected some HDAC proteins to be profiled after C9 cell exposure to the four selected PAH mutagens.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

Trypsin, dimethyl sulfoxide (DMSO), BaP, 3MC, DMBA, BF, 5-aza-2-deoxycytidine (5AzadC), was obtained from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Alexa Fluor 488® secondary antibody was acquired from Invitrogen-Life

Sub-acute exposure effect of selected polycyclic aromatic hydrocarbons on protein levels of epigenetic modifiers in non-cancerous hepatic model

Technologies (San Francisco, CA, USA). Antibodies against CYP1B1, DNMT1, DNMT3a, HDAC1, HDAC2, HDAC3 and HDAC4 were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA). Antibody against DNMT3b and SIRT1 was obtained from Abcam (San Francisco, CA, USA). Antibody against GAPDH was obtained from GeneTex (Irvine, CA, USA). HRP-conjugated antibody against rabbit was acquired from Millipore (Billerica, MA, USA). Dulbecco's modified Eagle media (DMEM) and antibiotic-anti-mycotic were obtained from Gibco-Life Technologies (San Francisco, CA, USA). Rat liver epithelial cell line Clone 9, CRL-1439, was supplied by ATCC (Manassas, VA, USA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from ByProducts (Guadalajara, Jalisco, Mexico).

Cell culture

We selected the normal rat liver epithelial cell line Clone 9 (C9 cells) as a representative cell line of normal rat hepatocytes cells. C9 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 0.1% antibiotic-antimycotic at 37°C and 5% CO₂. 5 × 10⁵ C9 cells were plated at dilution 1:10 in 100 mm petri dishes, media was renewed every 3 d, 100% confluent cells were harvested with 0.25% trypsin-1mM EDTA. All experiments were performed after five passages of the C9 cells. Experimental treatments were performed by plating 5 × 10⁵ C9 cells on 100-mm petri dishes at 1:10 dilution with daily media changes. The PAH compounds were dissolved in 0.1% v/v DMSO and final concentrations of 10 M were added to media culture after 48 h of C9 cells plating and continued for 48 h with media renewal each 24 h. 0.1% DMSO was used as vehicle control. C9 cells achieved ~100% confluence at the end of treatments.

To have a positive control for DNA hypomethylation and to determine that changes in DNMTs and DNA methylation were related, we included an experiment where C9 cells were exposed to the DNMTs inhibitor 5-aza-2-deoxycytidine [42]. 0.5 μM of this compound was added into media after 24 h of C9 cells plating and continued for 72 h, alone or in combination with BaP for last 48 h. At the end of the exposure time, C9 cells were harvested and stored at -80°C for future analysis or processed at the moment for protein and immunofluorescence assays. The results represent the average of 3 to 6 independent assays.

Western blot

25 μg of total C9 cell lysate proteins were resolved using a 7.5% polyacrylamide gel under denatured conditions. Resolved proteins were transferred to a nitrocellulose membrane at 250 mA for 3 h at 4°C. Membranes were blocked with 3% m/v BSA-TBS for 2 h at 4°C, exposed to primary antibodies at 1:500 dilution in 0.1% m/v BSA-TBS overnight at 4°C, and secondary antibodies at 1:10000 dilution in 0.1% m/v BSA-TBS at room temperature for 1 h [43]. To detect the protein of

interest, membranes were exposed to Amersham™ ECT Prime Western Blotting Detection Reagent. Digital images were obtained with a Kodak Gel Logic 200 Imaging System and analyzed with the NIH ImageJ software program [44].

5mC Immunofluorescence

Immunofluorescence (IF) assays were performed as reported by Liu et al. [15]. Briefly, C9 cells were fixed for 5 min with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton-PBS, and blocked with 15% foetal rabbit serum. Later, C9 cells were exposed to mouse antibodies against 5mC overnight at 4°C.

After this, C9 cells were exposed to rabbit Alexa Fluor® 488 anti-mouse antibodies at room temperature for 2 h, and mounted on glass slides with DAPI-VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Fluorescence was detected using a fluorescence microscope Olympus BX51-WI Microscope and analyzed with NIH ImageJ software program [44].

Statistical analysis

Data obtained from image analysis of immunoblots for each treatment was compared against vehicle control using one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons as post hoc test.

