

**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa**



**“Efecto de la hipoxia sobre la expresión del citocromo
P450 CYP2S1 en células de cáncer de hígado”**

Tesis para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental

Presenta

Biol. Exp. Alfredo Cabrera Cano

Comité de tutores:

Directora Externa: Dra. Rosa A. Castillo Rodríguez

Director interno: Dr. Luis E. Gómez Quiroz

Asesora: Dra. Karina Pasten Hidalgo

08/Diciembre/2021

Declaración de originalidad

El (La) que suscribe Alfredo Cabrera Cano,
alumno (a) del posgrado Maestría en Biología Experimental, de la División de
Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Efecto
de la hipoxia sobre la expresión del citocromo P450 CYP2S1 en células de cáncer
de hígado”**,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de **Maestro en Biología Experimental** es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 29
de Noviembre del 2021.

Atentamente



Alfredo Cabrera Cano

Nombre y firma del alumno

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Competencia Internacional, y cuenta con apoyo del mismo.

Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 763421

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental

de la División de

Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana

Aprobó la Tesis titulada:

“Efecto de la hipoxia sobre la expresión del citocromo P450 CYP2S1 en células de cáncer de hígado”,

Que presentó

<<Alfredo Cabrera Cano>>

El día 08 de Diciembre del año 2021

Sinodales (Nombre, adscripción y firma de cada uno):

1. Presidente:

Dra. Roxana Uri Miranda Labra.
Dpto. de Ciencias de la Salud, UAM-I.



2. Secretario:

Dra. Karina Pasten Hidalgo
Catedra CONACYT adscrita al Instituto Nacional de Pediatría.



3. Vocal 1:

Dr. José Antonio Velázquez Aragón.
Instituto Nacional de Pediatría.

José A. Velázquez A

4. Vocal 2:

Dr. Saúl Gómez Manzo
Lab. de Bioquímica Genética Instituto Nacional de Pediatría



Miembros del comité de tutores

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección del siguiente comité de tutores:

Directora externa: Dra. Rosa Angélica Castillo Rodríguez, la cual es investigadora CONACYT adscrita al Instituto Nacional de Pediatría.

Director interno: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, profesor titular adscrito al Departamento de Ciencias Biológicas y la Salud en el Laboratorio de Medicina Experimental y Carcinogénesis de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Asesora externa: Dra. Karina Pasten Hidalgo, la cual es investigadora CONACYT adscrita al Instituto Nacional de Pediatría.

Fuentes de financiamiento

Agradecimientos especiales al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la aprobación del proyecto #1059 del programa Investigadoras e Investigadores por México, de CONACYT así como a los Recursos Fiscales para Investigación – Instituto Nacional de Pediatría proyectos 37/2015 y 016/2019.

Dedicatoria y agradecimientos

Primeramente quiero agradecer a mis papás; por todo el amor, apoyo, consejos y ánimos que siempre me han brindado. Por siempre alentarme a ser una mejor persona.

En segundo lugar, agradezco a la Dra. Rosa Angélica Castillo Rodríguez, por haber aceptado dirigir el proyecto de maestría. Desde que conozco a la Dra. Castillo, siempre me ha brindado su apoyo, recomendaciones e invaluable amistad. Agradezco la confianza y paciencia que me ha tenido. Con su ejemplo he aprendido y me ha motivado a ser mejor estudiante y persona. También agradezco sus consejos y conversaciones, las cuales me han ayudado a entender que la vida a veces se puede tornar complicada y que las cosas no siempre salen como queremos pero que no hay que rendirnos y seguir luchando por lo que queremos. Finalmente quiero agradecerle por haber estado siempre al pendiente durante el tiempo que estuve enfermo.

Agradecimientos especiales al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, quien amablemente aceptó fungir como director interno. Siempre conté con su apoyo, observaciones y comentarios. Agradezco las recomendaciones dadas en sus clases y esa motivación que transmite para ser grandes y excelentes científicos. También agradezco sus consejos para recuperarme y estar bien de salud.

De igual forma, agradezco especialmente a la Dra. Karina Pasten Hidalgo por aceptar ser mi asesora. De igual forma siempre conté con su total apoyo, observaciones y sugerencias.

Finalmente, agradezco a mis mejores amigos Luis, Ricardo y Zuleyma por su apoyo y ánimos para no darme por vencido y continuar mi formación como científico.

Resumen

Antecedentes. Los citocromos P450 son una familia de enzimas cuya principal función es biotransformar xenobióticos como fármacos y moléculas orgánicas por ejemplo eicosanoides y colesterol. La expresión de estas enzimas puede ser regulada en distintas circunstancias fisiológicas o patológicas como la hipoxia tumoral, la cual consiste en una disminución de la difusión de oxígeno debido al crecimiento excesivo y la angiogénesis irregular propia del tumor. Recientemente demostramos que la hipoxia favorece la sobreexpresión del citocromo CYP2S1 en la línea celular de cáncer de hígado HepG2. Sin embargo, el papel de la hipoxia sobre la expresión de este citocromo en líneas más agresivas de cáncer de hígado es desconocido.

Objetivo. Determinar el efecto de la hipoxia sobre la expresión de CYP2S1 en células de cáncer de hígado en un modelo *in vitro*.

Material y métodos. Las líneas celulares HepG2, Hep3B y SNU423 fueron cultivadas en una cámara anaeróbica a 1% de O₂ durante 0, 6, 12, 18 y 24 horas. Se extrajo el ARN mediante TRizol y posteriormente se sintetizó el ADNc. Las muestras se analizaron por PCR-Tiempo Real mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Mediante PCR punto final se analizó la presencia de la secuencia nucleotídica de la posible isoforma alternativa de CYP2S1. Además, mediante un análisis bioinformático, se modeló la estructura tridimensional de ambas isoformas del citocromo CYP2S1.

Resultados. Los resultados preliminares sugieren que la hipoxia no tiene efectos sobre el ARNm de CYP2S1 en células Hep3B. Además proponemos que la hipoxia induce la transcripción de un ARNm que codifica para una isoforma alternativa de CYP2S1 en

células HepG2. Finalmente, el modelo informático obtenido sugiere que la estructura tridimensional de las 2 isoformas es similar.

Abstract

Background. Cytochromes P450 are a family of enzymes whose main function is to biotransform xenobiotics such as drugs and organic molecules like eicosanoids and cholesterol. The expression of these enzymes can be regulated in different physiological or pathological circumstances such as tumor hypoxia, which consists in a decrease of oxygen diffusion due to excessive growth and irregular angiogenesis. Recently, we demonstrated that hypoxia induces cytochrome CYP2S1 overexpression in the liver cancer cell line HepG2. However, the role of hypoxia on the expression of CYP2S1 in more aggressive cell lines of liver cancer is unknown.

Objective. Determine the effect of hypoxia on CYP2S1 expression in liver cancer cells in an *in vitro* model.

Material and methods. HepG2, Hep3B and SNU423 cell lines were cultured in an anaerobic chamber at 1% O₂ for 0, 6, 12, 18 and 24 hours. RNA was extracted using TRizol and subsequently, cDNA was synthesized. The samples were analyzed by Real Time PCR using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Using endpoint-PCR we analyzed the presence of the possible alternative isoform of CYP2S1. Furthermore, we predicted the tridimensional structure of CYP2S1 using a bioinformatic analysis.

Results: Preliminary results suggest that hypoxia has no effect on CYP2S1 mRNA in Hep3B cells. Furthermore, seems that hypoxia induces the transcription of the RNAm that codifies to an alternative isoform of CYP2S1 in HepG2 cells. Finally, we predicted that the tridimensional structures of the 2 isoforms are similar.

Índice

1. Introducción	14
1.1 Biotransformación	14
1.1.1 Fase 1	15
1.1.2 Fase 2	16
1.1.3 Fase 3	17
1.2 Generalidades de los citocromos P450	18
1.2.1 Características	19
1.2.2 Estructura.....	21
1.2.3 Mecanismo de acción	22
1.2.4 Citocromos en cáncer	24
1.2.5 Características generales del citocromo CYP2S1.....	26
1.2.5.1 Importancia de CYP2S1 en Cáncer	28
1.2.5.2 La vía de señalización del receptor de hidrocarburos arilo (AhR).....	28
1.3 Microambiente tumoral.....	31
1.3.1 Hipoxia tumoral	32
1.3.2 Vía de señalización de HIF	33
1.3.3 Hipoxia y su relación con CYP2S1.....	35
2. Hipótesis.....	38

3. Objetivo general.....	39
3.1 Objetivos específicos	39
4. Metodología.....	39
4.1 Cultivo de células HepG2, Hep3B, SNU423 y tratamientos en hipoxia	39
4.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	40
4.3 PCR Punto final.....	41
4.4 PCR en tiempo real	42
4.5 Inmunoprecipitación	45
4.5.1 Optimización del espectrómetro de masas (calibración externa)	45
4.5.2 Procesamiento químico de las muestras.....	46
4.5.3 Análisis espectrométrico	46
4.5.4 Búsqueda en PDB e identificación de proteínas	47
4.6 Análisis bioinformático de proteína.....	58
5. Resultados.....	48
5.1 Los niveles del ARNm de CYP2S1 no cambian en las células Hep3B en condiciones de hipoxia	48
5.2 La hipoxia favorece aumentos en la expresión del ARNm de la posible isoforma alternativa de CYP2S1	53
5.3. La hipoxia favorece la expresión de distintas proteínas que promueven la supervivencia celular	59

5.4 La estructura 3D de las isoformas de CYP2S1 es diferente.....	61
6. Discusión	63
7. Conclusiones.....	71
8. Apéndice	73
9. Referencias	74

Abreviaturas

CYP450	Citocromo P450
CYP2S1	Citocromo 2S1
AhR	Receptor de hidrocarburos arilo
HIF1- α	Factor Inducible por hipoxia 1 alfa
HIF1- β	Factor Inducible por hipoxia 1 beta
PHD	Protil hidroxilasas
VHL	Ubiquitín ligasa E3
FIH	Factor inhibidor de HIF
MDM2	Ubiquitín ligasa E3
P53	Proteína de 53kD
HSP90	Proteína de choque térmico de 90kD
ARNm	ARN mensajero
ADNc	ADN complementario
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa
2ME	2-metoxiestradiol
PPAR α	Receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa
HRE	Elemento de respuesta a hipoxia

1. Introducción

1.1 Biotransformación

Los organismos vivos a lo largo del tiempo han desarrollado diferentes estrategias para eliminar moléculas químicas ajenas al organismo como los xenobióticos (Beiras, 2018). (Campbell & Trump, 2017; Chambers, Day, Aboufarrag, & Kroon, 2019; Sedlaczek, 1988). Este conjunto de estrategias se denomina biotransformación y la mayor parte de estos procesos se lleva a cabo en el hígado en células denominadas hepatocitos (Beiras, 2018). Aunque también puede ocurrir en tejidos extrahepáticos, por ejemplo tejido adiposo, intestino, riñón y pulmón (Dekant, 2009). La biotransformación se define como un proceso bioquímico que consiste en la modificación de la estructura química de moléculas lipofílicas (solubles en grasa), que se absorben fácilmente del tracto gastrointestinal y otros sitios, convirtiéndolas en moléculas hidrofílicas (solubles en agua), que se excretan fácilmente por la orina o la bilis (Dekant, 2009; Koppel, Maini Rekdal, & Balskus, 2017). A través de la biotransformación, los xenobióticos, que suelen ser hidrofóbicos y poco polares, podrán ser eliminados (Dekant, 2009). La biotransformación se divide en 3 fases conocidas, la fase 1: donde suceden principalmente reacciones de oxidación. Fase 2: caracterizada esencialmente por reacciones de conjugación y la fase 3: donde se activan canales y transportadores que permiten la liberación de los metabolitos (Sheweita, 2000; Xu, Li, & Kong, 2005). La fase 1 y la fase 2 son reguladas por enzimas de la biotransformación; mientras que en la fase 3 se inducen y activan canales, y transportadores que permiten el transporte de los metabolitos resultantes (Almazroo, Miah, & Venkataramanan, 2017; Crettol,

Petrovic, & Murray, 2010; Dekant, 2009; Xu, Li, & Kong, 2005) (Figura 1). A continuación, se describen con mayor detalle cada una de estas fases.

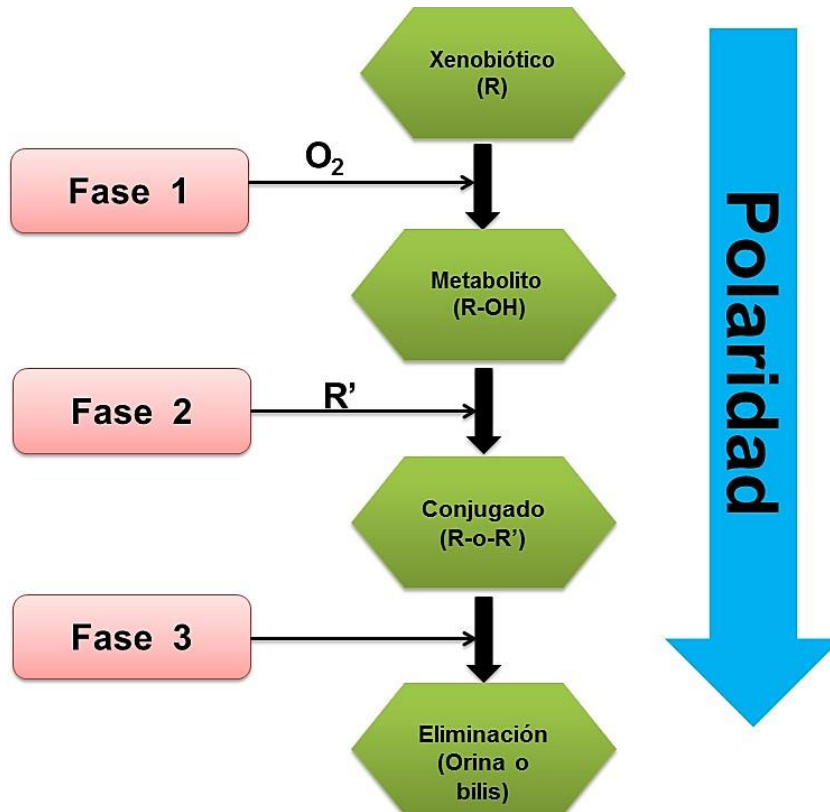


Figura 1. Representación esquemática de las fases de la biotransformación. En las reacciones de fase 1, el xenobiótico es oxidado generalmente por las enzimas del citocromo P450, aunque otras enzimas también pueden participar en este proceso. Durante la fase 2, el compuesto oxidado es conjugado y su polaridad aumenta. El conjugado resultante es apto para ser eliminado por el sistema excretor (fase 3) (Beiras, 2018).

1.1.1 Fase 1

Las enzimas de esta fase se localizan principalmente en el retículo endoplásmico (Beiras 2018). Estas enzimas catalizan diferentes reacciones no sintéticas entre las que se encuentran oxidación, reducción, hidrólisis y desalquilación (Crettol et al., 2010; Dekant, 2009). El proceso de oxidación es el más importante en esta fase y está mediado por enzimas denominadas monooxigenasas y dioxigenasas (Dancygier, 2010). Las enzimas de la fase 1 introducen a los llamados grupos funcionales, que modifican a la molécula anexándole un grupo —OH, —COOH, —SH, O— o —NH₂ (Phang-lyn, 2020). Por ejemplo las monooxigenasas agregan un átomo de oxígeno de una molécula de O₂ en el xenobiótico, mientras que el oxígeno restante se reduce a agua. Las dioxigenasas transfieren ambos átomos de una molécula de oxígeno al xenobiótico (Dancygier, 2010). La adición de los grupos funcionales aumenta la hidrosolubilidad de la molécula. Dentro de las enzimas de fase 1 podemos encontrar a la familia del citocromo P450 (más adelante se describirá a detalle las características e importancia de estas enzimas), monooxigenasas de flavina e hidrolasas de epóxidos (Almazroo et al., 2017; Dekant, 2009; Westhouse & Car, 2007). Por lo general, las modificaciones que llevan a cabo estas enzimas sirven como marca de reconocimiento para las enzimas de la fase 2.

1.1.2 Fase 2

Las reacciones de la fase 2 consisten en la agregación de una molécula endógena, la cual se introduce en un grupo funcional propio del xenobiótico o en el grupo funcional agregado en la fase 1 (Beiras, 2018). El conjugado resultante es una molécula altamente polar, lo que facilita su excreción a través de la vía biliar o renal (Beiras,

2018; Dancygier, 2010). Las reacciones de la fase 2 son diversas entre las que se encuentra la glucoronidación, acetilación, sulfatación, metilación y la agregación de glutatión (Jancova, Anzenbacher, & Anzenbacherova, 2010; Stanley, 2017). Las enzimas que llevan a cabo estas reacciones se denominan glucoronosiltransferasas de UDP, S-transferasas de glutatión, N-acetiltransferasas y metiltransferasa (Jancova et al., 2010; Stanley, 2017).

La glucoronidación es la principal reacción de la fase 2 de biotransformación ya que los glucorónidos resultantes son altamente polares y se excretan con rapidez por la vía biliar y la orina (Dakent, 2009). La sulfatación es la segunda reacción más importante seguida de la acetilación y por último la adición de glutatión (Almazroo et al., 2017; Dekant, 2009).

1.1.3 Fase 3

La fase 3 consiste en el transporte de metabolitos fuera de la célula y a través de las mismas. Este proceso se lleva a cabo por acción por proteínas de membrana que funcionan como transportadores. Dentro de las proteínas más importantes encontramos a la familia de los transportadores dependientes de ATP o transportadores ABC (del inglés ATP-binding cassette), estos transportadores pertenecen a una superfamilias de proteínas que importan o exportan una amplia gama de moléculas que incluyen aminoácidos, iones, azúcares, lípidos, xenobióticos y distintos fármacos (Stanley, 2017). También encontramos a los transportadores de soluto (SCL por sus siglas en inglés) (Rives, Javitch, & Wickenden, 2017). Estas proteínas se expresan en

diferentes órganos como hígado, riñón, intestino y cerebro, y algunos requieren de energía para llevar a cabo su función. Por ejemplo, los transportadores ABC dependen del consumo de energía en forma de ATP para expulsar la molécula de un lado de la membrana celular a otro, mientras que los SLC facilitan el paso de ciertos solutos como azúcares y aminoácidos a través de la membrana y transportan activamente otros solutos contra sus gradientes electroquímicos (Rives et al., 2017).