Data obtained from immunofluorescence assays were analyzed by comparing each treatment against each other by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons as post hoc test. Data reported in figures are the mean ± standard error. Statistical significance was established to be P<0.05. Analyses were performed with SAS 9.0.

Results

To evaluate the epigenetic profile of the PAH compounds in an *in vitro* non-cancerous model we chose the normal liver epithelial cell line C9. In this model, we determined that the PAH compounds selected were not cytotoxic at concentrations below 50 μM.

Based on this and on similar studies where concentrations of 2.5 to 40 μM of these PAH were used [21,22], we decided to expose C9 cell culture to 10 μM each PAH compound for 48 h.

To assess the protein profile level of DNMT proteins after exposure to BF, BaP, 3MC and DMBA, we determined protein levels of DNMT1, DNMT3a and DNMT3b in total cell protein.

Figure 1A-1C shows that only BF and BaP significantly increased the protein level of DNMT1 enzyme but at different extent.

Figure 1D shows that the protein level of DNMT3a in the presence of each PAH did not exhibit statistical difference from control, while the protein level of DNMT3b was significantly diminished after exposure to BF, as Figure 1E shows.

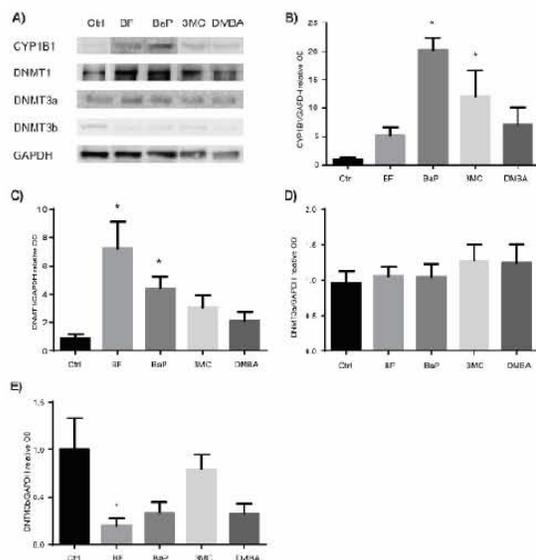


Figure 1. (A-E) DNA methyltransferase protein level after PAH challenge in normal rat liver cell line C9. C9 cells were treated 48 h with 10 μ M of each PAH compound, and with 0.1% DMSO for vehicle control experiments. Once the treatment finished, total protein was obtained, electrophoretically separated under non-denaturing conditions and transferred into nitrocellulose membrane. For immunoblot, each membrane was exposed to antibodies against CYP1B1 (panel B), DNMT1 (panel C), DNMT3a (panel D), DNMT3b (panel E) and GAPDH. The histograms represent the mean of at least 5 independent experiments and the error bar corresponds to the standard error of the mean. Panel A is an image arrangement of representative immunoblots obtained for each protein in each treatment. *Treatment statistically different from control with $P < 0.05$.

HDAC proteins family are divided into 4 classes, thus, we elected HDAC1, HDAC2 and HDAC3 from class I HDACs, HDAC4 from class II, and SIRT1 from class III, to determine their protein level profile after C9 cell culture exposure to BaP, BF, DMBA, and 3MC.

Figures 2A to 2D show that none of the evaluated PAH affected the protein levels of HDAC1, HDAC2 and HDAC3, whereas Figure 2E shows that HDAC4 was significantly increased after exposure to BF and BaP. Figure 2F shows that SIRT1 was significantly increased by BaP and DMBA, and BF increased it, although without statistical difference from control.

Summarizing, among the DNMTs, DNMT1 was modulated with significance by BF and BaP, and DNMT3b was diminished by BF. Among HDACs tested, HDAC 4 and SIRT1 were modulated; HDAC4 was increased by BF and BaP; and SIRT1 was increased by the BaP and DMBA.

Under the conditions of this study, results suggested that BF and BaP have major effects on the modulation of epigenetic modifiers being DNMT1, HDAC4 and SIRT1 up-regulated.

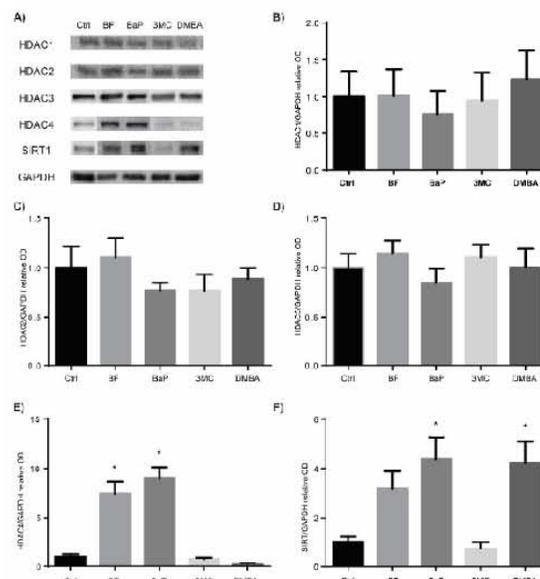


Figure 2. (A-F) Histone deacetylases protein level after PAH challenge in normal liver cell line C9. C9 cells were treated for 48 h with 10 μ M each PAH compound, and 0.1% DMSO as vehicle control. Later, total protein was obtained, electrophoretically separated under non-denaturing conditions and transferred into nitrocellulose membrane. For immunoblot, each membrane was exposed to antibodies against HDAC1 (panel B), HDAC2 (panel C), HDAC3 (panel D), HDAC4 (panel E) and SIRT1 (panel F). Each histogram represents the mean of at least four experiments and standard error bars. Panel A is an image composition of representative immunoblots obtained for each protein in each treatment. *Treatment statistically different from control with $P < 0.05$.

BaP as the prototypical compound of the PAH chemical group, it is the most studied and well known PAH compound. Consequently, we decided to evaluate global DNA methylation in C9 cells after exposure to BaP to explore whether the changes on DNMT1 protein levels by this PAH are translating in changes on DNA methylation. To address this aim we employed same scheme of treatment of BaP as in the profiling of epigenetic modifiers protein level, and signal intensity for 5mC antibody conjugated with Alexa 488 was evaluated. Figure 3A shows that the C9 cell culture exposure to BaP displayed a statistically global DNA hypomethylation state and this change in DNA methylation, as Figure 3B shows. The DNA hypomethylation resulting from exposure of C9 cells to BaP does not agree with DNMTs protein levels obtained after PAH exposure. Thus, to obtain more insight of these data, we evaluated the global DNA methylation after 72 h C9 cell culture exposure to 5-AzaC, a DNMTs inhibitor. Likewise, we wondered if DNMTs inhibition by 5-AzaC could be affected by the increased protein levels of DNMT1 due to BaP exposure, being reflected on DNA methylation. Then, we pre-treated C9 cell culture 24 h with 5-AzaC and this exposure was continued for 48 h by 5-AzaC in co-treatment with BaP. From this experimental design, we obtained that exposure to

Sub-acute exposure effect of selected polycyclic aromatic hydrocarbons on protein levels of epigenetic modifiers in non-cancerous hepatic model

5AzadC achieved low levels of global DNA methylation and they were not statistically different from that obtained after BaP treatment; the same was obtained with C9 cell culture exposure to 5AzadC-BaP combination.

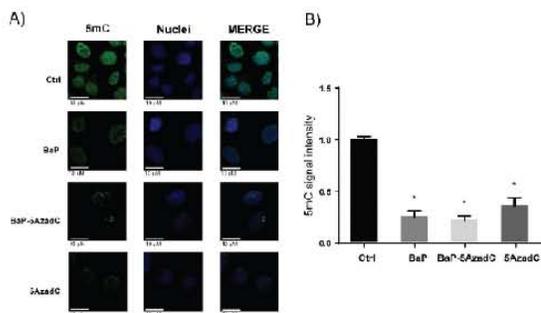


Figure 3. Global DNA methylation in normal rat liver epithelial cells C9 treated with BaP, 5AzadC alone and in co-treatment with BaP. (A) 5mC mark was visualized by immunofluorescence in C9 cells exposed for 48 h to 10 μ M BaP or 0.1% DMSO, as vehicle control, 72 h to 0.5 μ M 5AzadC plus 0.1% DMSO, and the combinatorial treatment 5AzadC-BaP; (B) The height of histograms compares the intensity signal of 5mC antibody conjugated with Alexa[®]488 exhibited by each treatment and analyzed with ImageJ. Each bar represents the mean of ten fields and standard error. Two independent experiments were performed. *Statistical difference against control with $P < 0.05$.