Por otra parte, aunque los xenobióticos pueden ser biotransformados en diferentes compartimentos celulares, por ejemplo, el citosol y las mitocondrias, en la mayoría de los casos la biotransformación se lleva a cabo por enzimas que se localizan en el sistema de membranas del retículo endoplásmico liso (Dancygier, 2010). Las monooxigenasas que principalmente se localizan en este organelo, pertenecen a la familia del citocromo P450 (Dancygier, 2010). Estas enzimas constituyen la principal defensa contra los xenobióticos, y las abordaremos con más detalle a continuación.

1.2 Generalidades de los citocromos P450

Durante los años de 1950, el descubrimiento y aislamiento de microsomas y las reacciones de oxigenasa fueron importantes para la investigación en el área de biología celular y enzimología, sobre todo para el descubrimiento de los citocromos P450. Durante esta década se reportó la presencia de un pigmento microsomal hepático que se unía al monóxido de carbono; este pigmento tenía un pico de absorbancia a 450 nm y estaba asociado con NADH, NADPH y el citocromo *b5*, sin embargo, no se pudo dilucidar más información sobre este pigmento sino años más tarde (Cook, Finnigan,

Cook, Black, & Charnock, 2016; Omura, 2011). Fue hasta el año de 1962 cuando se publicó el primer artículo en donde se mencionaba a los citocromos P450. En este artículo se describió la naturaleza hemoproteínica del pigmento microsomal hepático que se une al monóxido de carbono, este pigmento recibió el nombre de P450 (P = pigmento con absorbancia a 450 nm) y su forma inactiva solubilizada, se llamó pigmento con absorbancia a 420 nm (Guengerich, 2019; Omura, 2011). Posteriormente, en 1963 se reportó su actividad de oxigenasa e hidroxilasa (Omura, 2011). A partir de estos hallazgos, la investigación sobre el citocromo P450 y su papel en la biotransformación de fármacos, síntesis de hormonas esteroides y biotransformación de otras moléculas se extendió durante los siguientes años y actualmente se siguen investigando (Cook et al., 2016; Omura, 2011).

1.2.1 Características

Actualmente sabemos que los citocromos P450 son un grupo de enzimas que se localizan en la cara externa del retículo endoplásmico de los hepatocitos y también pueden localizarse en otros tejidos como la piel, riñón, músculo y pulmón. Se caracterizan por tener en su estructura un grupo hemo el cual contiene un átomo de hierro unido a un grupo tiol (-SH). Aunado a su estructura, las enzimas del citocromo P450 actúan como monooxigenasas que catalizan diversas reacciones de óxido- reducción. Su mecanismo de acción comprende una reacción de oxidación donde tiene como donadores de electrones al citocromo b5 y la CYP450 oxido-reductasa para activar el sitio catalítico (Cook et al., 2016; McDonnell & Dang, 2013; Omura, 2011) (Figura 2). Los citocromos P450 están presentes organismos como bacterias, hongos,

plantas y mamíferos (Parvez et al., 2016). En organismos eucariontes el peso molecular promedio de un citocromo abarca un rango de 50 kDa a 60 kDa.

En humanos, la familia de los citocromos P450 es muy diversa, y hasta el momento se han identificado 57 genes, los cuales se clasifican en 18 familias y 41 subfamilias (Nebert, Wikvall, & Miller, 2013; Nelson, 2013). La nomenclatura de estas enzimas se realiza según el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos (Nebert et al., 1987; Nebert et al., 2013; Nelson, 2013; Nelson et al., 2004). Las enzimas que comparten una identidad de aminoácidos igual o mayor al 40% se asignan a una familia particular, la cual se designa por un número arábigo, mientras que las que comparten una identidad de aminoácidos igual o mayor al 55% constituyen una subfamilia particular, la cual se designa por una letra (Nebert et al., 1987; Nebert et al., 2013; Nelson, 2013; Nelson et al., 2004) Por ejemplo, tanto la esterol 27-hidroxisilasa como la 25-hidroxi-D 1 α -hidroxilasa se asignan a la familia CYP27 porque comparten una identidad de secuencia superior al 40% (Nebert et al., 2013). Sin embargo, la esterol 27-hidroxisilasa se asigna a la subfamilia "A" y la 25-hidroxi-D3 1 α -hidroxilasa a la subfamilia CYP27 "B" de CYP27 porque la identidad de sus secuencias de proteínas es menor al 55% de similitud. Si se descubre una enzima adicional que comparte más del 55 por ciento de identidad con el esterol 27-hidroxisilasa, entonces se llamaría CYP27A2 (Nebert et al., 2013).

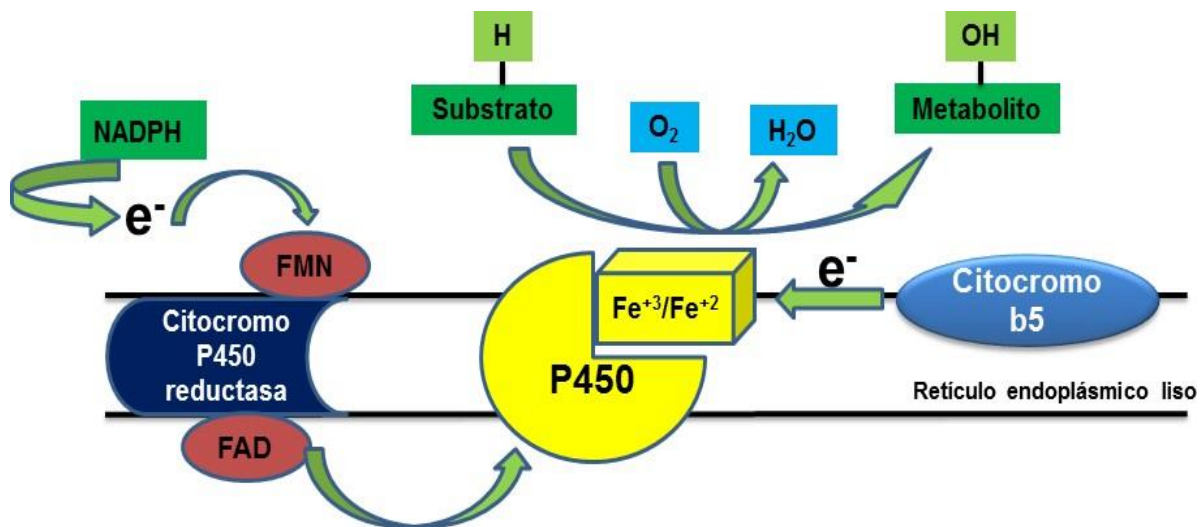


Figura 2. Mecanismo de acción del CYP450. Los citocromos P450 se encuentran en la cara externa del retículo endoplásmico liso y su mecanismo de acción comprende una reacción de oxidación donde tiene como donadores de electrones al citocromo *b5* y la CYP450 oxido-reductasa para activar el sitio catalítico; una vez activado, se une el sustrato donde el CYP450 agrega un átomo de oxígeno dando como resultado una molécula más polar (Pandian, Sathishraj, Djanaguiraman, Prasad, & Jugulam, 2020).

1.2.2 Estructura

Otro aspecto importante de este grupo de enzimas, es su estructura característica (Manikandan & Nagini, 2018). Como se mencionó anteriormente, los citocromos son hemoproteínas que contienen entre 400 y 500 residuos de aminoácidos y un solo grupo prostético (un átomo de hierro) (Manikandan & Nagini, 2018; Meunier, de Visser, & Shaik, 2004). Estas proteínas son hemoproteínas de tipo *b*, lo que significa que contienen una estructura de anillo protoporfirina IX (Cook et al., 2016; Meunier et al., 2004). Un anillo de porfirina es una molécula plana hidrófoba que contiene cuatro subunidades de pirrol conectadas por puentes de metino (Figura 3). Esta estructura

produce cuatro átomos de nitrógeno orientados hacia adentro que coordinan un átomo de hierro central reducido (Fe^{2+}). El átomo de hierro tiene cinco posibles enlaces de coordinación, cuatro de los cuales están unidos a los átomos de nitrógeno circundantes y uno de los cuales está unido a un eje ligando tiol (Cook et al., 2016; Manikandan & Nagini, 2018). El ligando tiol se forma por la presencia del residuo de cisteína 357, el cual es un residuo completamente conservado en casi todas las enzimas P450 (Cook et al., 2016). La estructura de hemoproteína y la presencia de un grupo prostético, le permiten a estas enzimas realizar su mecanismo de acción.

1.2.3 Mecanismo de acción

Los citocromos P450 catalizan distintas reacciones dependientes e independientes de NADPH, citocromo P450 reductasa y oxígeno molecular (P. Bui, Imaizumi, Beedanagari, Reddy, & Hankinson, 2011; Guengerich, 2018; Manikandan & Nagini, 2018). Las reacciones dependientes de NADPH, citocromo P450 reductasa y oxígeno molecular incluyen la monoxigenación, hidroxilación y epoxidación siguiendo la estequiometría que se muestra en la ecuación de la Figura 4 (P. H. Bui, Hsu, & Hankinson, 2009; Guengerich, 2018; Manikandan & Nagini, 2018). Por su parte, las reacciones independientes de NADPH, citocromo P450 reductasa y oxígeno molecular incluyen oxidaciones de un electrón, peroxidaciones e isomerizaciones (P. Bui et al., 2011; P. H. Bui et al., 2009).

El mecanismo de acción de los citocromos está acoplado a un sistema de transporte de electrones y de oxígeno molecular (Guengerich, 2018; Manikandan & Nagini, 2018) y

siguen un ciclo de reacción bien conocido. La unión del sustrato promueve un aumento en el potencial redox del grupo hemo de tipo *B* lo que facilita la transferencia de electrones y la subsecuente activación del oxígeno (Lewis & Pratt, 1998; Meunier et al., 2004). Cuando el sistema está completamente acoplado, este funciona de manera eficiente favoreciendo un equilibrio estequiométrico. Cuando no está acoplado, se producen especies reactivas de oxígeno como H_2O_2 u O^- los cuales pueden producir radicales libres tóxicos (Meunier et al., 2004; Omura, 2011).

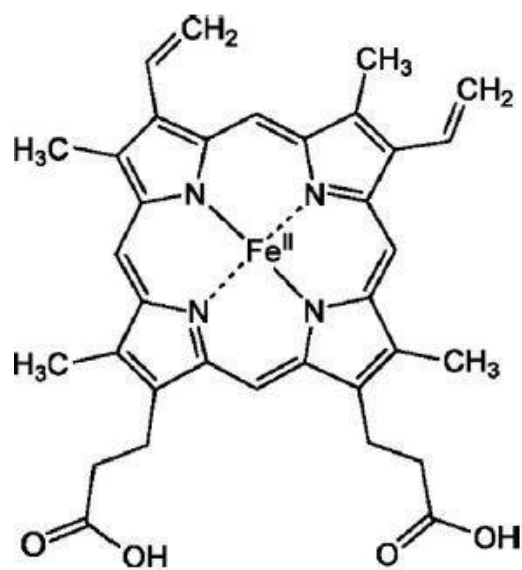


Figura 3. Estructura de un grupo hemo. Se muestra la estructura del anillo de protoporfirina con un átomo de hierro unido centralmente. Imagen tomada de (Cook et al., 2016; Meunier et al., 2004).



Figura 4. Ecuación general de la reacción del citocromo P450. En esta imagen se observa la estequiometría de la reacción del citocromo P450. Además, se observa que tiene como cofactores al NADH y NADPH (Guengerich, 2018).

1.2.4 Citocromos en cáncer

El cáncer es una patología que se caracteriza por la proliferación descontrolada de células anormales, teniendo como consecuencia la formación de tumores (Hanahan & Weinberg, 2011). Además de la proliferación aberrante, las células cancerosas presentan ciertos elementos que lo caracterizan y definen como: (1) la capacidad de evadir las señales que suprimen el crecimiento y la proliferación; (2) invasión y metástasis. La invasión hace referencia a la migración y penetración de las células en tejidos vecinos, mientras que la metástasis implica la capacidad de la célula de viajar a través del sistema linfático y/o sanguíneo e invadir órganos y tejidos distantes; (3) inmortalidad replicativa, es decir, se dividen de manera indefinida; (4) angiogénesis; (5) resistencia a la muerte celular. Se han propuesto algunas otras características las cuales refuerzan las ya mencionadas, como la inestabilidad genómica (6) donde a través de la acumulación de mutaciones puede desencadenar y acelerar el desarrollo y la progresión tumoral. El sistema inmune y los procesos inflamatorios también juegan un papel importante en la carcinogénesis (7) (Figura 5) (Cree & Charlton, 2017; Hanahan & Weinberg, 2011). Muchos fármacos antineoplásicos se han desarrollado para inhibir alguno de los procesos antes mencionados, sin embargo, la resistencia a fármacos sigue siendo un problema para la quimioterapia (Cree & Charlton, 2017; Vasan, Baselga, & Hyman, 2019).

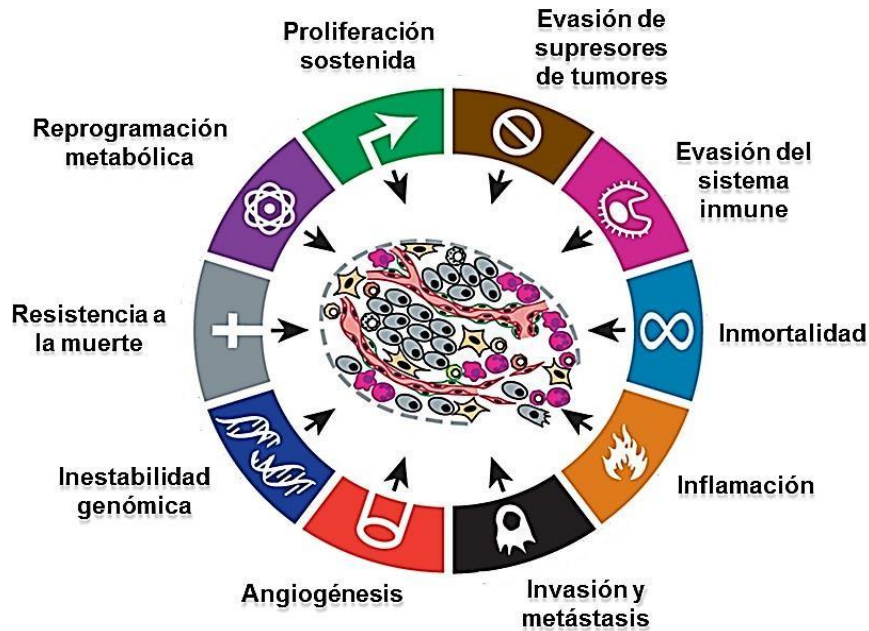


Figura 5. Características distintivas del cáncer. En la imagen se observan los diferentes procesos que distinguen a una célula cancerosa, donde la proliferación descontrolada sigue siendo la principal (Hanahan & Weinberg, 2011).

Debido al papel de los citocromos P450 en la bioactivación e inactivación de carcinógenos y de fármacos antineoplásicos, estas enzimas son clave para el manejo del cáncer (Rodríguez-Antona & Ingelman-Sundberg, 2006). En algunos tipos de cáncer como el meduloblastoma, la hipoxia induce una baja expresión de los citocromos CYP2B6, CYP3A4 y CYP3A5 lo que promueve una resistencia a los fármacos antineoplásicos ciclofosfamida e isofosfamida (Valencia-Cervantes et al., 2019). Por otro lado, la sobreexpresión de otros citocromos como CYP1A1, favorece la proliferación y progresión del cáncer de mama (Rodríguez & Potter, 2013). Otro

miembro de los citocromos P450 que se expresa en cáncer es CYP2S1; sin embargo, el papel en la progresión de la enfermedad sigue siendo poco clara (Downie et al., 2005; Kumarakulasingham et al., 2005; Y. Li et al., 2020; Rivera, Saarikoski, & Hankinson, 2002; Tan et al., 2011)

1.2.5 Características generales del citocromo CYP2S1

Este citocromo pertenece a la familia 2, subfamilia S. El gen en humanos se localiza en el cromosoma 19q, tiene un tamaño de 14kb y contiene 9 exones (Rylander et al., 2001). La proteína que codifica contiene 504 aminoácidos con una masa molecular aproximada de 55.8 kDa (Figura 6) (Rylander et al., 2001; Rivera et al., 2002). Además, en 2004, Ota y colaboradores reportaron una secuencia completa de ADNc la cual pertenece a una isoforma alternativa de CYP2S1, esta secuencia cuenta con 10 exones, donde el exón 9 es más corto que el exón 9 de la secuencia canónica. La proteína que codifica la isoforma alternativa contiene 564 aminoácidos con una masa molecular aproximada de 62 kDa (Ota et al., 2004). Sin embargo, las investigaciones que hasta el momento se han realizado sobre CYP2S1, solo se han enfocado en la isoforma canónica de este citocromo.

El citocromo CYP2S1 puede actuar como peroxidasa, teniendo como cofactores radicales libres y los hidroperóxidos de ácidos grasos (P. Bui et al., 2011; P. H. Bui et al., 2009). La función de CYP2S1 es la de biotransformar algunas sustancias endógenas como el ácido-trans-retinoico el cual regula procesos de desarrollo, diferenciación y homeostasis (Deb & Bandiera, 2010; Smith et al., 2003). También

participa en la regulación de moléculas inflamatorias como el ácido araquidónico, el ácido linoleico, las prostaglandinas y tromboxanos (P. Bui et al., 2011; Deb & Bandiera, 2010; Smith et al., 2003).