Discussion

There is much knowledge about mutagenic properties of PAHs and now it is known that mutation is a late event in the process called initiation of carcinogenesis [8]. It has been proposed that cancer arises along three steps: epigenetic disruption of progenitor cells, initiating mutation, and genetic and epigenetic plasticity [13]. Therefore, carcinogenic compounds, such as PAHs, may have a role in the epigenetic disruption of progenitor cells before the establishment of key mutations. It is of our interest to know whether selected PAH compounds may exhibit epigenetic disruption properties at early time after their exposure. The tumor progenitor theory also proposes the involvement of epigenetic modifiers, modulators and mediators as players in the process of carcinogenesis. Among the main epigenetic modifiers are two families of proteins, DNMTs and HDACs [13].

In eukaryotes, DNMT family includes three proteins: the de novo DNMT3a and DNMT3b, which are involved in the methylation of un-methylated DNA; and the de novo and maintenance DNMT1 that is involved in DNA methylation of hemi-methylated DNA, thus perpetuates DNA methylation marks after each cell cycle [46].

There is evidence that DNMTs protein levels are frequently increased in human tumors [47-50], and also it was observed a progressive increase of protein levels of DNMT1 and DNMT3a along lung carcinogenesis induction by 3MC/diethylnitrosamine [29], as well as progressive loss of global DNA methylation [30]. Therefore, we explore whether four selected PAH can alter the protein levels of DNMTs in a non-

cancerous model. Our results show that PAH modulate DNMTs protein levels in a differential extent: they increased the protein levels of DNMT1, but only BF and BaP achieved statistical significance. The increase of DNMT1 protein levels after BF and BaP treatment obtained in this study could be a response to DNA damage due to the accumulation of cells in phase S of cell cycle in order to repair the damage in DNA produced [51].

Another explanation for the increase of DNMT1 in C9 cell culture after exposure to BaP and BF is given by the results from a study conducted in HeLa cell culture exposed to BaP. In this study was found that this compound promotes the destruction of the N-terminal portion of DNMT1 which prevents it to go to proteasome degradation [9,52]. This lead us to think that the increase of DNMT1 protein levels by BF and BaP also could be related to the accumulation of this protein due to the prevention of its degradation, but this matter remains to be resolved through more studies in non-cancerous cells as well as in initiation stage of carcinogenesis.

As we mentioned before, loss of DNA methylation was also reported as an early event in the carcinogenesis multistage model, therefore, we determined the global DNA methylation status of the normal rat liver hepatocyte C9 cell culture after exposure to BaP. The results show that the exposure to this compound leads to the loss of global DNA methylation, which agrees with studies in cancer progression models where similar observations were made [29,30,53-56]. The fact that BaP exhibits a global DNA hypomethylation effect in non-cancerous cells strongly supports the idea that epigenetic disruption would happen at initial stages of carcinogenesis development.

Additionally, global DNA hypomethylation exhibited by BaP could be a result from DNA damage response because it is known that poly (ADP-ribose) (PAR) moiety is increased during this event and this moiety is also an inhibitor of DNMT1 catalytic activity either as a free molecule or by binding to poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) [57]. Some studies conducted in 16H1BEC cells showed that global DNA hypomethylation induced by BaP is related to increased levels of PAR [22,58]. Also, as we mentioned before, loss of DNA methylation at local regions in specific genes, such as oncogenic *c-Myc* gene or xenobiotic metabolizing *cyp1a1* gene, which DNA hypo-methylated status is related with exposure to BaP and, at least for the last gene could be the way BaP is driving the loss of methyl moieties on DNA, is through passive DNA demethylation conducted by Tet2 and Tet3 epigenetic modifiers [28]. Then, even when other mechanisms allow the increase of DNMT1 protein levels, this suggests that DNA hypomethylation by PAHs would be a general mechanism for this kind of compounds which is displayed at early time exposure and that is maintained along carcinogenesis progression.

Since PAH treatments result in the increasing of DNMT1 protein levels as well as global DNA hypomethylation, we decided to explore how global DNA methylation behaves in C9 cells after a challenge with an inhibitor of DNMTs and a PAH compound at the same time. 5-aza-2-deoxycytidine

(5AzadC) was chosen as DNMTs inhibitor [42,59] Its effect alone was tested and, as expected, it significantly diminished the levels of global DNA methylation. In addition, even when our results showed that BaP increases the protein level of DNMT1, under our experimental conditions, this compound did not change the level of DNA methylation achieved by 5AzadC, suggesting that this PAH also promotes the loss of DNMT1 activity or acts through different mechanisms besides global loss of DNA methylation, probably through a passive DNA de-methylation [28].