Exon	Nucleotide Sequence	Protein Sequence
1	atgggggacccggcaccctgggagctgctgctggcgctggcctgctctgctgctgacgctgggctgtccgggaccaggcccgaggc	M E A T G T W A L L L A L A L L L L L L T L A L S G T R A R G
91	caactgccccggggccccgctaccactgctgggaacctcctgcagctacggccggggcctgtattcagggtcatcgggtg	H L P P G P T P L P L L G N L L Q L R P G A L Y S G L M R L
181	agtAagaagtagcggaccggtgttaccatctacctgggaccctggcgcctgtggtgctgctggttgggacaggcctgtgctgggaggcc	S K K Y G P V F T I Y L G P W R P V V V L V G Q E A V R E A
271	ctgggaggtcaggctyaggagttcagcggccgggaaccgtagcagatgctgggaaggacttttgatggccatgggtttctctccaac	L G G Q A E E F S G R G T V A M L E G T F D G H G V F F S N
361	ggggagcggctggaggcagctgaggaagtttaccatgctgctctcgggacccctggcctggggaagcagagaagggcaggagctgatccag	G E R Q L R K F T M L A L R D L G M G K R E G E E L I Q
451	gcccgggccccggtgctggtggagacattccaggggccagaaggacgccattcgatccctcctgctgctggcccaggccacctccaac	A E A R C L V E T F Q G T E G R P F D P S L L L A Q A T S N
541	gtagctgctccctctcttcttggcctcctctctctatgaggataaggagttccaggcctggtccgggacagctggtggtaccctctg	V S T L A A F T V R Q V Q Q H Q G N L D A S G P A R D T L
631	ggagtcagctcccagggggctcagacctacagatgttctcctggttctcggggccctgccagggccccacaagcagctcctccaccac	G V S S Q G G Q T Y E M F S W F L R P L P G P H K Q L L H H
721	gtcagcacttggctgctccttcacagtcaggcaggtgtagcagcaccagggaacctggatgcttggggccccgcaagctgactgtgat	V S T L A A F T V R Q V Q Q H Q G N L D A S G P A R D T L
811	gccttctctgtaagatggcagcaggaacaaaaccaggccacagaattcaccacaagaacatgctgatgacagtcatttatttctg	A F L L X M A Q E E Q N F G T E P T N K N M L M T V I Y L L
901	tttctggggacgatgacggtcagcaccaggtcgctataccctcctgctcctgatgaataccctcatgtccaaaagtggtggtgag	F A G T M T V S T T V G Y T L L L L M K K Y P H V Q K W V R E
991	gagctgaatcgggagctggggctggccaggcaccaggcctaggggaccctaccgctccttacaccgacgctgtctgatgaggc	E L N R E L G A G Q A P S L G D R T R L P Y T D A V L H E A
1081	cagcggctgctggcgctggtgcccattgggaataccccaccctcctcagcggaccaccggcttcggagggtacaccctgccccaggccag	Q R L L A L V P M G I P R T L M R T T R F R G Y T L P Q G T
1171	gaggtcttccccctccttggctccatcctgcatgacccccacatcttcaagcaccagaagagttcaaccagacogtctcctggatgca	E V F P L L G S I L H D P N I F K H P E E F N P D R P L D A
1261	gatggacggttcagggaagcagggcttctgctccttctccttagggaagcgtgctgctcctggaggggcctggcaaaagcggagctc	D G R P R K H E A F L P P S L G K R V C L G E G L A K A E L
1351	ttcctcttcttaccaccatctacaagccttctcctggagagccctgcccgggacacctgagcctcaagcccaccgctcagtggt	F L P F T T I L Q A F S L E S P C P P D T L S L K P T V S G
1441	cttttcaacatccccagccttccagctgcaagtcctgctccactgaccttcaactccaccacgacagaccagatgaaggaggcaacttgg	L F N I P F A F Q L Q V R P T D L H S T T Q T R *
1531	aagtggtgggtgcccgggagcgtgctccagcctcaacagtgggcatggacaggggttaatgctccagagtgctacactgaggcagccac	
1621	atttacacgctgcaagttgttccggagctgctccacggccacacgctcactgactcatgctgctaaagatgcacaaccgacacccc	
1711	atacacaactacaaggccacaagcaactgctgggttagcttccacagacataaatatagtcctcatcgaatcacaagcacatagcca	
1801	ggtaaccaccacaactccccctggatctgagcaccacacgtgggagctgctgctgctcacttcacaagccacagaaacggccacacatgtcca	
1891	cagctcacagcctctcctcattcaatgaactctcagtgctcctgctcctgggtgcttggcagagggcaacagcagatgccctctcgggggtca	
1981	tgcccccagagactgtogctgtctatggcccaactcatgctcctctctctggctacaccactctcccagcctgtgacacagatgtcc	
2071	acacacccccaccacttgctccacagctaccccagtcagatctgctcctggctccccagagtatcttcccctgagacacgcccctcc	
2161	ccagaggcagctccccagcacccttgcgaactgcagcctcagtcaccctttttaagacacatgagctccaataccocgtctaaaa	
2251	aaaaaaaa	

Figura 6. Secuencias de nucleótidos codificantes y de aminoácidos de CYP2S1. En esta imagen se observan los exones y lo nucleótidos que corresponden a cada exón. Además, se observan los codones para cada aminoácido de la proteína canónica. Imagen tomada de (Rylander, Neve, Ingelman-Sundberg, & Oscarson, 2001).

Por otra parte, CYP2S1 puede bioactivar el profármaco antineoplásico AQ4N el cual está dirigido a tumores hipóxicos. También regula la biodesactivación del fármaco antineoplásico 2-(4-aminofenil) benzotiazol, promoviendo resistencia a fármacos en células de cáncer colorectal. Además, biotransforma moléculas implicados en procesos carcinogénicos como el benzopireno y el naftaleno (P. Bui et al., 2011; Karlgren, Miura, & Ingelman-Sundberg, 2005; Nishida, Lee, & de Montellano, 2010; Tan et al., 2011). La sobreexpresión de este citocromo está relacionada con procesos carcinogénicos, como se menciona a continuación.

1.1.1.1 Importancia de CYP2S1 en cáncer

Se ha observado que, en diferentes tipos de cáncer de origen epitelial como cáncer de ovario, mama, colón, pulmón, tráquea y tiroides, CYP2S1 está altamente expresado. También se ha observado una alta expresión de este citocromo en líneas celulares cancerosas de pulmón e hígado como A549 y HepG2 (Rivera et al., 2002; Rivera et al., 2007). Esta sobreexpresión se asocia con resistencia a los fármacos antineoplásicos y con un mal pronóstico (Downie et al., 2005; Y. Li et al., 2020; Rivera et al., 2002; Tan et al., 2011). La sobreexpresión del CYP2S1 puede estar relacionada con alteraciones en la vía de señalización que lo inducen, como la vía del receptor de hidrocarburos arilo (AhR por sus siglas en inglés) (Hankinson, 2016; Y. Li et al., 2020; Rivera et al., 2002) y la cual describimos a detalle a continuación.

1.1.1.2 La vía de señalización del receptor de hidrocarburos arilo (AhR)

El receptor de hidrocarburos arilo es un factor de transcripción citosólico que pertenece a la familia de proteínas con dominios hélice-bucle-hélice básica (bHLH) / PAS (Hughes, Guttenplan, Marcus, Subbaramaiah, & Dannenberg, 2008; Larigot, Juricek, Dairou, & Coumoul, 2018). Este receptor se puede unir a distintas estructuras como compuestos no aromáticos y no halogenados (Xu et al., 2005). Además, es activado por xenobióticos como el benzo(a)pireno y el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD por sus siglas en inglés) (Hankinson, 2016; Y. Li et al., 2020; Rivera et al., 2002; Rivera et al., 2007). Cuando el receptor AhR está inactivo, se encuentra principalmente en el citoplasma y se asocia con un complejo de proteínas acompañantes como la proteína de choque térmico 90 (HSP90), proteína 2 asociada al virus de la hepatitis B y la tirosina cinasa Src (Hughes et al., 2008; Larigot et al., 2018) (Figura 7). Estas proteínas mantienen el correcto plegamiento del AhR, permiten un adecuado reconocimiento del ligando por parte del receptor y, posteriormente, aseguran indirectamente un eficaz efecto transcripcional (Larigot et al., 2018).

Una vez que el ligando ha ingresado al citoplasma, se une con el receptor de hidrocarburos arilo, y éste se transloca al núcleo donde forma un heterodímero con el translocador nuclear del receptor de hidrocarburos arilo (ARNT por sus siglas en inglés). De esta manera se une a secuencias en el ADN conocidas como elementos de respuesta a xenobióticos para inducir la transcripción de sus genes blanco (Hankinson, 2016) (Figura 7). La evidencia de que CYP2S1 es blanco del AhR proviene de los estudios realizados por Rivera y colaboradores, (Rivera et al., 2002), quienes incubaron células de hepatoma de ratón (Hepa-1) con 10mM de TCDD durante 6h y observaron

un incremento en los niveles de ARNm de CYP2S1. Además establecieron que la transcripción de CYP2S1 puede ser activada por la vía del receptor AhR ya que los niveles de ARNm de CYP2S1 no aumentaron en presencia de TCDD en células Hepa-1 que no expresan AhR, ARNT y que son deficientes para elementos de respuesta a xenobióticos (Rivera et al., 2002). Por su parte, Li y sus colaboradores utilizando un modelo de cáncer de tiroides también demostraron que el receptor AhR estimula la expresión de CYP2S1 (Y. Li et al., 2020). Existen algunos otros mecanismos además de la vía de señalización del AhR, que pudieran regular la expresión de CYP2S1, uno de ellos es la hipoxia que forma parte del microambiente de varios tumores (Cabrera- Cano et al., 2021; Rivera et al., 2007).

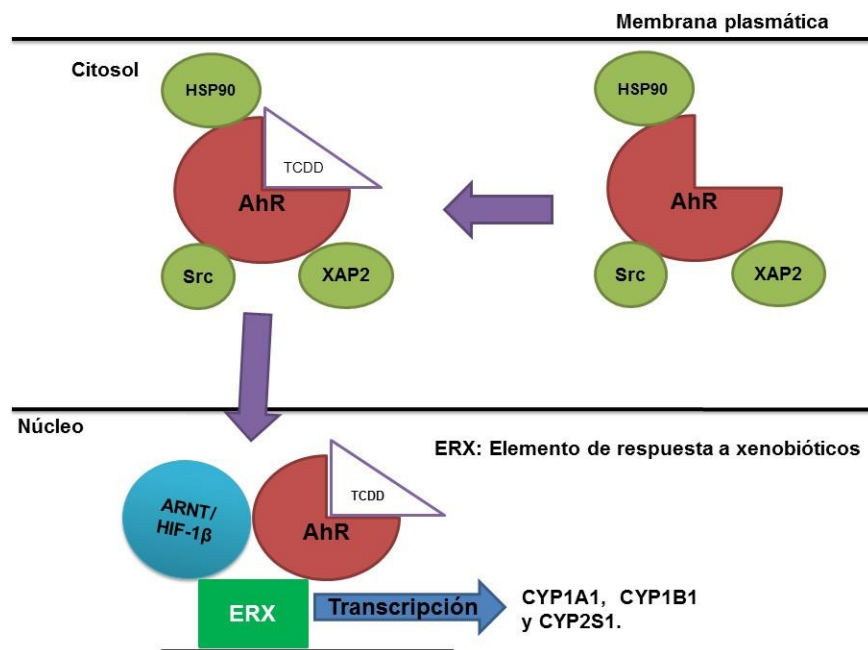


Figura 7. Vía de señalización del receptor AhR. Cuando Ahr está desactivado, está asociado a diferentes proteínas como la proteína de choque térmico 90 (HSP90), proteína 2 asociada al virus de la hepatitis B y la tirosina cinasa (Src) las cuales mantienen su estabilidad y conformación. Algunos ligandos como el TCDD, se unen y activan al receptor AhR. Este se transloca al núcleo donde forma un heterodímero con la proteína ARNT/HIF1- β . Este heterodímero se une a secuencias en el ADN conocidas como elementos de respuesta a xenobióticos para iniciar la transcripción de sus genes blanco entre los que se encuentra el CYP2S1 (Larigot et al., 2018).

1.2 Microambiente tumoral

El microambiente tumoral consiste en diferentes componentes y se puede clasificar en 2 tipos: celular y químico (Ivey, Bonakdar, Kanitkar, Davalos, & Verbridge, 2016; Petrova, Annicchiarico-Petruzzelli, Melino, & Amelio, 2018). Dentro del microambiente celular, se pueden encontrar una gran variedad de componentes, como las células madre cancerosas las cuales tienen la capacidad de autorrenovarse e impulsar la tumorigénesis, células inmunes circundantes, vasos sanguíneos, matriz extracelular, los linfocitos, células inflamatorias derivadas de la médula ósea (Arneth, 2019) y fibroblastos asociados al tumor (CAF por sus siglas en inglés). Los CAF son atraídos por las grandes cantidades del factor de crecimiento de fibroblastos que secretan las células cancerosas y tienen características totalmente diferentes a los fibroblastos normales, favoreciendo la migración de células cancerosas al secretar grandes cantidades de metaloproteinasas tipo 2 (MMP-2 por sus siglas en inglés) (Arneth, 2019; Farc & Cristea, 2021; Petrova et al., 2018; Whiteside, 2008). Además, otras células

encontradas en el microambiente celular, son los macrófagos asociados al tumor (TAM por sus siglas en inglés): estos se reprograman para inhibir las funciones de los linfocitos mediante la liberación de citocinas inhibitoras como IL-10, prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (Whiteside, 2008), citosinas inflamatorias y las quimiocinas (Arneth, 2019; Farc & Cristea, 2021). Dentro del microambiente químico podemos destacar moléculas como el lactato, el cual es liberado a consecuencia de la reprogramación en el metabolismo energético de las células cancerosas y favorece una disminución en el pH (Hanahan & Weinberg, 2011). La reprogramación en el metabolismo energético se refiere a que la energía en forma de ATP proviene principalmente de la glucólisis, limitando así la producción la ruta del ciclo de Krebs, la fosforilación oxidante, la cadena de electrones y en lo subsecuente la producción de ATP mitocondrial (Hanahan & Weinberg, 2011). Lo anterior puede ser causado por la sobreactivación de la vía de señalización mediada por PI3K/AKT o por la hipoxia favoreciendo la supervivencia y malignidad de las células (Ivey et al., 2016; Petrova et al., 2018; Ward & Thompson, 2012). La reprogramación en el metabolismo energético puede estar influenciada por la hipoxia tumoral, condición que es un sello distintivo del microambiente tumoral (Ivey et al., 2016; Jin & Jin, 2020; Petrova et al., 2018).

1.3.1 Hipoxia tumoral

La hipoxia es una disminución en las presiones de oxígeno ya sea por una disminución en el aporte o por una alta demanda de oxígeno (Höckel & Vaupel, 2001; McKeown, 2014). La respuesta celular al estrés hipóxico está regulada principalmente por una

familia de factores de transcripción denominada factor inducible por hipoxia (HIF por sus siglas en inglés), donde la subunidad 1- α es la más estudiada y su mecanismo de acción es sensible a oxígeno.

1.3.2 Vía de señalización de HIF

Los factores de transcripción HIF forman una familia de proteínas con dominios hélice-bucle-hélice básica (bHLH) / PAS que se encargan de regular la adaptación celular al estrés hipóxico (Gu, Moran, Hogenesch, Wartman, & Bradfield, 1998; Wang, Jiang, Rue, & Semenza, 1995; Zhu et al., 2016). Esta familia está formada por 3 miembros α : HIF-1 α , HIF-2 α también conocido como proteína endotelial de dominio PAS 1 (EPAS1) y HIF-3 α ; y un miembro β (HIF-1 β) también conocido como translocador nuclear del receptor de hidrocarburos arilo (ARNT) (Gu et al., 1998; Tian, McKnight, & Russell, 1997; Wang et al., 1995; Wang & Semenza, 1995). Las subunidades α se unen con la subunidad β para formar heterodímeros activos que se unen al ADN, donde el heterodímero más estudiado es el que se forma entre HIF-1 α y HIF-1 β (HIF-1 α /HIF-1 β) (Gu et al., 1998; Hara, Hamada, Kobayashi, Kondo, & Imura, 2001; Tian et al., 1997; Wang et al., 1995).

En condiciones de normoxia, las subunidades HIF α son reguladas por modificaciones postraduccionales las cuales permiten la degradación de las proteínas. Estas modificaciones son principalmente hidroxilaciones en residuos de prolina, que se llevan a cabo por la actividad de enzimas denominadas prolihdroxilasas (PHD) (Epstein et al., 2001). En mamíferos se han identificado 3 isoformas de estas enzimas PHD1, PHD 2 y PHD 3 las cuales hidroxilan a HIF-1 α (Epstein et al., 2001). Sin embargo, se ha

reportado que la PHD2 es la más importante en la hidroxilación y degradación de HIF-1 α (Berra et al., 2003). HIF-1 α también es hidroxilado en residuos de asparagina por el factor inhibidor de HIF (FIH por sus siglas en inglés). Estas hidroxilaciones permiten que HIF1- α sea reconocido por el complejo E3 ubiquitina ligasa-Von Hippel-Lindau (VHL) para marcarlo y así ser degradado vía proteasoma (Figura 8). Durante la hipoxia, la actividad de PHD está limitada por la disponibilidad de oxígeno, lo que lleva a la estabilización de HIF1- α . En consecuencia, HIF1- α se transloca al núcleo y forma un heterodímero con el ARNT (también conocido como HIF1- β), este complejo se une a secuencias del ADN conocidas como elementos de respuesta a hipoxia para iniciar la transcripción de genes implicados en angiogénesis, proliferación, metabolismo y metástasis (Samanta & Semenza, 2018) (Figura 8).

En tumores sólidos la hipoxia está relacionada con la resistencia a fármacos, la malignidad y progresión tumoral además de un mal pronóstico (Höckel & Vaupel, 2001; Samanta & Semenza, 2018; Semenza, 2008; Valencia-Cervantes et al., 2019). Los procesos antes mencionados podrían estar relacionados con la sobreexpresión del CYP2S1, ya que la hipoxia estimula la expresión de CYP2S1 (Cabrera-Cano et al., 2021; Rivera et al., 2007)

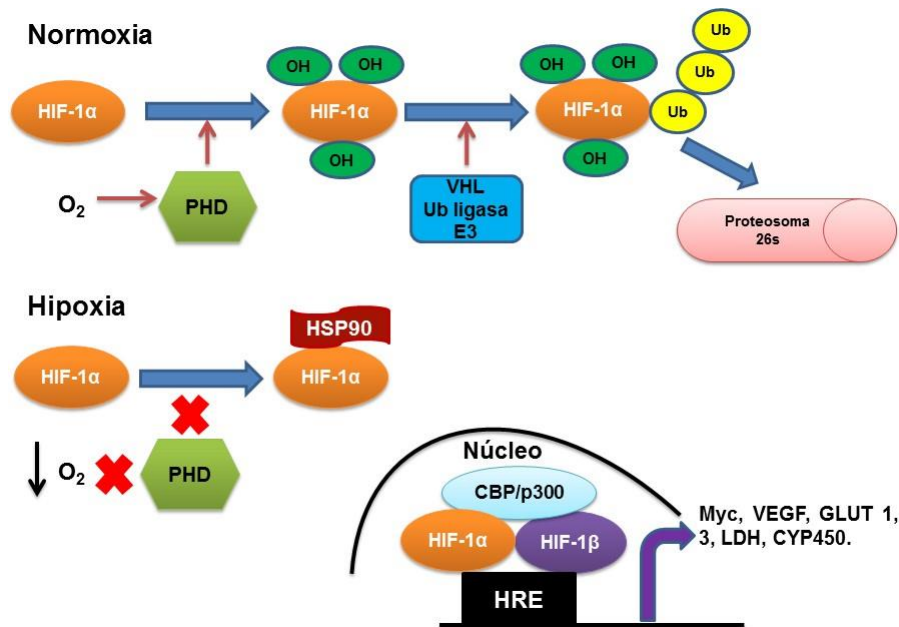


Figura 8. Mecanismo de activación de HIF1- α . En condiciones de normoxia HIF1- α se degrada vía proteosoma. La enzima proil hidroxilasa (PHD) hidroxila a HIF en residuos de prolina mientras que el factor inhibidor de HIF (FIH) hidroxila a HIF en un residuo de asparagina. HIF1- α es ubiquitinado por la proteína VHL y posteriormente degradado. En condiciones de hipoxia, la PHD está inactiva, HIF se estabiliza en el citoplasma e interactúa con la proteína de choque térmico 90 (HSP90). HIF se transloca al núcleo donde forma un heterodímero activo con HIF1- β y con cofactores transcripcionales como CBP/P300; este dímero se une a elementos de respuesta hipoxia (HRE) en el ADN e inicia la transcripción de sus genes blanco (Yu, Tang, & Sun, 2017).

1.3.3 Hipoxia y su relación con CYP2S1

Rivera y sus colaboradores utilizando células de cáncer de hígado de ratón denominadas Hepa-1 sometidas a hipoxia (1% de oxígeno) por 18 h demostraron que el

ARNm de CYP2S1 aumentó 12 veces con respecto a los controles y que los niveles de proteína también aumentaron. Describieron que el gen de *CYP2S1* en estas células tiene elementos de respuesta a hipoxia y observaron un efecto similar en células HepG2 sometidas a hipoxia (Rivera et al., 2007). En nuestro grupo de trabajo recientemente reportamos que en células HepG2, la hipoxia induce un aumento en la expresión del ARNm de CYP2S1 (Figura 9-A) y de la proteína también (Figura 9-B) (Cabrera-Cano et al., 2021).

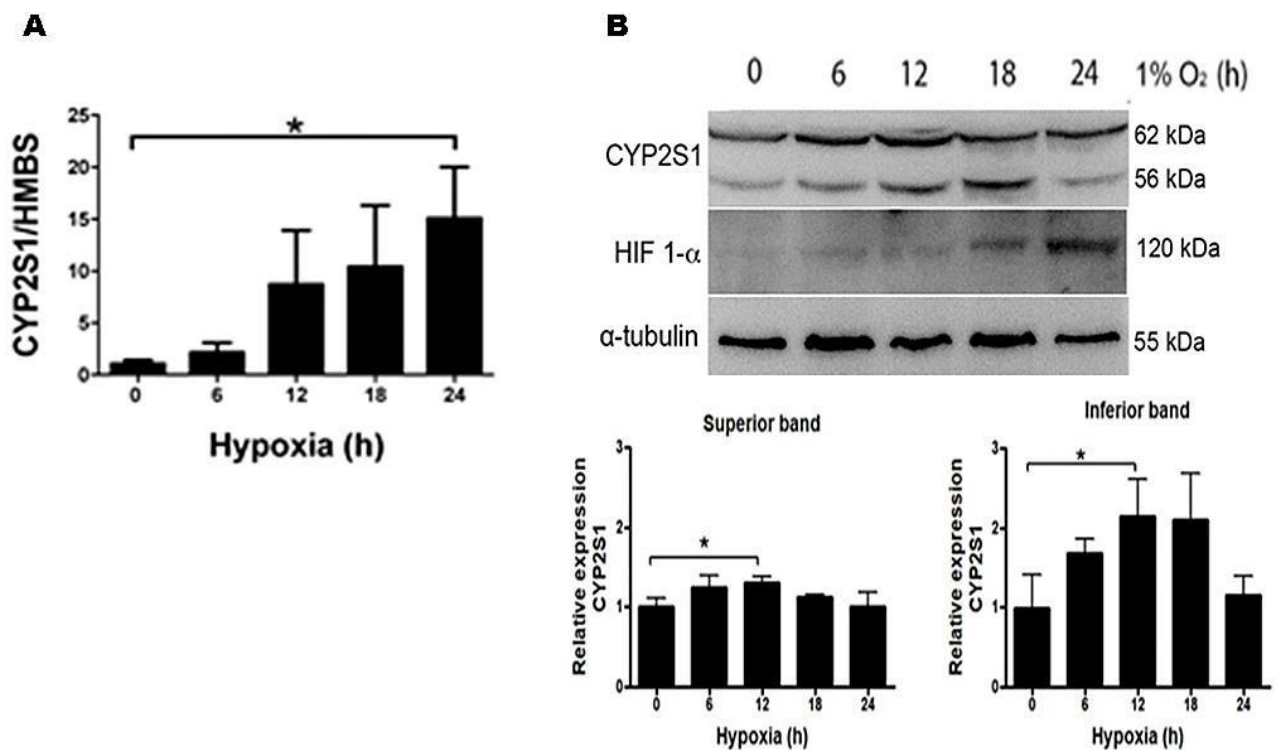


Figura 9. Sobreexpresión de CYP2S1 en células HepG2 bajo condiciones de hipoxia. A, mediante ensayos de PCR en tiempo real demostramos que el ARNm aumentó su expresión en condiciones de hipoxia, siendo significativo a las 24h. B, de manera similar los niveles de proteína aumentaron en hipoxia, siendo significativo a las

12h. Del mismo modo la banda adicional con un peso aproximado de 62 kDa también se vio afectada por la hipoxia a las 12h (Cabrera-Cano et al., 2021).

Sin embargo, se desconoce si el comportamiento observado en las células HepG2 se presenta en líneas celulares más agresivas como las células Hep3B y SNU423. Las células HepG2 y Hep3B son las más utilizadas como modelo experimental para estudiar el cáncer de hígado; si bien ambas líneas celulares derivan de cáncer de hígado, hay diferencias bien establecidas entre ambas (Qiu et al., 2015). Por ejemplo, las células HepG2 derivan de un hepatoblastoma primario mientras que las células Hep3B derivan de un carcinoma hepatocelular primario (Qiu et al., 2015). Además, ambas líneas presentan una diferencia en la respuesta a algunos fármacos antineoplásicos como el dasatinib y doxorubicina donde las células HepG2 son más resistentes que las células Hep3B, por su parte las células Hep3B son más resistentes al cisplatino que las células HepG2 (Yan Li, Farmer, Yang, & Martin, 2016; Qiu et al., 2015). Además, un análisis de perfil de proteoma y secretoma demostró que las células Hep3B presentan características relacionadas con los fibroblastos y proteínas mesenquimales indicativas de la transición epitelio-mesénquima (Slany et al., 2010). Por su parte, las células SNU423, son células derivadas de un carcinoma hepatocelular de grado III/IV, son moderadamente diferenciadas y son resistentes al tratamiento con Regorafenib, Lenvatinib y Cabozanitib (Rodríguez-Hernández et al., 2020).

Resultados preliminares de nuestro grupo sugieren que hay una expresión diferencial de CYP2S1 en estas líneas celulares al incubarlas en condiciones hipóxicas. Por ensayos de western blot se observó la presencia de una banda adicional que podría

corresponder a una isoforma alternativa de CYP2S1 (Cabrera-Cano et al., 2021). (Figura 10).

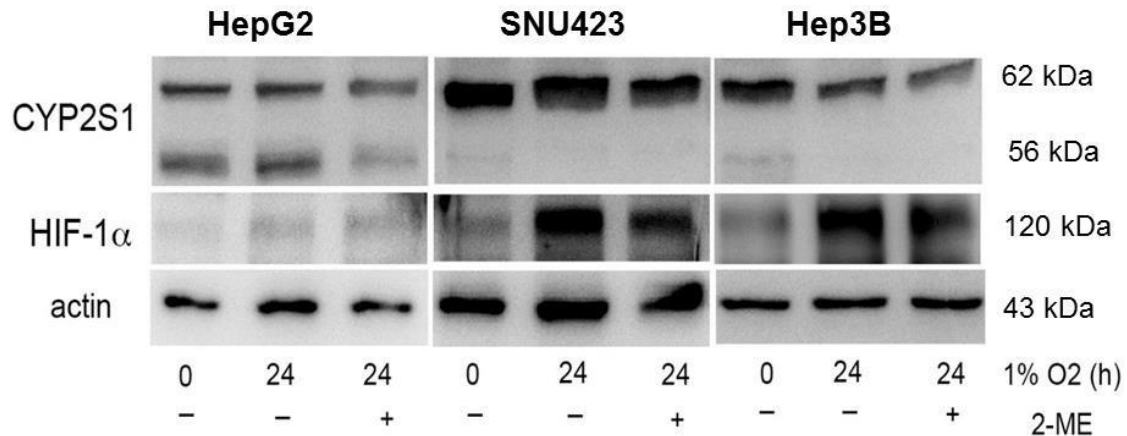


Figura 10. Expresión diferencial de CYP2S1 en líneas celulares de hepatocarcinoma. Se realizaron ensayos de inhibición de HIF-1 α . Los resultados preliminares mostraron que la vía de HIF podría estar implicada en la sobreexpresión de CYP2S1 en células HepG2. Sin embargo, en células Hep3B y SNU423 no observamos cambios. Además, logramos observar que una banda adicional con un peso aproximado de 62 kDa se expresa en las células Hep3B y SNU423 (Cabrera- Cano et al., 2021).

Por lo tanto, este trabajo se enfoca en el efecto que tiene la hipoxia sobre la expresión del ARNm de CYP2S1 en otras líneas celulares representativas de distintos tipos de hepatocarcinoma. Además, exploramos la existencia de una posible isoforma de CYP2S1 y su comportamiento en hipoxia.

2. Hipótesis

La hipoxia promueve cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo. En células Hepa-1, el CYP2S1 incrementa su expresión en una condición de hipoxia, este comportamiento es similar en células HepG2. De acuerdo con los antecedentes y con los resultados observados en el laboratorio proponemos que la expresión de la isoforma canónica de CYP2S1 se ve afectada en células SNU423 y Hep3B en condiciones de hipoxia. Además, proponemos que la banda alternativa corresponde a la isoforma alternativa de CYP2S1.

3. Objetivo general

Evaluar el efecto de la hipoxia en la expresión las isoformas de 56 kDa y 62 kDa de CYP2S1 empleando las líneas celulares HepG2, SNU423 y Hep3B.

3.1 Objetivos específicos

1. Determinar si la banda de 62 kDa corresponde a la isoforma alternativa de CYP2S1.
2. Evaluar los efectos diferenciales de la hipoxia sobre la expresión de las isoformas de 56 kDa y 62 kDa de CYP2S1 en células de cáncer de hígado.
3. Evaluar los efectos de la vía de HIF1- α sobre la expresión de las isoformas de 56 kDa y 62 kDa de CYP2S1.

4. Metodología

4.1 Cultivo de células HepG2, Hep3B, SNU423 y tratamientos en hipoxia

Se utilizó la línea celular de hepatoblastoma HepG2 y las líneas de hepatocarcinoma Hep3B y SNU423. Las células HepG2 se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células Hep3B fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz por el Laboratorio de Medicina Experimental y Carcinogénesis de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Por su parte, las células SNU423 fueron proporcionadas por el Dr. Saúl Villa Treviño del laboratorio de Biología celular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV). Las células se cultivaron en frascos de 75 cm² ventilados que contenían 10 mL de medio Eagle's Minimum Essential Medium EMEM (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA), para células HepG2 y Hep3B y medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) para SNU423. Cada medio fue suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (GIBCO/ Invitrogen, Carlsbad, CA), y una mezcla de penicilina (100 I.U./mL) - estreptomina (100 µg/mL) (GIBCO / Invitrogen, Carlsbad, CA). Las líneas celulares se incubaron a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y 99% de humedad. Una vez alcanzada la confluencia (70%-80%) las células se despegaron mediante tripsina-EDTA al 5% (GIBCO / Invitrogen, Carlsbad, CA); posteriormente las células se sembraron en cajas Petri de 100 mm de diámetro y se incubaron en una cámara de hipoxia (Hypoxic Chamber Bactrox, Shel Lab) a distintos periodos de incubación (0, 6, 12, 18 y 24 h) con un porcentaje de 1% de oxígeno.

4.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Después del tratamiento, se extrajo el ARN total de las células usando el reactivo TRIzol siguiendo las instrucciones del fabricante. (Thermo Fisher Scientific, Inc.

Waltham, Massachusetts, United States). Posteriormente, el ARN se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop ONE (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, Massachusetts, United States). Para los parámetros de calidad 260/230 y 260/280, se tomaron en cuenta las recomendaciones publicadas en la literatura (Kuang, Yan, Genders, Granata, & Bishop, 2018). Los parámetros de las muestras para células Hep3B se pueden observar en la Tabla 2, y para células SNU423 en la Tabla 3. Además, para evaluar la integridad de las muestras, 1000 ng de ARN se tiñeron con Sybergold (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA) y se corrieron en un gel de agarosa (Cleaverscientific, Rugby, Warwickshire, UK) al 1% con una solución amortiguadora 1X:

89 mM Tris-base (BIO-RAD, Hercules, California, U.S.A.), 2 mM EDTA (Sigma, St. Louis, Missouri, United State) y 89 mM ácido bórico (Sigma, St. Louis, Missouri, United States), pH 8, a 85 volts por 40 minutos. El gel se fotografió con un fotodocumentador Imaging System Fusion Fx (Thermolab, Vasai West, Thane, Maharashtra, India).

Se utilizaron 5 µg de ARN total de cada muestra para sintetizar el ADNc en 25 µL de una mezcla de reacción del kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, Massachusetts, United States) y se siguieron los pasos sugeridos por el fabricante. Las muestras se incubaron previamente con DNAsa 1 RNAsa Free (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, Massachusetts, United States) para evitar la contaminación con ADN genómico.

4.3 PCR Punto final

Para la técnica de PCR-Punto final se usó el kit KAPA2G FAST HotStar PCR Kit (KAPABIOSYSTEMS, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y fue realizado en un termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, Massachusetts, United States). El ADNc sintetizado fue analizado para corroborar su integridad y que fuera amplificable. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 95 °C durante 1 minuto, seguidos de 35 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 56.6 °C para el alineamiento par de cebadores utilizados durante 15 segundos, 72 °C durante 15 segundos, y una extensión final de 72 °C durante 7 minutos. Los productos de PCR se fraccionaron en un gel de agarosa (Cleaverscientific, Rugby, Warwickshire, UK) al 1%-2% con una solución amortiguadora 1X: 89 mM Tris- base (BIO-RAD, Hercules, California, U.S.A.), 2 mM EDTA (Sigma, St. Louis, Missouri, United State) y 89 mM ácido bórico (Sigma, St. Louis, Missouri, United State), pH 8, a 85 volts por 60 minutos. Posteriormente se tiñeron con Sybergold (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA) y se fotografiaron con un fotodocumentador Imaging System Fusion Fx (Thermolab, Vasai West, Thane, Maharashtra, India). Los cebadores utilizados durante los ensayos de PCR punto final, se muestran en la tabla 1.

4.4 PCR en tiempo real

Para evaluar el efecto de la hipoxia sobre la expresión del citocromo CYP2S1 a nivel de ARNm en células Hep3B se realizaron ensayos de PCR en tiempo real, utilizando el kit KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (KAPABIOSYSTEMS, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el termociclador StepOne Real Time PCR-System (Applied Biosystem, Thermo Fisher

Scientific, Inc. Waltham, Massachusetts, United States) con las siguientes condiciones de corrida: 95 °C durante 10 minutos, seguidos de 33 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, temperaturas de alineamiento correspondientes a cada juego de cebadores (ver tabla 1) durante 30 segundos, 95 °C durante 15 segundos, y una extensión final de 95 °C durante 10 minutos. Los datos fueron capturados utilizando el software StepOne versión 2.2. Se utilizó el gen HMBS como control endógeno (Cicinnati et al., 2008). El análisis de expresión se realizó con el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabla 1. Cebadores utilizados durante los ensayos de PCR. En esta tabla se logran observar los distintos pares utilizados para los ensayos de PCR punto final y PCR en tiempo real.

Gen	Cebadores	Tm	Amplicón	Características
HMBS	Sentido: 5'-TGCAACGGCGGAAGAAAA-3' Antisentido: 5'-ACGAGGCTTTCAATGTTGCC-3'	56.6°C	113pb	Diseñado para reconocer solamente la secuencia de HMBS.
CYP2S1	Sentido: 5'-TCCTGCATGACCCCAACATC-3' Antisentido: 5'-TGCTTCCTGAACCGTCCATC-3'	56.6°C	85pb	Diseñado para reconocer la secuencia canónica de CYP2S1.
CYP2S1	Sentido: 5'-GAAGCGTGTCTGCCTTGGAG-3' Antisentido: 5'-TTGTGTATGGGTGTGCGGTT-3'	58°C	411pb Y 309pb	Diseñado para reconocer la secuencia canónica y alternativa de CYP2S1 en la región 1354(Fw)-1764(Rv).
CYP2S1	Sentido: 5'-ACGGTTCAGGAAGCATGAGG-3' Antisentido: 5'-TTAACCTGTCCATGCCAC-3'	62°C	324pb Y 222pb	Diseñado para reconocer la secuencia canónica y alternativa de CYP2S1 en la región 1312(Fw)-1616(Rv).
CYP2S1	Sentido: 5'-ACCGTCAGTGGCCTTTTCAA-3' Antisentido: 5'-CGTGAAATGTGGCTGCCTGC-3'	66°C	201pb Y 99pb	Diseñado para reconocer la secuencia canónica y alternativa de CYP2S1 en la región 1475(Fw)-1656(Rv).
CYP2S1	Sentido: 5'-AGCGGAGCTCTCCTCTTCT-3' Antisentido: 5'-GTGGAGTGAAGGTCAGTGGG3'	62°C	159pb	Diseñado para reconocer la secuencia canónica de CYP2S1 en la región 1523(Fw)-1655(Fw).
CYP2S1	Sentido: 5'-CGTCCCCTGACCTTCACTC-3' Antisentido: 5'-GTGTAATGTGGCTGCCTGC-3'	64°C	152pb	Diseñado para reconocer la secuencia canónica de CYP2S1 en la región 1387(Fw)-1526(Rv).