The other important group of epigenetic modifiers proteins is the HDAC family, which is comprised of 4 groups of enzymes: group 1) HDAC 1, 2, 3 and 8; group 2) HDAC 4-7, 9 and 10; group 3) Sirtuins (SIRT) 1-7, classified into 4 groups; and group 4) HDAC 11 [60,61]. They are grouped based on their catalytic mechanism similarities; groups 1, 2 and 4 are zinc-dependent amidohydrolases, while group 3 is a NAD⁺-dependent deacetylase activity.

Cancer cells exhibit loss of acetylation of histone residues [23,41,61,62], which in turn suggests that histone deacetylases must be over-expressed in these kind of cells. In addition, several cancer types exhibits over-expression of HDACs, such is the case of prostate, gastric, colon, liver cancers [41,61] which over-express HDAC1 [63], HDAC2 [64-66] and HDAC3 [67]. Over-expression of HDACs protein levels will result in increased cell proliferation, loss of differentiation and evasion of apoptosis [61,62], features that improve an initiated cell to become a tumor cell. Then, if since the beginning of the exposure to a PAH mutagen it is modifying the HDAC proteins that affect several cellular pathways, such as DNA damage repair, then it can affect the cell environment for acquisition of the aforementioned features.

Class I, II and III HDACs have been implicated in the DNA damage response, homologous recombination and chromatin integrity [31], thus we wondered whether these proteins are affected after a sub-acute challenge with BF, BaP, 3MC and DMBA, which are promoters of DNA repair due to their covalently binding to DNA. We evaluated the protein levels of HDAC1, HDAC2 and HDAC3 after PAH sub-acute exposure, but none of these proteins were significantly altered, even when previous studies have reported the protein degradation of HDAC1, HDAC2 and HDAC3 after 4 h of exposure to cigarette smoke in alveolar cells [32], and in mouse cerebral vascular endothelial cells 3MC was also reported as an agent that causes up-regulation of HDAC1 [33]. Studies on this regard must be done considering a temporal effect of at least BaP and 3MC, which have been reported as inducers of changes in protein levels of class I HDACs.

From class II HDACs, we evaluated possible changes of HDAC4. This protein has emerged as key protein for the maintaining of the G2 cell cycle checkpoint [68]. HDAC4 shuttles from the cytoplasm to the nucleus following DNA damage [69]. In the present study, this protein was significantly increased by BF and BaP. It was suggested that its persistence is linked to an unsuccessful DNA repair [68], and also its over-expression has been reported in many cancer types [41,61,70].

Finally, SIRT1 protein levels were increased after sub-acute exposure to BaP and DMBA. This is an intriguing result because this protein has been reported to be both up and down-regulated in cancer cells and, due to its over-expression in some tumors, it is called an oncogenic protein, but for its absence or diminished levels in cancer cells it is also called tumor suppressor [41,61,71]. The disruption of SIRT1 leads to increased apoptosis after DNA damage, although, disruption of its deacetylation capacity leads to a highly sensitized cells to stress damage response [72,73]. The increase of SIRT1 protein level after exposure to BF, BaP and DMBA may be a normal response after a proper DNA repair where SIRT1 increases in order to stabilize p53 to an inactive state [74]. However, all chronic stimuli like PAH exposure will finally lie in disruption of the protein, thus, it may lead SIRT1 permanently increased.

Conclusion

The obtained results showed that BF, BaP, 3MC and DMBA affected differentially the protein levels of the epigenetic modifiers DNMTs and HDACs. Furthermore, exposure to BaP leads C9 cells to go to a global DNA hypomethylation state, even when DNMT1 levels were increased. Our results show that at least BF and BaP are environmental agents that affect epigenetic modifiers at early time exposure in non-cancerous cells. Deep and thorough research must be made to decipher how early changes are orchestrated for these well-known carcinogens, and how these changes on DNMT1, HDAC4 and SIRT1 may improve the establishment of mutations in the cell tumor progenitor.

Since human hepatic *c-Myc* and RASSF1A and mouse hepatic *cyp1a1* are sensitive to DNA methylation, it would be interesting to search if the mechanism involved in their DNA methylation status is somehow related with the changes achieved for DNMT1 after C9 cells exposure to BaP.