4.5 Inmunoprecipitación

Se incubó agarosa (Abcam, #ab193258, Cambridge, Reino Unido) junto con el anticuerpo primario anti-CYP2S1 (Abcam, #ab69650, Cambridge, Reino Unido) durante 2 h a 4°C. Enseguida, se agregaron 500 µg de extracto total de proteínas provenientes de células HepG2 tratadas en hipoxia 1% de oxígeno durante 12 horas y se incubaron con agitación durante 24 h a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con una solución de PBS que contenía (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 2.7, 10 mM de Na₂HPO₄ y 1.8 mM de KH₂PO₄) con un pH de 7.4 a 4 °C, a 12500 rpm por 15 minutos. Las proteínas obtenidas se corrieron en una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). El gel resultante se tiñó con una solución de azul de comassie (Bio-Rad; Hercules, California, USA). Se seleccionaron 4 bandas y se enumeraron de la siguiente forma (1, 2, 3 y 4). Las bandas se cortaron, se aislaron y se mandaron a secuenciar mediante espectrometría de masas MS/MS en el instituto de biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM).

4.5.1 Optimización del espectrómetro de masas (calibración externa)

El ajuste de los parámetros para asegurar que el instrumento funcione dentro de las especificaciones fue realizado con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621 (Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution). Estos calibrantes se utilizan para calibrar el módulo LTQ Velos con trampa de iones y el módulo Orbitrap con detector de masas FT (Fourier Transform) en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se utiliza para extender la calibración de masas

a menores valores de m/z (73.14 Da). Este tipo de calibración permite determinaciones de masas moleculares con variación de exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón).

4.5.2 Procesamiento químico de las muestras

Las muestras fueron previamente reducidas con dithiothreitol (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquiladas con iodoacetamide (Sigma-Aldrich) y digerida “in gel” con Tripsin (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA). En el procesamiento de la muestra con tripsina se utilizó una solución que contiene 50 mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) y la incubación fue de 18 horas a temperatura de 37 °C.

4.5.3 Análisis espectrométrico

Los péptidos producidos por clivaje enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) compuesto de una bomba Accela (Thermo-Fisher Co.; San José, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San José, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano- electrospray (ESI).

En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 5-85% de B (acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 minutos utilizando una columna capilar RP-C18 hecha en casa (0.75 μm de diámetro interno y 20cm de largo). El flujo del sistema LC fue de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

El escaneo total de iones (Full Scan) fue realizado en el analizador Orbitrap con un poder de resolución de masas (Resolution Power; $RP=m/FWHM$) de 30,000. Para la fragmentación de los péptidos se aplicaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation) con un poder de resolución de masas (Resolution Power; $RP=m/FWHM$) de 15,000. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas predeterminadas (solamente se fragmento iones con carga $z2+$, $z3+$ y $z4+$) con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 5 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 300 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 70 segundos.

4.5.4 Búsqueda en PDB e identificación de proteínas

La identificación de proteínas se realizó con los datos espectrométricos en formato .raw en el programa Proteome Discoverer 1.4. (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) a través del motor de búsqueda Sequest HT. Para la búsqueda de identidad se utilizó la base de datos invertida (Decoy database) de uniprot-Homos sapiens; con un FDR-False Discovery Rate (Mínimo) de 0.01 y FDR 0.05 (Máximo). La tolerancia máxima de diferencia de masas moleculares del ion precursor cuando comparados los valores teóricos contra experimentales (precursor mass tolerance) fue de 20 ppm y la tolerancia

para los fragmentos obtenidos por disociación del ion precursor (fragment mass tolerance) fue de 0.6 Da. Para la búsqueda automática fueron establecidas modificaciones constantes carbamidometilación de cisteínas y variables como oxidación de metioninas y deaminación de asparagina y glutamina.

4.6 Análisis bioinformático de proteína

El análisis se realizó mediante el software Phyre2 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> y siguiendo las recomendaciones y el protocolo establecido por (Kelley, Mezulis, Yates, Wass, & Sternberg, 2015). La secuencia de aminoácidos de ambas isoformas de CYP2S1 está anotada en la base de datos del uniprot <https://www.uniprot.org/uniprot/Q96SQ9#sequences> con número de acceso Q96SQ9 (CP2S1_HUMAN).

5 Resultados

5.1 Los niveles del ARNm de CYP2S1 son bajos en las células Hep3B en condiciones de hipoxia

Para cumplir con el primer objetivo planteado, el cual consiste en determinar el efecto de la hipoxia sobre el ARNm de CYP2S1 en células Hep3B y SNU423, se realizaron ensayos de PCR tanto punto final como en tiempo real. Antes de realizar los ensayos de PCR, las muestras se evaluaron para confirmar si eran óptimas para los ensayos de PCR. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa y logramos observar que las muestras de ARNs de las células SNU423 son íntegras (Figura 11-A y Tabla 2). Del

mismo modo, los ARNs de las células Hep3B (Figura 11-B y Tabla 3) son íntegros ya que las bandas correspondientes a algunas subunidades de ARN ribosomal se observan bien definidas. La relación 260/280 mide la concentración del ARN y al mismo tiempo proporciona una medida de posible contaminación con proteínas. Mientras que la relación 260/230 mide la concentración de ARN y al mismo tiempo indica posible contaminación con agentes como fenol u otros elementos utilizados durante la extracción. Por lo tanto valores de 260/280 entre 1.8 y 2.0 y valores de 260/230 entre 1.8 y 2.2 sugieren que el ARN está libre de contaminación (Chong, Han, Lee, & Lee, 2020; Kuang et al., 2018). Por lo tanto, concluimos que son adecuados para la síntesis de ADNc. Después de sintetizar el ADNc, se realizó un ensayo de PCR punto final con muestras de células Hep3B, para evaluar la calidad de las muestras. Los resultados mostraron que las muestras son integra, amplificables y adecuadas para los ensayos subsecuentes. (Figura 12).

Una vez que se observó que las muestras eran adecuadas, se analizó el efecto de la hipoxia sobre el ARNm de CYP2S1 en células Hep3B. Los resultados preliminares de PCR punto final indican que la hipoxia no favorece la sobreexpresión de CYP2S1 en células Hep3B (figura 13-A). Asimismo, indican que la expresión del mensajero de este citocromo en esta línea celular es baja, con respecto a las células HepG2 (figura 13-A). Los resultados preliminares de PCR en tiempo real muestran un patrón similar al anterior. Se observa que los niveles de ARN mensajero de CYP2S1 no incrementan en condiciones de hipoxia (Figura 13-B). Estos datos sugieren que la hipoxia no tiene

ningún efecto sobre la expresión del ARNm de CYP2S1 en células Hep3B. Sin embargo, hace falta completar los análisis para confirmarlo.

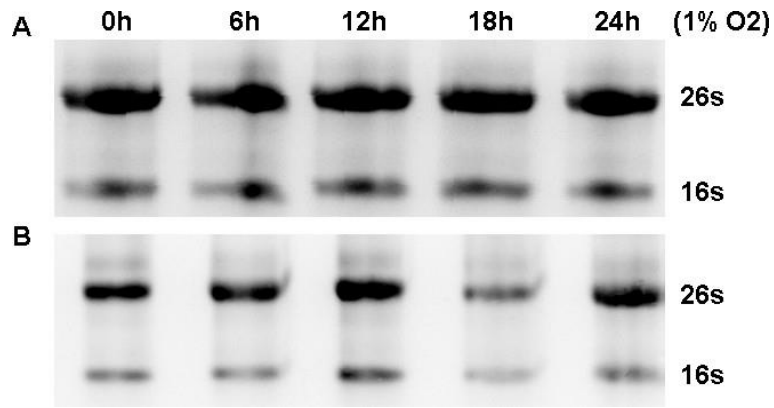


Figura 11. Las muestras de ARN son íntegras. En la figura A se observa que las muestras de las células SNU423 son íntegras y adecuadas para los ensayos posteriores. En la figura B se observa que el RNA de las muestras de las células Hep3B también son íntegras y adecuadas. Imagen representativa.

Tabla 2. Parámetros de calidad de ARN de células SNU423. En esta tabla podemos observar que las muestras de ARN de células Hep3B son puras de acuerdo con los valores 260/230 y 260/280. Por lo tanto son adecuadas para los ensayos subsecuentes.

Muestra SNU423	260/280	260/230	Concentración (ng/μL)
0h	2.07	2.09	2441.9
6h	2.09	2.08	1865.3
12h	2	2	1104.8
18h	2.01	2.1	1258.1

24h	2.05	1.85	1410.3
0h	2.04	1.52	2026.6
6h	2.05	1.98	2503.6
12h	2.08	1.83	2228.6
18h	2.07	1.85	2168.3
24h	2.07	2.07	2135.1
0h	2.08	2.04	2513.1
6h	2.05	2.08	1859.8
12h	2.05	2.05	2613.3
18h	2.07	1.87	2295.3
24h	2.07	1.96	1925.6

Tabla 3. Parámetros de calidad de ARN de células Hep3B. En esta tabla podemos observar que las muestras de ARN de células Hep3B son puras de acuerdo con los valores 260/230 y 260/280. Por lo tanto son adecuadas para los ensayos subsecuentes.

Muestras Hep3B	260/280	260/230	Concentración (ng/μL)
0h	2.02	1.64	1217.3
6h	2.02	1.55	1842.5
12h	2.06	2.03	1714.8
18h	2.04	1.76	1704.
24h	2.06	1.97	2017.7

0h	2.07	1.87	1801.6
6h	2.03	1.2	2070.1
12h	2.04	1.94	2563
18h	2.04	1.97	1595.7
24h	2.03	1.45	2542.3
0h	2.04	1.74	2857.3
6h	2.04	1.94	2903.9
12h	2.04	1.96	2671.5
18h	2.03	2	2582.7
24h	2.04	2.01	1194.2

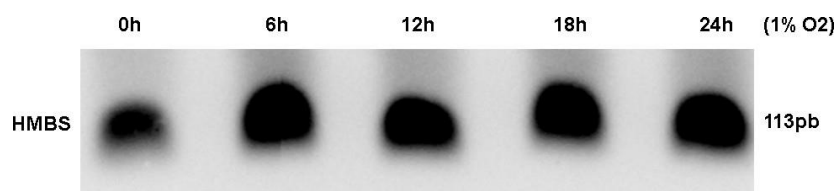


Figura 12. Los ADNc de células Hep3B son amplificables. Antes de iniciar con los ensayos de PCR; las muestras se evaluaron mediante el uso de un gen de referencia. En la imagen se observa que las muestras son amplificables y son ideales para los ensayos de PCR.

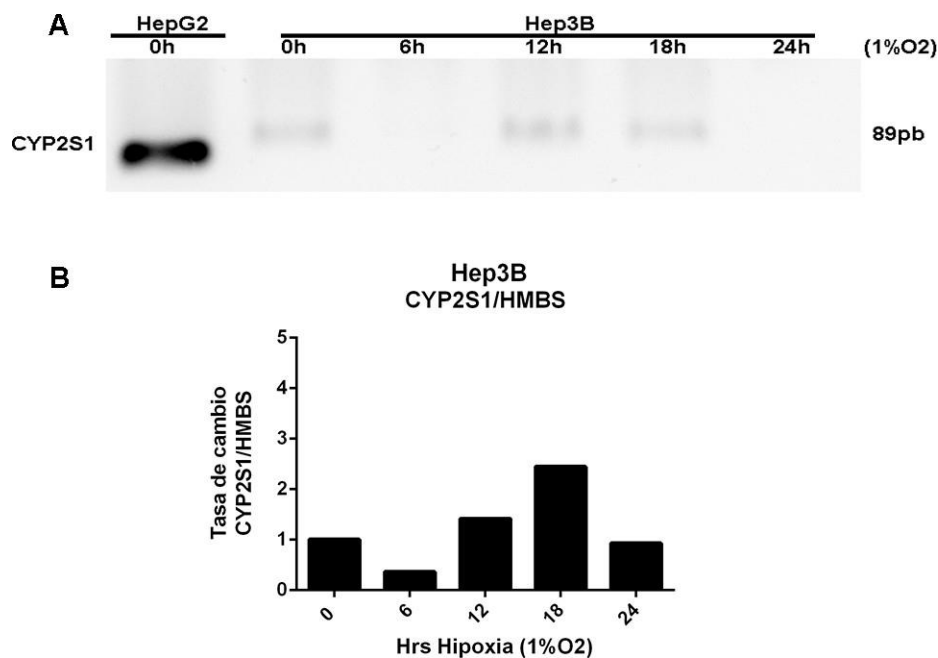


Figura 13. La expresión de CYP2S1 es baja en células Hep3B en hipoxia. En el panel A se observa que en células Hep3B, los niveles de CYP2S1 no cambian en condiciones de hipoxia. Además, se observa que la expresión de este citocromo es baja comparada con las células HepG2. En el panel B, los análisis de PCR en tiempo real muestran un patrón similar al de PCR punto final. Se observa que los niveles de mensajero de CYP2S1 no cambian en hipoxia.

5.2 La hipoxia favorece aumentos en la expresión del ARNm que codifica para la posible isoforma alternativa de CYP2S1

Otro de los objetivos planteados en este proyecto, fue analizar la existencia y presencia de una isoforma alternativa de CYP2S1 en las líneas celulares utilizadas. Para cumplir con dicho objetivo, se realizó una búsqueda en la literatura y se logró identificar la

secuencia nucleotídica de la isoforma canónica de CYP2S1, la cual se encuentra anotada en la base de datos del NCBI con número de acceso NM_030622.8 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_030622.8. Por su parte, la secuencia nucleotídica de la isoforma alternativa de CYP2S1, se encuentra anotada en la base de datos FLJ Human cDNA DataBase con número de acceso AK027605 (http://flj.lifesciencedb.jp/v032/cgi/sv_list.cgi). Se realizó un alineamiento de secuencias nucleotídicas utilizando el software Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2021), <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Logramos observar que las secuencias de nucleótidos de *CYP2S1* son altamente similares. Sin embargo, hay una diferencia de 102 nucleótidos en el exón 9 (Figura 14). Con base en la información anterior, se diseñaron 5 pares de cebadores mediante la herramienta primer desing tool <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Bustin, Mueller, & Nolan, 2020). Tres pares de cebadores se diseñaron entre el exón 8 y 10 para flanquear y reconocer ambas secuencias de CYP2S1, incluyendo la región que es diferente entre una secuencia y otra (marcados en color morado, azul y amarillo). Por su parte, 2 pares se diseñaron para reconocer solo la secuencia canónica, sirviendo como control positivo (marcados en gris y verde), (ver tabla 1 número en la sección de material y métodos y Figura 14).

NM_030622.8	ACGGTT CAGGAAGCATGAGGCGTTCCTGCCCTTCCTTAGGGGAAGCGTGTCTGCCTTGG	1371
C-NT2RP2006571	ACGGTT CAGGAAGCATGAGGCGTTCCTGCCCTTCCTTAGGGGAAGCGTGTCTGCCTTGG	1380
NM_030622.8	AGAGGGCCTGGCAAAGCGGAGCTCTTCCCTCTTCTCACCACCATCCTACAAGCCTTCTC	1431
C-NT2RP2006571	AGAGGGCCTGGCAAAGCGGAGCTCTTCCCTCTTCTCACCACCATCCTACAAGCCTTCTC	1440
NM_030622.8	CCTGGAGAGCCCGTGCCCGCCGGACACCC TGAGCCTCAAGCCCACCGTCAGTGGCCTTT	1491
C-NT2RP2006571	CCTGGAGAGCCCGTGCCCGCCGGACACCC TGAGCCTCAAGCCCACCGTCAGTGGCCTTT	1500
NM_030622.8	CAACAT TCCCC CAGCCTTCCAGCTGCAAGTCCGTCCTACTGACCTTCACTCCACCAGCA	1551
C-NT2RP2006571	CAACAT TCCCC CA-----GCTCCTACTGACCTTCACTCCACCAGCA	1513
NM_030622.8	GACCAGATGAAGGAAGGCACTTGGAGTGGTGGTGCCAGGACGGTGCCTCCAGCCTC	1611
C-NT2RP2006571	-----GCTC	1518
NM_030622.8	AACAGTGGGCA TGGACAGGGTTAATGTCTCCAGAGTGACTGACAGGCAGCCACATTTA	1671
C-NT2RP2006571	AACAGTGGGCA TGGACAGGGTTAATGTCTCCAGAGTGACTGACAGGCAGCCACATTTA	1578
NM_030622.8	CACGCC TGCAGTTGTTTTCCGGAGTCTGTCCCACGGCCACACGCTCACTTGACTCATGC	1731
C-NT2RP2006571	CACGCC TGCAGTTGTTTTCCGGAGTCTGTCCCACGGCCACACGCTCACTTGACTCATGC	1638
NM_030622.8	TGCTAA GATGCACAACCGCACACCCATACACAAC TACAAGGGCCACAAGCAACTGCTGG	1791
C-NT2RP2006571	TGCTAA GATGCACAACCGCACACCCATACACAAC TACAAGGGCCACAAGCAACTGCTGG	1698
NM_030622.8	GTTAGCTTTCCACAGACATAAATATAGTCCATCTGCAATCACAAGCACATAGCCAGGTAA	1851
C-NT2RP2006571	GTTAGCTTTCCACAGACATAAATATAGTCCATCTGCAATCACAAGCACATAGCCAGGTAA	1758

Figura 14. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de CYP2S1. En esta imagen podemos observar el alineamiento de secuencias de CYP2S1. La secuencia superior (identificada como NM_030622.8) corresponde a la secuencia canónica, mientras que la secuencia inferior (C-NT2RP2006571) corresponde a la secuencia alternativa. En rojo se marca el codón de paro (TGA) del exón 9 y (TAG) del exón 10; también se marca la diferencia que hay entre ambas secuencias, la cual es de 102 pares de bases

(pb). Las flechas representan la región que cada par de cebadores reconoce. Ver código de color en la Tabla 3.

Antes de iniciar los ensayos de PCR punto final, se realizaron ensayos de PCR gradiente con muestras de células HepG2 en condiciones de normoxia, para elegir la T_m adecuada. Se tomaron en cuenta 3 temperaturas de alineamiento diferentes para cada par de cebador y los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1%. Las temperaturas experimentales que se eligieron para los ensayos posteriores fueron las siguientes: para el par de cebadores que amplifican de la región 1354(Fw)-1764(Rv) (marcado en color morado para distinguirlo en la Tabla 1) 58 °C. Para el par de cebadores que amplifican de la región 1312(Fw)-1616(Rv) (marcado en color azul para distinguirlo en la Tabla 1) 62 °C. Para el par de cebadores que amplifican de la región 1475(Fw)-1656(Rv) (marcado en color amarillo para distinguirlo en la Tabla 1) 66 °C. Para el par de cebadores que amplifican de la región 1523(Fw)-1655(Fw) (marcado en color gris para distinguirlo en la Tabla 1) 62 °C. Finalmente para el par de cebadores que amplifican de la región 1387(Fw)-1526(Rv) (marcado en color verde para distinguirlo en la Tabla 1) 64 °C. Estas temperaturas son adecuadas ya que solo se observó un producto de PCR y no se observaron bandas inespecíficas (Figura 15).

Como se mencionó anteriormente, 3 de los cebadores fueron diseñados con el objetivo de reconocer ambas secuencias de CYP2S1. Al haber una diferencia de 102 pb entre una secuencia y otra, se esperaba observar una banda más pequeña con cada de uno de estos cebadores (ir a la Tabla 3 en la sección de Material y métodos para ver los tamaños de productos esperados). Sin embargo, solamente con los cebadores que

amplifican la región 1312(Fw)-1616(Rv) y la región 1475(Fw)-1656(Rv) (marcados en color azul y amarillo para distinguirlos) se logró observar una banda muy tenue por debajo de la banda canónica (Figura 15 B y C marcado con flecha). Con el objetivo de visualizar mejor la posible banda alternativa y siguiendo las recomendaciones encontradas en la literatura (Harvey, Lyu, & Cheng, 2021)(Rosa et al., 2019), se hicieron algunos ajustes a la PCR. Se prepararon reacciones de 25 μ L, se usaron 25 ng y 50 ng de ADNc de células HepG2 en condiciones de normoxia e hipoxia 24h 1% de oxígeno y las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2%. Con estos ajustes se observó que las muestras se separaron mejor durante la electroforesis (Figura 16 A-B). Para el caso de los cebadores de CYP2S1 azules, se logra observar una banda más ténue por debajo de la banda principal con un peso aproximado de 222 pb. Esta banda solo se observó en condiciones de normoxia con 50 ng e hipoxia con 25ng y 50ng (Figura 16-A). De manera muy interesante se observó una banda más visible que con los cebadores de CY2S1 amarillos que con los cebadores azules. Esta banda se observó con más claridad en las condiciones de hipoxia con 25ng y 50ng (Figura 16-B). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la hipoxia favorece que se incrementen los niveles de ARNm de la posible isoforma alternativa de CYP2S1. Hace falta repetir los ensayos hasta que se obtengan datos representativos y reproducibles.

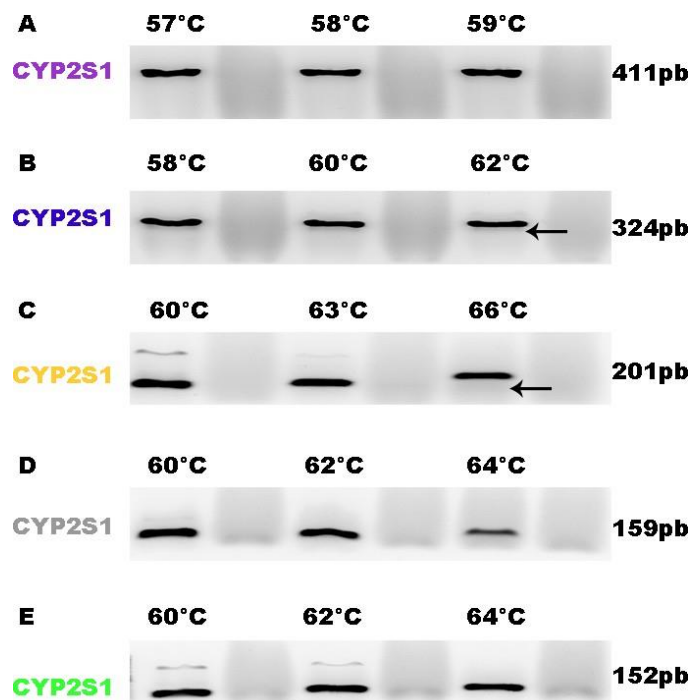


Figura 15. Estandarización de Tm experimentales. Se realizaron PCRs para estandarizar la Tm de cada par de cebadores (A-E). Para el caso del par en el panel B-C se logra apreciar una ligera banda por debajo del producto principal. Esta banda más ligera pudiera ser la secuencia de CYP2S1 alternativo.

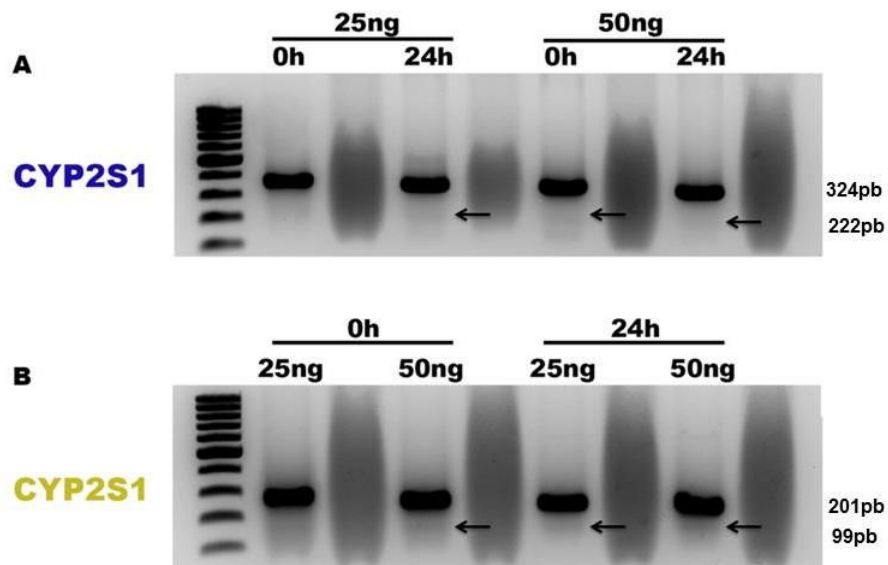


Figura 16. La hipoxia favorece la expresión del ARNm alternativo de CYP2S1 en muestras de células HepG2. En el panel A se observa una banda tenue que puede corresponder a la secuencia alternativa y la cual se ve más expresada en hipoxia. En el panel B se observa algo similar a las 24h de hipoxia.

5.3 La hipoxia favorece la expresión de distintas proteínas que promueven la supervivencia celular

Previamente reportamos que a hipoxia favorece la sobreexpresión de CYP2S1 en células HepG2. Además, en los ensayos de western blot observamos una banda adicional con un peso aproximado de 62 kDa y planteamos que esta banda adicional pudiese corresponder a la isoforma alternativa de CYP2S1. Para intentar identificar esta isoforma a nivel de proteína y para complementar los análisis que se describieron en los resultados anteriores, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con muestras de células HepG2 tratadas en hipoxia a 12 h. Mediante el software Scaffold 4 logramos identificar proteínas relacionadas con la hipoxia. Por ejemplo, en la banda número 1 con una masa molecular aproximada de 75kDa, logramos identificar a las subunidades α y β de la proteína de choque térmico 90 (HSP90) con masas moleculares aproximadas de 85 kDa y 83kDa respectivamente (Figura 17). Esto es muy interesante ya que las proteínas HSP90 están implicadas en favorecer la estabilidad de HIF1- α y también favorecer su interacción con HIF1- β promoviendo la adaptación célula al estrés hipóxicos y la transcripción de CYP2S1 (Prince et al., 2015). En el caso de la banda número 2 con una masa molecular aproximada de 70kDa, logramos identificar a la proteína chaperona residente del retículo endoplásmico denominada BIP (proteína de

unión a inmunoglobulina) con una masa molecular aproximada de 72 kDa (ver Figura 17). Del mismo modo que en el resultado anterior, BIP en condiciones de estrés del retículo influenciado por la hipoxia, permite un correcto plegado de proteínas lo que conduce a una supervivencia de las células cancerosas (Chipurupalli, Kannan, Tergaonkar, D'Andrea, & Robinson, 2019). En la banda número 3 con una masa molecular aproximada de 50 kDa, logramos identificar a las subunidades α y β de la ATP sintasa, con masas moleculares aproximadas de 60 kDa y 57 kDa, respectivamente (Figura 17). Estas proteínas también están relacionadas con la supervivencia de las células cancerosas en condiciones de hipoxia, ya que se ha demostrado que la acidosis favorecida por la hipoxia promueve una correcta fusión de las mitocondrias y así aumentando la síntesis de ATP (Khacho et al., 2014). Finalmente, en la banda número 4 con una masa molecular aproximada de 45 kDa, logramos identificar al citocromo B con una masa molecular aproximada de 48 kDa.

Con estos resultados podemos concluir que en condiciones de hipoxia se activan diferentes proteínas que favorecen la supervivencia de las células cancerosas. Sin embargo, hasta el momento no hemos logrado identificar las proteínas de CYP2S1 con pesos moleculares de 56 kDa y 62 kDa, mediante inmunoprecipitación. Por lo tanto, es importante emplear otra estrategia experimental para evaluar la presencia de CYP2S1.

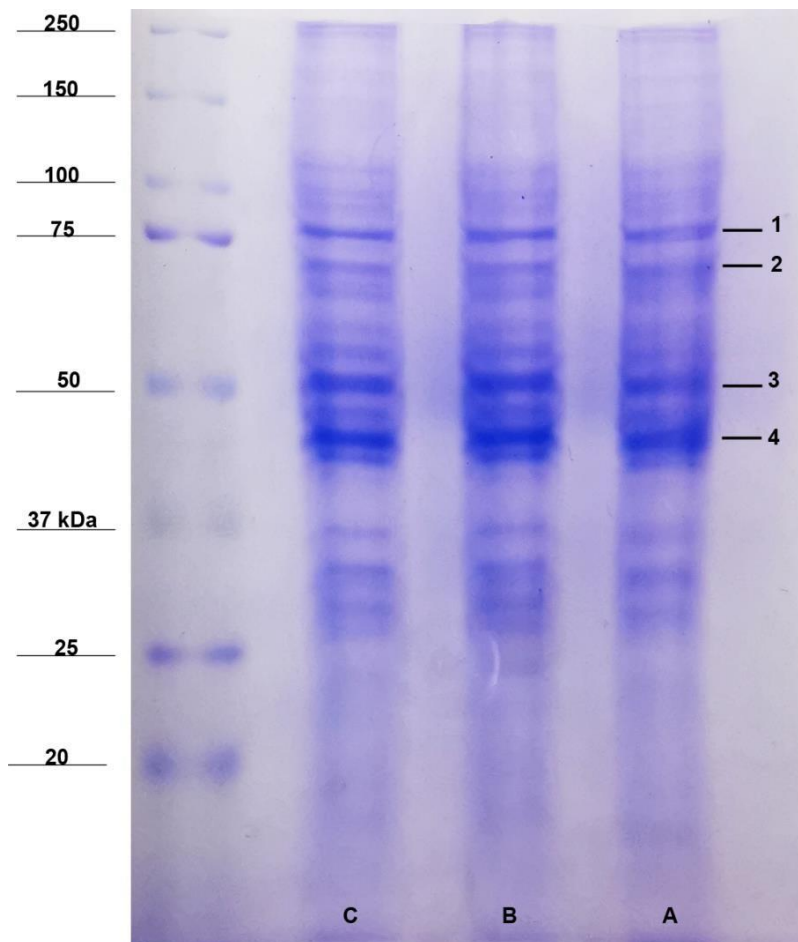


Figura 17. Identificación de proteínas de células HepG2 tratadas en hipoxia. En esta imagen observamos un gel representativo de las pruebas de inmunoprecipitación realizadas. Del lado izquierdo se observa el marcador de masa molecular. Del lado derecho se observan las bandas de nuestro interés las cuales se enumeran del 1-4. En este gel se lograron identificar proteínas importantes como la HSP90 y la chaperona BIP. Los carriles A, B y C son un triplicado que corresponde a la condición de 12 h de incubación con 1% de oxígeno.

5.4 La estructura tridimensional de las 2 isoformas de CYP2S1 son diferentes

Hasta el momento no se ha caracterizado la estructura tridimensional del citocromo CYP2S1. Para tener un primer acercamiento de cómo sería la estructura de este citocromo se realizó un análisis bioinformático de la secuencia canónica y de la secuencia alternativa, mediante el software Phyre2. El resultado demostró que ambas isoformas están compuestas por alfa hélices y láminas beta las cuales se marcan en color rojo y azul (Figura 18 A-B). Los colores rojo y azul hacen referencia a la confianza la cual se refiere a la probabilidad (de 0 a 100) de que la coincidencia entre su secuencia y esta plantilla sea una verdadera homología, donde rojo es una alta confianza y azul una baja confianza. De manera interesante se logra observar que ambas isoformas son diferentes y están diferencias se presentan en la región del amino terminal y carboxilo (Figura 18 A-B). En la Tabla 4 se enlistan las plantillas utilizadas y la confianza de cada una la cual se refiere a la probabilidad (de 0 a 100) de que la coincidencia entre su secuencia y esta plantilla sea una verdadera homología.

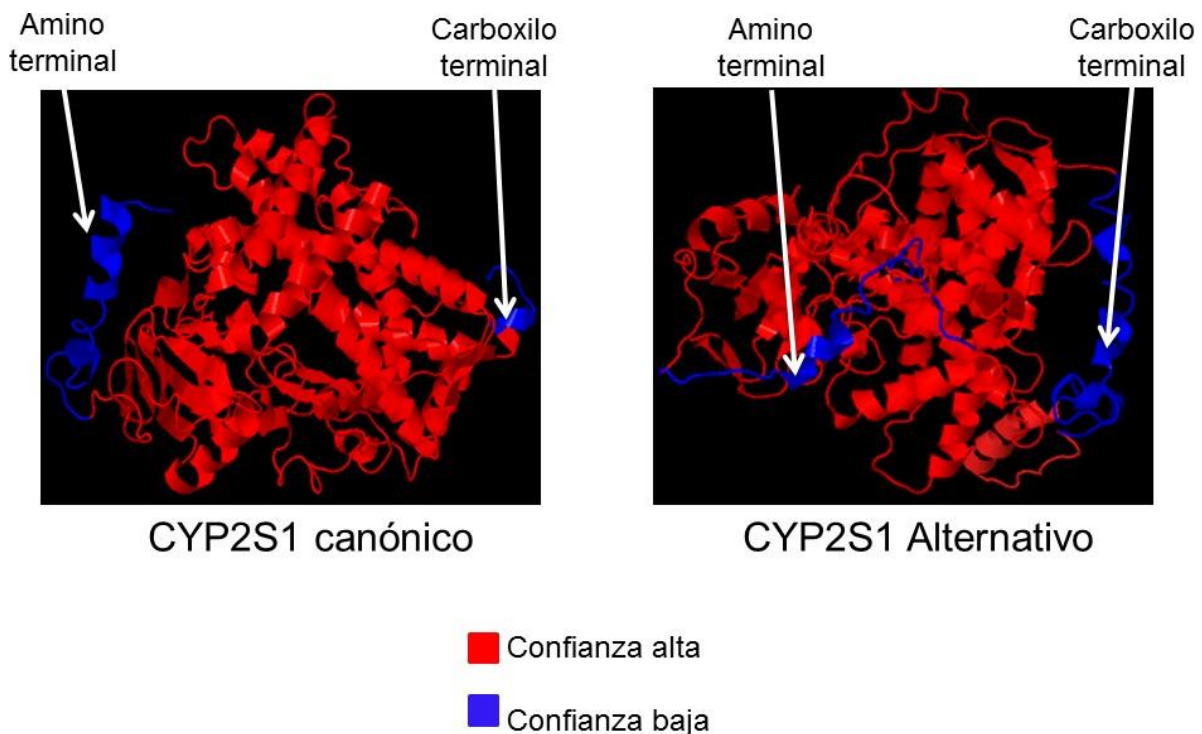


Figura 18. Predicción de la estructura tridimensional de CYP2S1. Se observa que las estructuras de ambas isoformas son diferentes y que esta diferencia se presenta principalmente en la región del amino terminal y carboxilo terminal.

Tabla 4. Plantillas utilizadas para la construcción de la estructura 3D de CYP2S1.

En esta tabla se enlistan algunas plantillas utilizadas para la predicción de la estructura 3D de CYP2S1. Además se enlista la confianza de cada una la cual es de 100%.

Plantilla	Confianza
Citocromo p450 CYP2A6.	100%
Citocromo P450 CYP11B2 en complejo con fradozole.	100%
Citocromo P450 CYP2E1 en complejo con el inhibidor 4-2metilpirazol.	100%
Citocromo P450 CYP1A2 en complejo con el 2- α -naftoflavona.	100%
Citocromo p450 CYP2D6.	100%
Citocromo P450 CYP24A1.	100%

6. Discusión

El citocromo CYP2S1 es una proteína extra hepática. En condiciones normales se expresa en las células epiteliales de la tráquea, intestino delgado, estómago, bazo, pulmón y colon (Saarikoski, Rivera, Hankinson, & Husgafvel-Pursiainen, 2005). En contraparte, CYP2S1 se sobreexpresa en diferentes tipos de cáncer de origen epitelial

como cáncer de ovario, mama, colón, pulmón, tráquea y tiroides. Sin embargo se sabe poco de su expresión en cáncer de hígado. Los tumores hepáticos al igual que otros cánceres de origen epitelial, son muy heterogéneos y desarrollan zonas de hipoxia; este fenómeno se relaciona con la malignidad, la metástasis y resistencias a fármacos (Lin, Chang, Zhu, He, & Yang, 2018).

En nuestro grupo de investigación estamos interesados en explorar el comportamiento de CYP2S1 bajo condiciones de hipoxia en un modelo *in vitro* utilizando líneas celulares representativas de cáncer de hígado. Se sabe que los tumores hepáticos presentan zonas de hipoxia con un promedio de 0.8% de oxígeno (McKeown, 2014). Recientemente reportamos que la hipoxia tumoral, particularmente al 1% de oxígeno, favorece la sobreexpresión de CYP2S1 en la línea celular HepG2 (Cabrera-Cano et al., 2021).

Estos resultados son similares a los reportados por Rivera y sus colaboradores, quienes demostraron que en células de hígado de ratón llamadas Hepa1, el gen de *CYP2S1* tiene elementos de respuesta a hipoxia (HRE) (Rivera et al., 2007). Los elementos de respuesta a hipoxia son secuencias de ADN a las cuales se pueden unir las proteínas HIF (Samanta & Semenza, 2018); las cuales actúan como factores de transcripción que se encargan de regular la adaptación celular al estrés hipóxico (Gu et al., 1998; Wang et al., 1995; Zhu et al., 2016). En condiciones de hipoxia, estas proteínas se unen a sus elementos de respuesta favoreciendo tanto la transcripción como la inhibición de genes, entre los que se encuentran algunos miembros de los citocromos P450. La hipoxia y la vía de HIF-1 disminuyen la expresión de algunos citocromos como CYP2B6, CYP3A4 y

CYP3A5; mientras que promueve la expresión de CYP3A6 (Fradette & du Souich, 2003; Valencia-Cervantes et al., 2019). Para establecer si la vía de HIF1- α está implicada en la sobreexpresión de CYP2S1, realizamos un ensayo de inhibición farmacológica del factor de transcripción HIF1- α en células HepG2. Los resultados demostraron que cuando inhibimos a HIF1- α los niveles de la proteína de CYP2S1 disminuyen (Cabrera- Cano et al., 2021). Por lo tanto, con la información anterior se establece que la expresión de CYP2S1 puede ser regulada por la vía HIF-1 α / HIF1- β .