Also, it would be interesting to determine whether the changes observed on DNMT1, HDAC4 and SIRT1 protein levels are involved with proliferation, anti-apoptotic or loss of differentiation of epithelial cells derived from liver, and if they are prompting the acquisition of mutations that accelerate getting neoplastic features.

Finally, since lung cancer is the most common cancer related with PAHs exposure, it will be so interesting to determine if the results obtained in this hepatic model also will be obtained in normal lung epithelial cells.

Acknowledgment

The authors are grateful to Silvia Dávila-Manzanilla for her assistance with English grammar and vocabulary.

This work was supported by DGAPA-UNAM (IN 206212); by Fundación Miguel Alemán; and a PhD research fellowship awarded to Sirlali del Rosario Olguín-Reyes by CONACyT.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

References

1. Heidelberger C. Studies on the cellular and molecular mechanisms of hydrocarbon carcinogenesis. *Euro J Cancer* 1970; 6: 161-172.
2. Viau C, Hakizimana G, Bouchard M. Indoor exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and carbon monoxide in traditional houses in Burundi. *Int Archiv Occupational Environ Health* 2000; 73: 331-338.
3. Perera FP, Hemminki K, Gryzbowska E, Motykiewicz G, Michalska J, Santella RM. Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland. *Nature* 1992; 360: 256-258.
4. Binkova B, Lewtas J, Miskova I, Lenicek J, Sram R. DNA adducts and personal air monitoring of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an environmentally exposed population. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1037-1046.
5. Perera F, Tang D, Whyatt R, Lederman SA, Jedrychowski W. DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo (a) pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from Northern Manhattan, the World Trade Center Area, Poland, and China. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the Am Assoc Cancer Res Am Soc Preventive Oncol* 2005; 14: 709-714.
6. Paget V, Lechevrel M, Andre V, Goff JL, Pottier D, Billet S. Benzo (a) pyrene, aflatoxine B (1) and acetaldehyde mutational patterns in TP53 gene using a functional assay: relevance to human cancer aetiology. *PLoS One* 2012; 7: e30921.
7. Yoshino I, Kometani T, Shoji F, Osoegawa A, Ohba T, Kouso H. Induction of epithelial-mesenchymal transition-related genes by benzo(a)pyrene in lung cancer cells. *Cancer* 2007; 110: 369-374.
8. Hirano T, Franzen B, Kato H, Ebihara Y, Auer G. Genesis of squamous cell lung carcinoma. Sequential changes of proliferation, DNA ploidy, and p53 expression. *Am J Pathol* 1994; 144: 296-302.
9. Damiani LA, Yingling CM, Leng S, Romo PE, Nakamura J, Belinsky SA. Carcinogen-induced gene promoter hypermethylation is mediated by DNMT1 and causal for transformation of immortalized bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 2008; 68: 9005-9014.
10. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 21-33.
11. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
12. Jimenez-Chillaron JC, Nijland MJ, Ascensao AA, Sardao VA, Magalhaes J, Hitchler MJ. Back to the future: transgenerational transmission of xenobiotic-induced epigenetic remodeling. *Epigenetics* 2015; 10: 259-273.
13. Feinberg AP, Koldobskiy MA, Gondor A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat Rev Genet* 2016; 17: 284-299.
14. Zhang G, Pradhan S. Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life* 2014; 66: 240-256.
15. Shimada T, Sugie A, Yamada T, Kawazoe H, Hashimoto M, Azuma E. Dose-response studies on the induction of liver cytochromes P4501A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons in arylhydrocarbon-responsive C57BL/6J mice. *Xenobiotica* 2003; 33: 957-971.
16. Brookes P. Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Res* 1977; 39: 257-283.
17. Zhang Y, Dong S, Wang H, Tao S, Kiyama R. Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. *Environ Pollution* 2016; 213: 809-824.
18. Puga A, Marlowe J, Barnes S, Chang CY, Maier A, Tan Z. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology* 2002; 182: 171-177.
19. Volkov MS, Bolotina NA, Evteev VA, Koblyakov VA. Ah-receptor-independent stimulation of hepatoma 27 culture cell proliferation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biokhimiia* 2012; 77: 201-207.
20. Juan SH, Lee JL, Ho PY, Lee YH, Lee WS. Antiproliferative and antiangiogenic effects of 3-methylcholanthrene, an arylhydrocarbon receptor agonist, in human umbilical vascular endothelial cells. *Euro J Pharmacol* 2006; 530: 1-8.
21. Teneng I, Montoya-Durango DE, Quarterman JL, Lacy ME, Ramos KS. Reactivation of L1 retrotransposon by benzo(a)pyrene involves complex genetic and epigenetic regulation. *Epigenetics* 2011; 6: 355-367.
22. Huang H, Hu G, Cai J, Xia B, Liu J, Li X. Role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase silencing in DNA hypomethylation induced by benzo(a)pyrene. *Biochem Biophys Res Communications* 2014; 452: 708-714.
23. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 286-298.
24. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31: 27-36.
25. Shen L, Fang J, Qiu D, Zhang T, Yang J, Chen S. Correlation between DNA methylation and pathological changes in human hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterology* 1998; 45: 1753-1759.
26. Tao L, Yang S, Xie M, Kramer PM, Pereira MA. Hypomethylation and overexpression of c-jun and c-myc protooncogenes and increased DNA methyltransferase activity in dichloroacetic and trichloroacetic acid-promoted mouse liver tumors. *Cancer Lett* 2000; 158: 185-193.
27. Feng Y, Xue WJ, Li P, Sha ZY, Huang H, Rui L. RASS1A hypermethylation is associated with aflatoxin B1 and polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterology* 2012; 59: 1883-1888.

28. Ameyna HZ, Tohyama C, Ohsako S. Dioxin induces AhR-dependent robust DNA demethylation of the Cyp1a1 promoter via Tdg in the mouse liver. *Scientific Rep* 2016; 6: 34989.
29. Liu WB, Cui ZH, Ao L, Zhou ZY, Zhou YH, Yuan XY. Aberrant methylation accounts for cell adhesion-related gene silencing during 3-methylcholanthrene and diethylnitrosamine induced multistep rat lung carcinogenesis associated with overexpression of DNA methyltransferases 1 and 3a. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 251: 70-78.
30. Liu WB, Liu JY, Ao L, Zhou ZY, Zhou YH, Cui ZH. Dynamic changes in DNA methylation during multistep rat lung carcinogenesis induced by 3-methylcholanthrene and diethylnitrosamine. *Toxicol Lett* 2009; 189: 5-13.
31. Rajendran P, Ho E, Williams DE, Dashwood RH. Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. *Clin Epigenet* 2011; 3: 4.
32. Adenuga D, Yao H, March TH, Seagrave J, Ralaman I. Histone deacetylase 2 is phosphorylated, ubiquitinated, and degraded by cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 40: 464-473.
33. Chang CC, Sue YM, Yang NJ, Lee YH, Juan SH. 3-Methylcholanthrene, an AhR agonist, caused cell-cycle arrest by histone deacetylation through a RhoA-dependent recruitment of HDAC1 and pRb2 to E2F1 complex. *PLoS One* 2014; 9: e92793.
34. Xie HJ, Noh JH, Kim JK, Jung KH, Lim JW, Bae HJ. HDAC1 inactivation induces mitotic defect and caspase-independent autophagic cell death in liver cancer. *PLoS One* 2012; 7: e34265.
35. Buurman R, Gurlevik E, Schaffer V, Eilers M, Sandbothe M, Kreipe H. Histone deacetylases activate hepatocyte growth factor signaling by repressing microRNA-449 in hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology* 2012; 143: 811-820.
36. Quint K, Agaimy A, Di Fazio P, Montalbano R, Steindorf C, Jung R. Clinical significance of histone deacetylases 1, 2, 3, and 7: HDAC2 is an independent predictor of survival in HCC. *Virchows Archiv* 2011; 459: 129-139.
37. Lachenmayer A, Toffanin S, Cabellos L, Alsinet C, Hoshida Y, Villanueva A. Combination therapy for hepatocellular carcinoma: additive preclinical efficacy of the HDAC inhibitor panobinostat with sorafenib. *J Hepatol* 2012; 56: 1343-1350.
38. Fan J, Lou B, Chen W, Zhang J, Lin S, Lv FF. Down-regulation of HDAC5 inhibits growth of human hepatocellular carcinoma by induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 2014; 35: 11523-11532.
39. Feng GW, Dong JD, Shang WJ, Pang XT, Li JF, Liu T. HDAC5 promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma by up-regulating Six1 expression. *Euro Rev Med Pharm Sci* 2014; 18: 811-816.
40. Lv Z, Weng X, Du C, Zhang C, Xiao H, Cai X. Downregulation of HDAC6 promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma cells and predicts poor prognosis in liver transplantation patients. *Mol Carcinogenesis* 2016; 55: 1024-1033.
41. Li Y, Seto E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives Med* 2016; 6.
42. Gnyszka A, Jastrzebski Z, Flis S. DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer. *Anticancer Res* 2013; 33: 2989-2996.
43. Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG. Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protocols Immunol* 2008.
44. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 671-675.
45. Lin X, Gao Q, Li P, Zhao Q, Zhang J, Li J. UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9. *Nat Communications* 2013; 4: 1563.
46. Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 2008; 16: 341-350.
47. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England J Med* 2003; 349: 2042-2054.
48. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463.
49. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 629-656.
50. Lopez-Serra L, Ballestar L, Fraga MF, Alaminos M, Setien F, Esteller M. A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 8342-8346.
51. Stellas D, Souliotis VL, Bekyrou M, Smirlis D, Kirsch-Volders M, Degrazi F. Benzo(a)pyrene-induced cell cycle arrest in HepG2 cells is associated with delayed induction of mitotic instability. *Mutation Res* 2014; 769: 59-68.
52. Agoston AT, Argani P, Yegnashubramanian S, De Marzo AM, Ansari-Lari MA, Hicks JL. Increased protein stability causes DNA methyltransferase 1 dysregulation in breast cancer. *J Biol Chem* 2005; 280: 18302-18310.
53. Sun L, Hui AM, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase expression is associated with an early stage of human hepatocarcinogenesis. *Japanese J Cancer Res Gann* 1997; 88: 1165-1170.
54. Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol* 2004; 164: 689-699.
55. Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Expression of mRNA for DNA