Los resultados preliminares de este trabajo muestran que la hipoxia no tiene efecto sobre la expresión del ARNm CYP2S1 en células Hep3B, a diferencia de lo observado por nuestro grupo de investigación en las células HepG2. Estos resultados se corroboran con los observados en células Hep3B donde en los ensayos de western blot, no observamos efecto de la hipoxia sobre la proteína de CYP2S1 (Cabrera-Cano et al., 2021). Las vías de señalización que se han propuesto que regulan la expresión de CYP2S1 son la vía de AhR y la vía de HIF-1 α . Sin embargo, los resultados observados sugieren que puede haber otros mecanismos de señalización que esté regulando CYP2S1. Uno de ellos es la vía de p53 (Yang et al., 2016). La proteína p53 comúnmente conocida como “el guardián del genoma” es un supresor de tumores y se encuentra mutada en la mayoría de los cánceres humanos (Harris & Levine, 2005; Mantovani, Collavin, & Del Sal, 2019). P53 se activa por diferentes mecanismos como rayos UV, alquilación de bases nitrogenadas, radicales libres, proteínas mal plegadas y la hipoxia (Harris & Levine, 2005; Koumenis et al., 2001; Obacz, Pastorekova, Vojtesek, & Hrstka, 2013; C. Zhang et al., 2021). Cuando la proteína P53 se activa, este funciona

como factor de transcripción, se une a sus elementos de unión a P53 activando la transcripción de sus genes diana, los cuales favorecen el arresto del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis (Joerger & Fersht, 2016). Además de estos genes, p53 regula la transcripción de algunos citocromos P450. Goldstein y colaboradores utilizando las líneas celulares HuH7 y HepG2 demostraron que P53 promueve la expresión de *CYP24A1*, *CYP19A1*, *CYP21A2*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A43*, *CYP4F2*, *CYP4F3*, *CYP4F11* y *CYP4F12* (Goldstein et al., 2013). De manera interesante se ha reportado que las células HepG2 expresan a p53 nativo, mientras que las células Hep3B no expresan a p53 (Goldstein et al., 2013; Liou, Chen, & Yang, 2017; Trepiana et al., 2017). Se han propuesto diferentes mecanismos para la activación de p53 nativo que son dependientes de HIF-1 α (An et al., 1998; Sermeus & Michiels, 2011). La hipoxia y HIF-1 α pueden inhibir a MDM2 (figura 19), una ubiquitina ligasa encargada de marcar a p53 para su degradación (Sermeus & Michiels, 2011; C. Zhang et al., 2021). Además, se proponen otros mecanismos independientes de HIF-1 α . Por ejemplo, el ARN largo no codificante Fendrr puede unirse a la proteína p53 y promover su ubiquitinación y degradación. La hipoxia disminuye los niveles de Fendrr, lo que a su vez atenúa a p53 (C. Zhang et al., 2021). En conjunto esta información y los resultados preliminares podrían sugerir que los aumentos en la expresión de CYP2S1 que hemos observado en células HepG2 bajo condiciones de hipoxia, podrían ser mediados por p53. Nosotros no observamos cambios en la expresión de CYP2S1 en las células Hep3B incubadas en hipoxia, las cuales no expresan p53. Como se mencionó anteriormente, se propone que p53 puede estar regulando la expresión de CYP2S1, ya que la activación de p53 por el fármaco antineoplásico oxaliplatino se relaciona

directamente con los aumentos en la expresión de este citocromo y la subsecuente inhibición de la proliferación celular (Yang et al., 2016). Además, se propone que CYP2S1 participa en la biotransformación de este fármaco (Yang et al., 2016). Por lo tanto, los datos anteriores abren un panorama a explorar sobre la relación que hay entre la hipoxia, P53, CYP2S1, la efectividad a algunos fármacos de la familia del cisplatino y la resistencia a los mismos.

El receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa (PPAR- α) es un receptor nuclear activado por ligando que actúa como factor de transcripción y se expresa en hígado, riñón, tejido adiposo e intestino. Su función es la de regular catabolismo de ácidos grasos, lipogénesis, síntesis de cuerpos cetónicos y la beta oxidación (Pawlak, Lefebvre, & Staels, 2015). Entre los genes que regula este factor de transcripción se encuentran algunas enzimas del citocromos P450 como CYP3A4 y CYP2C8 (Thomas et al., 2013; Thomas, Winter, et al., 2015). Recientemente se reportó que la expresión de CYP2S1 puede estar regulada por PPAR α , ya que la activación de este factor de transcripción mediada por la Crisina una molécula derivada de algunas plantas y que se ha observado que tiene efectos antineoplásicos, favoreció el aumento en la expresión de CYP2S1 (Khor & Khoo, 2020). Se ha planteado que la hipoxia a través de HIF-1 α regula la inhibición de PPAR α (Narravula & Colgan, 2001). Sin embargo, otros estudios reportan que PPAR α interactúa con HIF-1 α para regular la expresión de citocinas proinflamatorias y la anhidrasa carbónica 9 (Papi et al., 2013). Además, se ha reportado que la vía de señalización WNT/ β -catenina regula negativamente la expresión de citocromos P450 dependientes de la actividad de PPAR α (Thomas, Bayha, et al., 2015).

Esta información podría ser otra explicación de lo que hasta el momento hemos observado en las células Hep3B, donde parece no haber aumentos en la expresión de CYP2S1. Las células Hep3B contienen una proteína β -catenina no mutada con señalización activa de wnt / β -catenina mientras que las células HepG2 contienen una mutación en el gen *CTNNB1*. Esta mutación favorece la eliminación de sitios reguladores clave, lo que permite la acumulación aberrante de β -catenina y una desregulación en la vía (de La Coste et al., 1998; Fako et al., 2016). Se deben hacer estudios experimentales para establecer vía de señalización implicada en los aumentos en la expresión de CYP2S1 bajo condiciones de hipoxia o si hay un entrecruzamiento de vías que regulen este citocromo (Figura 19).

Por otra parte, se exploró la posible existencia de una isoforma alternativa de CYP2S1 en la línea celular HepG2, ya que Ota y sus colaboradores describieron la existencia de una secuencia de CYP2S1 la cual podría ser producto del empalme alternativo (Ota et al., 2004). La secuencia cuenta con 10 exones y codifica para una proteína de 564 aminoácidos (Ota et al., 2004). El empalme alternativo es un mecanismo molecular que genera 2 o más ARNm a partir de un mismo precursor (pre-ARNm) (Birzele, Csaba, & Zimmer, 2008; Chaudhary et al., 2019; Rosa et al., 2019). Está relacionado con distintos procesos biológicos como la diferenciación celular, la determinación del linaje, la adquisición y el mantenimiento de la identidad de los tejidos, el desarrollo de órganos, el mantenimiento de la homeostasis tisular y la función celular (Baralle & Giudice, 2017). Además se relaciona con diferentes patologías como el cáncer, donde se presenta un empalme alternativo aberrante que favorece la aparición y progresión de

tumores, así como la alteración de cascadas de señalización de proteínas oncogénicas y supresoras de tumores (Zhang, Qian, Gu, & Yang, 2021). Se sabe que el empalme alternativo contribuye a una gran diversidad de proteínas, aumentando drásticamente el número de proteínas en el proteoma humano (Baralle & Giudice, 2017; Birzele et al., 2008; Chaudhary et al., 2019). Los efectos del corte y empalme alternativo sobre la función de una sola proteína pueden ir desde cambios en la especificidad del sustrato hasta la interacción con otras proteínas (Birzele et al., 2008; Rosa et al., 2019).

Los resultados preliminares de PCR que se obtuvieron sugieren que la expresión del ARNm de esta isoforma es baja comparada con la isoforma canónica, como observamos en la (Figura 16-B), donde de manera muy interesante se observó una banda más visible con los cebadores de CY2S1 que amplifican de la región 1475 a la región 1656 (marcados como color amarillo para facilitar su identificación) que con los cebadores que van de la región 1312 a la 1616 (marcados en color azul para facilitar su identificación) (Figura 16-B). Esta banda se observó con más claridad en las condiciones de hipoxia con 25 ng y 50 ng. Sin embargo, hace falta completar los análisis para corroborar lo que hasta el momento se ha observado.

La espectrometría de masas (AP-MS) es un enfoque ampliamente utilizado para la identificación de interacciones proteína-proteína. Sin embargo, muchas veces la identificación es algo complicada debido a la abundante presencia de proteínas contaminantes (Mellacheruvu et al., 2013). Hasta el momento hemos logrado identificar algunas proteínas que participan en la adaptación celular al estrés hipóxico. Sin embargo, no hemos logrado identificar a CYP2S1. Esto podría deberse a la presencia

de proteínas contaminantes (Mellacheruvu et al., 2013) las cuales estén enmascarando la detección CYP2S1, ya que los extractos utilizados fueron de proteínas totales. Una posible solución sería el uso de una estrategia que permita solo la extracción de proteínas membranales y de microsomas, disminuyendo así la presencia de proteínas contaminantes. Además, el anticuerpo utilizado anti-CYP2S1 es un anticuerpo policlonal. De acuerdo con (Lipman, Jackson, Trudel, & Weis-Garcia, 2005) los anticuerpos policlonales son producidos por diferentes clonas de linfocitos B y estos anticuerpos tienen la capacidad de reconocer diferentes epítomos (Lipman et al., 2005). Por lo tanto, esta podría ser otra posibilidad por la cual no logramos identificar a CYP2S1 en los ensayos de inmunoprecipitación.

Se realizó un análisis bioinformático para predecir la estructura tridimensional de CYP2S1. Los resultados sugieren que la estructura tridimensional de ambas isoformas presenta diferencias, y estas diferencias se localizan principalmente en la región del amino terminal y carboxilo terminal. Estas diferencias se pueden deber a la extensión de aminoácidos que presenta la isoforma alternativa, Como ejemplo, podemos citar el trabajo de García y colaboradores. Ellos demostraron que la proteína llamada Piccolo presenta un inserto corto de nueve residuos lo que favorece el reordenamiento de la estructura y función del dominio C₂ (Garcia, Gerber, Sugita, Südhof, & Rizo, 2004). Sin embargo, estos resultados se deben considerar con cautela ya que son predicciones. Se tendrían que hacer análisis experimentales para tener un mejor conocimiento de la estructura de CYP2S1 y dilucidar si la extensión de 60 aminoácidos podría estar

afectando la estructura de la proteína ya que hay reportes que indican como es que la extensión de aa afecta la estructura de las proteínas.

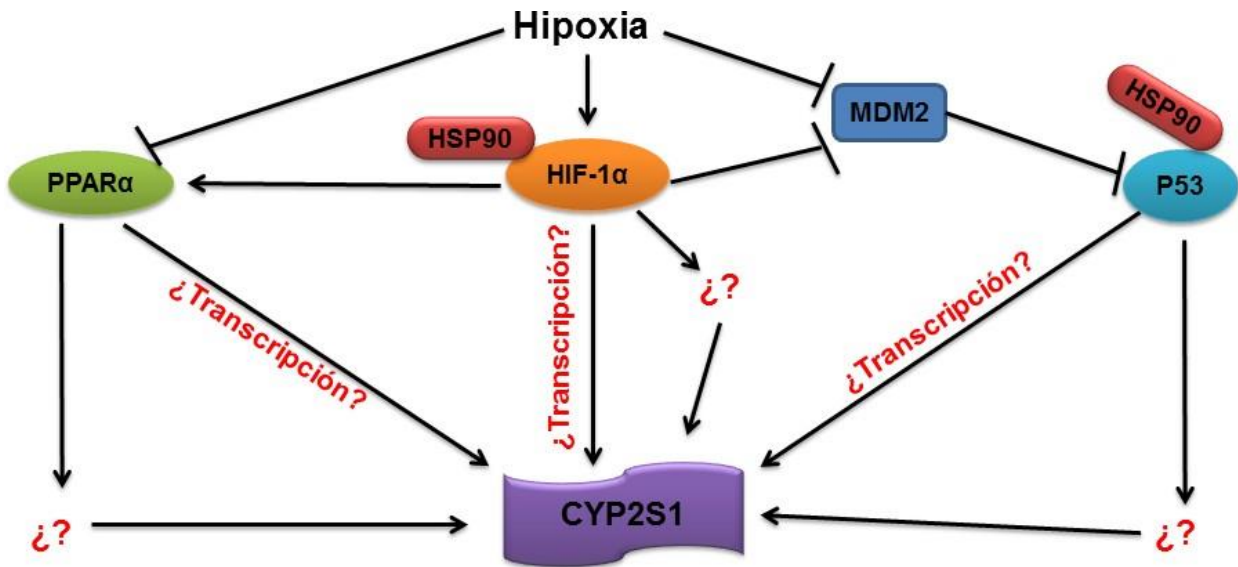


Figura 19. Vías de señalización que pudiesen estar regulando la expresión de CYP2S1 en hipoxia. HIF-1 α es el regulador maestro de la adaptación celular al estrés hipóxico, por lo tanto esta vía puede ser la principal en la expresión de CYP2S1. Además se propone que puede haber otras vías implicadas en la regulación de este citocromo como la vía de p53 y PPAR α .

7. Conclusiones

En conjunto los datos publicados por nuestro grupo y los preliminares presentados en este trabajo muestran que las líneas celulares utilizadas se comportan de forma distinta cuando están en un microambiente hipóxico ya que la expresión de CYP2S1 en células

HepG2 y Hep3B es diferente. Asimismo la información publicada en la literatura sugiere que hay una relación entre CYP2S1 y otras vías no canónicas que se activan durante la hipoxia las cuales pueden repercutir en el comportamiento de la célula y la expresión de diferentes genes como CYP2S1. Además dicha información sugiere que el fármaco antineoplásico oxalapatino y la molécula crisina pueden ser 2 nuevos sustratos de CYP2S1, abriendo así un nuevo panorama a investigar sobre la importancia de este citocromo, el tratamiento y la resistencia a fármacos provocada por la hipoxia. A partir de los resultados observados y de la discusión, las perspectivas se orientan primeramente en completar los ensayos de análisis de ARNm de CYP2S1 en células Hep3B y SNU423 y dilucidar bien cuál es el efecto de la hipoxia sobre este citocromo. Después sería interesante analizar cuál o cuáles vías de señalización están participando en la expresión de CYP2S1 y también cual es el papel de este citocromo en la biotransformación de oxalapatino y crisina.

8. Apéndice

Los antecedentes directos de la presente tesis, fueron publicados en el siguiente artículo de investigación:

“Hypoxia as a modulator cytochrome P450: Overexpression of the cytochromes CYP2S1 and CYP24A1 in human liver cancer cells in hypoxia”

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbf.3612>.


Received: 7 September 2020 | Revised: 30 November 2020 | Accepted: 13 December 2020

DOI: 10.1002/cbf.3612

RESEARCH ARTICLE

CELL BIOCHEMISTRY & FUNCTION WILEY

Hypoxia as a modulator of cytochromes P450: Overexpression of the cytochromes CYP2S1 and CYP24A1 in human liver cancer cells in hypoxia

Alfredo Cabrera-Cano^{1,2} | Víctor Manuel Dávila-Borja²  |
Sergio Juárez-Méndez²  | Jaime Marcial-Quino^{3,4}  | Saúl Gómez-Manzo³  |
Rosa Angélica Castillo-Rodríguez^{2,4} 

¹Posgrado en Biología Experimental, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

²Laboratorio de Oncología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

³Laboratorio de Bioquímica Genética, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

⁴CONACYT, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

9. Referencias

- Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clin Liver Dis*, 21(1), 1-20. doi:10.1016/j.cld.2016.08.001
- An, W. G., Kanekal, M., Simon, M. C., Maltepe, E., Blagosklonny, M. V., & Neckers, L. M. (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature*, 392(6674), 405-408. doi:10.1038/32925
- Arneth, B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas)*, 56(1). doi:10.3390/medicina56010015
- Baralle, F. E., & Giudice, J. (2017). Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(7), 437-451. doi:10.1038/nrm.2017.27
- Beiras, R. (2018). Chapter 12 - Biotransformation. In R. Beiras (Ed.), *Marine Pollution* (pp. 205-214): Elsevier.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D., & Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo j*, 22(16), 4082-4090. doi:10.1093/emboj/cdg392
- Birzele, F., Csaba, G., & Zimmer, R. (2008). Alternative splicing and protein structure evolution. *Nucleic Acids Res*, 36(2), 550-558. doi:10.1093/nar/gkm1054
- Bui, P., Imaizumi, S., Beedanagari, S. R., Reddy, S. T., & Hankinson, O. (2011). Human CYP2S1 metabolizes cyclooxygenase- and lipoxygenase-derived eicosanoids. *Drug Metab Dispos*, 39(2), 180-190. doi:10.1124/dmd.110.035121

- Bui, P. H., Hsu, E. L., & Hankinson, O. (2009). Fatty acid hydroperoxides support cytochrome P450 2S1-mediated bioactivation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol. *Mol Pharmacol*, 76(5), 1044-1052. doi:10.1124/mol.109.057760
- Bustin, S. A., Mueller, R., & Nolan, T. (2020). Parameters for Successful PCR Primer Design. *Methods Mol Biol*, 2065, 5-22. doi:10.1007/978-1-4939-9833-3_2
- Cabrera-Cano, A., Dávila-Borja, V. M., Juárez-Méndez, S., Marcial-Quino, J., Gómez-Manzo, S., & Castillo-Rodríguez, R. A. (2021). Hypoxia as a modulator of cytochromes P450: Overexpression of the cytochromes CYP2S1 and CYP24A1 in human liver cancer cells in hypoxia. *Cell Biochem Funct*, 39(4), 478-487. doi:10.1002/cbf.3612
- Campbell, M. J., & Trump, D. L. (2017). Vitamin D Receptor Signaling and Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 46(4), 1009-1038. doi:10.1016/j.ecl.2017.07.007
- Chambers, K. F., Day, P. E., Aboufarrag, H. T., & Kroon, P. A. (2019). Polyphenol Effects on Cholesterol Metabolism via Bile Acid Biosynthesis, CYP7A1: A Review. *Nutrients*, 11(11). doi:10.3390/nu11112588
- Chaudhary, S., Khokhar, W., Jabre, I., Reddy, A. S. N., Byrne, L. J., Wilson, C. M., & Syed, N. H. (2019). Alternative Splicing and Protein Diversity: Plants Versus Animals. *Front Plant Sci*, 10, 708. doi:10.3389/fpls.2019.00708
- Chipurupalli, S., Kannan, E., Tergaonkar, V., D'Andrea, R., & Robinson, N. (2019). Hypoxia Induced ER Stress Response as an Adaptive Mechanism in Cancer. *Int J Mol Sci*, 20(3). doi:10.3390/ijms20030749