Sub-acute exposure effect of selected polycyclic aromatic hydrocarbons on protein levels of epigenetic modifiers in non-cancerous hepatic model

- methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2001; 33: 561-568.
56. Xia B, Yang LQ, Huang HY, Pang L, Yang XF, Yi YJ. Repression of biotin-related proteins by benzo(a)pyrene-induced epigenetic modifications in human bronchial epithelial cells. *Int J Toxicol* 2016; 35: 336-343.
57. Reale A, Matteis GD, Galleazzi G, Zampieri M, Caiafa P. Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* 2005; 24: 13-19.
58. Huang HY, Cai JF, Liu QC, Hu GH, Xia B, Mao JY. Role of poly (ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell fate in response to benzo(a)pyrene. *Experimental Cell Res* 2012; 318: 682-690.
59. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002; 21: 5483-5495.
60. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 32-42.
61. Parbin S, Kar S, Shilpi A, Sengupta D, Deb M, Rath SK. Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. *J Histochem Cytochem* 2014; 62: 11-33.
62. Glozak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 2007; 26: 5420-5432.
63. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate* 2004; 59: 177-189.
64. Huang BH, Laban M, Leung CH, Lee L, Lee CK, Salto-Tellez M. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differentiation* 2005; 12: 395-404.
65. Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica* 2005; 113: 264-268.
66. Hrzenjak A, Moinfar F, Kremser ML, Strohmaier B, Staber PB, Zatloukal K. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Therap* 2006; 5: 2203-2210.
67. Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* 2006; 281: 13548-13558.
68. Kao GD, McKenna WG, Guenther MG, Muschiel RJ, Lazar MA, Yen TJ. Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. *J Cell Biol* 2003; 160: 1017-1027.
69. Basile V, Mantovani R, Imbriano C. DNA damage promotes histone deacetylase 4 nuclear localization and repression of G2/M promoters, via p53 C-terminal lysines. *J Biol Chem* 2006; 281: 2347-2357.
70. Wang Z, Qin G, Zhao TC. HDAC4: mechanism of regulation and biological functions. *Epigenomics* 2014; 6: 139-150.
71. Deng CX. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *Int J Biol Sci* 2009; 5: 147-152.
72. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001; 107: 137-148.
73. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK. hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001; 107: 149-159.
74. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 2005; 123: 437-448.

***Correspondence to**

Jesús Javier Espinosa-Aguirre

Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology

Institute of Biomedical Research

National Autonomous University of Mexico

University City

Coyoacán

México