- Chong, G. O., Han, H. S., Lee, S. D., & Lee, Y. H. (2020). Improvement in RNA quantity and quality in cervico-vaginal cytology. *Virology*, *17*(1), 8. doi:10.1186/s12985-020-1282-x
- Cicinnati, V. R., Shen, Q., Sotiropoulos, G. C., Radtke, A., Gerken, G., & Beckebaum, S. (2008). Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer*, *8*, 350. doi:10.1186/1471-2407-8-350
- Cook, D. J., Finnigan, J. D., Cook, K., Black, G. W., & Charnock, S. J. (2016). Cytochromes P450: History, Classes, Catalytic Mechanism, and Industrial Application. *Adv Protein Chem Struct Biol*, *105*, 105-126. doi:10.1016/bs.apcsb.2016.07.003
- Cree, I. A., & Charlton, P. (2017). Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer*, *17*(1), 10. doi:10.1186/s12885-016-2999-1
- Crettol, S., Petrovic, N., & Murray, M. (2010). Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Curr Pharm Des*, *16*(2), 204-219. doi:10.2174/138161210790112674
- Dancygier, H. (2010). Hepatic Biotransformation. In H. Dancygier (Ed.), *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases* (pp. 127-130). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C. A., Buendia, M. A., Soubrane, O., . . . Perret, C. (1998). Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(15), 8847-8851. doi:10.1073/pnas.95.15.8847

- Deb, S., & Bandiera, S. M. (2010). Characterization of a new cytochrome P450 enzyme, CYP2S1, in rats: its regulation by aryl hydrocarbon receptor agonists. *Toxicology*, 267(1-3), 91-98. doi:10.1016/j.tox.2009.10.025
- Dekant, W. (2009). The role of biotransformation and bioactivation in toxicity. *Exs*, 99, 57-86. doi:10.1007/978-3-7643-8336-7_3
- Downie, D., McFadyen, M. C., Rooney, P. H., Cruickshank, M. E., Parkin, D. E., Miller, I. D., . . . Murray, G. I. (2005). Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clin Cancer Res*, 11(20), 7369-7375. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-05-0466
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., . . . Ratcliffe, P. J. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1), 43-54. doi:10.1016/s0092-8674(01)00507-4
- Fako, V., Yu, Z., Henrich, C. J., Ransom, T., Budhu, A. S., & Wang, X. W. (2016). Inhibition of wnt/ β -catenin Signaling in Hepatocellular Carcinoma by an Antipsychotic Drug Pimozide. *Int J Biol Sci*, 12(7), 768-775. doi:10.7150/ijbs.14718
- Farc, O., & Cristea, V. (2021). An overview of the tumor microenvironment, from cells to complex networks (Review). *Exp Ther Med*, 21(1), 96. doi:10.3892/etm.2020.9528
- Fradette, C., & du Souich, P. (2003). Hypoxia-inducible factor-1 and activator protein-1 modulate the upregulation of CYP3A6 induced by hypoxia. *Br J Pharmacol*, 140(6), 1146-1154. doi:10.1038/sj.bjp.0705543

- Garcia, J., Gerber, S. H., Sugita, S., Südhof, T. C., & Rizo, J. (2004). A conformational switch in the Piccolo C2A domain regulated by alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol*, 11(1), 45-53. doi:10.1038/nsmb707
- Goldstein, I., Rivlin, N., Shoshana, O. Y., Ezra, O., Madar, S., Goldfinger, N., & Rotter, V. (2013). Chemotherapeutic agents induce the expression and activity of their clearing enzyme CYP3A4 by activating p53. *Carcinogenesis*, 34(1), 190-198. doi:10.1093/carcin/bgs318
- Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L., & Bradfield, C. A. (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr*, 7(3), 205-213.
- Guengerich, F. P. (2018). Mechanisms of Cytochrome P450-Catalyzed Oxidations. *ACS Catal*, 8(12), 10964-10976. doi:10.1021/acscatal.8b03401
- Guengerich, F. P. (2019). Cytochrome P450 research and The Journal of Biological Chemistry. *J Biol Chem*, 294(5), 1671-1680. doi:10.1074/jbc.TM118.004144
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hankinson, O. (2016). The role of AHR-inducible cytochrome P450s in metabolism of polyunsaturated fatty acids. *Drug Metab Rev*, 48(3), 342-350. doi:10.1080/03602532.2016.1197240
- Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., & Imura, N. (2001). Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 287(4), 808-813. doi:10.1006/bbrc.2001.5659

- Harris, S. L., & Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17), 2899-2908. doi:10.1038/sj.onc.1208615
- Harvey, S. E., Lyu, J., & Cheng, C. (2021). Methods for Characterization of Alternative RNA Splicing. *Methods Mol Biol*, 2372, 209-222. doi:10.1007/978-1-0716-1697-0_19
- Höckel, M., & Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, 93(4), 266-276. doi:10.1093/jnci/93.4.266
- Hughes, D., Guttenplan, J. B., Marcus, C. B., Subbaramaiah, K., & Dannenberg, A. J. (2008). Heat shock protein 90 inhibitors suppress aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of CYP1A1 and CYP1B1 transcription and DNA adduct formation. *Cancer Prev Res (Phila)*, 1(6), 485-493. doi:10.1158/1940-6207.Capr-08-0149
- Ivey, J. W., Bonakdar, M., Kanitkar, A., Davalos, R. V., & Verbridge, S. S. (2016). Improving cancer therapies by targeting the physical and chemical hallmarks of the tumor microenvironment. *Cancer Lett*, 380(1), 330-339. doi:10.1016/j.canlet.2015.12.019
- Jancova, P., Anzenbacher, P., & Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 154(2), 103-116. doi:10.5507/bp.2010.017
- Jin, M. Z., & Jin, W. L. (2020). The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1), 166. doi:10.1038/s41392-020-00280-x

- Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2016). The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu Rev Biochem*, *85*, 375-404.
doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014710
- Karlgren, M., Miura, S., & Ingelman-Sundberg, M. (2005). Novel extrahepatic cytochrome P450s. *Toxicol Appl Pharmacol*, *207*(2 Suppl), 57-61.
doi:10.1016/j.taap.2004.12.022
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, *10*(6), 845-858. doi:10.1038/nprot.2015.053
- Khacho, M., Tarabay, M., Patten, D., Khacho, P., MacLaurin, J. G., Guadagno, J., . . . Slack, R. S. (2014). Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell survival. *Nat Commun*, *5*, 3550.
doi:10.1038/ncomms4550
- Khor, C. Y., & Khoo, B. Y. (2020). PPAR α plays an important role in the migration activity, and the expression of CYP2S1 and CYP1B1 in chrysin-treated HCT116 cells. *Biotechnol Lett*, *42*(8), 1581-1595. doi:10.1007/s10529-020-02904-2
- Koppel, N., Maini Rekdal, V., & Balskus, E. P. (2017). Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*, *356*(6344).
doi:10.1126/science.aag2770
- Koumenis, C., Alarcon, R., Hammond, E., Sutphin, P., Hoffman, W., Murphy, M., . . . Giaccia, A. (2001). Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol*, *21*(4), 1297-1310. doi:10.1128/mcb.21.4.1297-1310.2001

- Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C., & Bishop, D. J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS One*, *13*(5), e0196438. doi:10.1371/journal.pone.0196438
- Kumarakulasingham, M., Rooney, P. H., Dundas, S. R., Telfer, C., Melvin, W. T., Curran, S., & Murray, G. I. (2005). Cytochrome p450 profile of colorectal cancer: identification of markers of prognosis. *Clin Cancer Res*, *11*(10), 3758-3765. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-04-1848
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., & Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open*, *7*, 1-9. doi:10.1016/j.biopen.2018.05.001
- Lewis, D. F., & Pratt, J. M. (1998). The P450 catalytic cycle and oxygenation mechanism. *Drug Metab Rev*, *30*(4), 739-786. doi:10.3109/03602539808996329
- Li, Y., Farmer, R. W., Yang, Y., & Martin, R. C. G. (2016). Epithelial cell adhesion molecule in human hepatocellular carcinoma cell lines: a target of chemoresistance. *BMC Cancer*, *16*(1), 228. doi:10.1186/s12885-016-2252-y
- Li, Y., Su, X., Feng, C., Liu, S., Guan, H., Sun, Y., . . . Hou, P. (2020). CYP2S1 is a synthetic lethal target in BRAF(V600E)-driven thyroid cancers. *Signal Transduct Target Ther*, *5*(1), 191. doi:10.1038/s41392-020-00231-6
- Lin, C.-A., Chang, L.-L., Zhu, H., He, Q.-J., & Yang, B. (2018). Hypoxic microenvironment and hepatocellular carcinoma treatment. *Hepatoma Research*, *4*, 26. doi:10.20517/2394-5079.2018.27

- Liou, A. T., Chen, M. F., & Yang, C. W. (2017). Curcumin Induces p53-Null Hepatoma Cell Line Hep3B Apoptosis through the AKT-PTEN-FOXO4 Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 4063865. doi:10.1155/2017/4063865
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *Ilar j*, 46(3), 258-268. doi:10.1093/ilar.46.3.258
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Manikandan, P., & Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets*, 19(1), 38-54. doi:10.2174/1389450118666170125144557
- Mantovani, F., Collavin, L., & Del Sal, G. (2019). Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ*, 26(2), 199-212. doi:10.1038/s41418-018-0246-9
- McDonnell, A. M., & Dang, C. H. (2013). Basic review of the cytochrome p450 system. *J Adv Pract Oncol*, 4(4), 263-268. doi:10.6004/jadpro.2013.4.4.7
- McKeown, S. R. (2014). Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol*, 87(1035), 20130676. doi:10.1259/bjr.20130676
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A. L., Lambert, J. P., St-Denis, N. A., Li, T., . . . Nesvizhskii, A. I. (2013). The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods*, 10(8), 730-736. doi:10.1038/nmeth.2557

- Meunier, B., de Visser, S. P., & Shaik, S. (2004). Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem Rev*, *104*(9), 3947-3980.
doi:10.1021/cr020443g
- Narravula, S., & Colgan, S. P. (2001). Hypoxia-inducible factor 1-mediated inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression during hypoxia. *J Immunol*, *166*(12), 7543-7548. doi:10.4049/jimmunol.166.12.7543
- Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., . . . et al. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*, *6*(1), 1-11. doi:10.1089/dna.1987.6.1
- Nebert, D. W., Wikvall, K., & Miller, W. L. (2013). Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *368*(1612), 20120431.
doi:10.1098/rstb.2012.0431
- Nelson, D. R. (2013). A world of cytochrome P450s. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *368*(1612), 20120430. doi:10.1098/rstb.2012.0430
- Nelson, D. R., Zeldin, D. C., Hoffman, S. M., Maltais, L. J., Wain, H. M., & Nebert, D. W. (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*, *14*(1), 1-18.
doi:10.1097/00008571-200401000-00001
- Nishida, C. R., Lee, M., & de Montellano, P. R. (2010). Efficient hypoxic activation of the anticancer agent AQ4N by CYP2S1 and CYP2W1. *Mol Pharmacol*, *78*(3), 497-502. doi:10.1124/mol.110.065045

- Obacz, J., Pastorekova, S., Vojtesek, B., & Hrstka, R. (2013). Cross-talk between HIF and p53 as mediators of molecular responses to physiological and genotoxic stresses. *Mol Cancer*, *12*(1), 93. doi:10.1186/1476-4598-12-93
- Omura, T. (2011). Recollection of the early years of the research on cytochrome P450. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, *87*(10), 617-640. doi:10.2183/pjab.87.617
- Ota, T., Suzuki, Y., Nishikawa, T., Otsuki, T., Sugiyama, T., Irie, R., . . . Sugano, S. (2004). Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet*, *36*(1), 40-45. doi:10.1038/ng1285
- Pandian, B. A., Sathishraj, R., Djanaguiraman, M., Prasad, P. V. V., & Jugulam, M. (2020). Role of Cytochrome P450 Enzymes in Plant Stress Response. *Antioxidants (Basel)*, *9*(5). doi:10.3390/antiox9050454
- Papi, A., Storci, G., Guarnieri, T., De Carolis, S., Bertoni, S., Avenia, N., . . . Bonafé, M. (2013). Peroxisome proliferator activated receptor- α /hypoxia inducible factor-1 α interplay sustains carbonic anhydrase IX and apolipoprotein E expression in breast cancer stem cells. *PLoS One*, *8*(1), e54968. doi:10.1371/journal.pone.0054968
- Parvez, M., Qhanya, L. B., Mthakathi, N. T., Kgosiemang, I. K., Bamal, H. D., Pagadala, N. S., . . . Syed, K. (2016). Molecular evolutionary dynamics of cytochrome P450 monooxygenases across kingdoms: Special focus on mycobacterial P450s. *Sci Rep*, *6*, 33099. doi:10.1038/srep33099
- Pawlak, M., Lefebvre, P., & Staels, B. (2015). Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, *62*(3), 720-733.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.039>

- Petrova, V., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., & Amelio, I. (2018). The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis*, 7(1), 10. doi:10.1038/s41389-017-0011-9
- Prince, T. L., Kijima, T., Tatokoro, M., Lee, S., Tsutsumi, S., Yim, K., . . . Neckers, L. (2015). Client Proteins and Small Molecule Inhibitors Display Distinct Binding Preferences for Constitutive and Stress-Induced HSP90 Isoforms and Their Conformationally Restricted Mutants. *PLoS One*, 10(10), e0141786. doi:10.1371/journal.pone.0141786
- Qiu, G. H., Xie, X., Xu, F., Shi, X., Wang, Y., & Deng, L. (2015). Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. *Cytotechnology*, 67(1), 1-12. doi:10.1007/s10616-014-9761-9
- Rivera, S. P., Saarikoski, S. T., & Hankinson, O. (2002). Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450. *Mol Pharmacol*, 61(2), 255-259. doi:10.1124/mol.61.2.255
- Rivera, S. P., Wang, F., Saarikoski, S. T., Taylor, R. T., Chapman, B., Zhang, R., & Hankinson, O. (2007). A novel promoter element containing multiple overlapping xenobiotic and hypoxia response elements mediates induction of cytochrome P4502S1 by both dioxin and hypoxia. *J Biol Chem*, 282(15), 10881-10893. doi:10.1074/jbc.M609617200
- Rives, M. L., Javitch, J. A., & Wickenden, A. D. (2017). Potentiating SLC transporter activity: Emerging drug discovery opportunities. *Biochem Pharmacol*, 135, 1-11. doi:10.1016/j.bcp.2017.02.010

- Rodriguez-Antona, C., & Ingelman-Sundberg, M. (2006). Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*, *25*(11), 1679-1691. doi:10.1038/sj.onc.1209377
- Rodríguez-Hernández, M. A., Chapresto-Garzón, R., Cadenas, M., Navarro-Villarán, E., Negrete, M., Gómez-Bravo, M. A., . . . Muntané, J. (2020). Differential effectiveness of tyrosine kinase inhibitors in 2D/3D culture according to cell differentiation, p53 status and mitochondrial respiration in liver cancer cells. *Cell Death Dis*, *11*(5), 339. doi:10.1038/s41419-020-2558-1
- Rodriguez, M., & Potter, D. A. (2013). CYP1A1 regulates breast cancer proliferation and survival. *Mol Cancer Res*, *11*(7), 780-792. doi:10.1158/1541-7786.Mcr-12-0675
- Rosa, R., Villegas-Ruíz, V., Caballero-Palacios, M. C., Pérez-López, E. I., Murata, C., Zapata-Tarres, M., . . . Juárez-Méndez, S. (2019). Expression of ZNF695 Transcript Variants in Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes (Basel)*, *10*(9). doi:10.3390/genes10090716
- Rylander, T., Neve, E. P., Ingelman-Sundberg, M., & Oscarson, M. (2001). Identification and tissue distribution of the novel human cytochrome P450 2S1 (CYP2S1). *Biochem Biophys Res Commun*, *281*(2), 529-535. doi:10.1006/bbrc.2001.4390
- Saarikoski, S. T., Rivera, S. P., Hankinson, O., & Husgafvel-Pursiainen, K. (2005). CYP2S1: a short review. *Toxicol Appl Pharmacol*, *207*(2 Suppl), 62-69. doi:10.1016/j.taap.2004.12.027
- Samanta, D., & Semenza, G. L. (2018). Metabolic adaptation of cancer and immune cells mediated by hypoxia-inducible factors. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, *1870*(1), 15-22. doi:10.1016/j.bbcan.2018.07.002

- Sedlacek, L. (1988). Biotransformations of steroids. *Crit Rev Biotechnol*, 7(3), 187-236.
doi:10.3109/07388558809146602
- Semenza, G. L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J Clin Invest*, 118(12), 3835-3837. doi:10.1172/jci37373
- Sermeus, A., & Michiels, C. (2011). Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death Dis*, 2(5), e164. doi:10.1038/cddis.2011.48
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2021). The Clustal Omega Multiple Alignment Package. *Methods Mol Biol*, 2231, 3-16. doi:10.1007/978-1-0716-1036-7_1
- Slany, A., Haudek, V. J., Zwickl, H., Gundacker, N. C., Grusch, M., Weiss, T. S., . . . Gerner, C. (2010). Cell characterization by proteome profiling applied to primary hepatocytes and hepatocyte cell lines Hep-G2 and Hep-3B. *J Proteome Res*, 9(1), 6-21. doi:10.1021/pr900057t
- Smith, G., Wolf, C. R., Deeni, Y. Y., Dawe, R. S., Evans, A. T., Comrie, M. M., . . . Ibbotson, S. H. (2003). Cutaneous expression of cytochrome P450 CYP2S1: individuality in regulation by therapeutic agents for psoriasis and other skin diseases. *Lancet*, 361(9366), 1336-1343. doi:10.1016/s0140-6736(03)13081-4
- Stanley, L. A. (2017). Chapter 27 - Drug Metabolism. In S. Badal & R. Delgoda (Eds.), *Pharmacognosy* (pp. 527-545). Boston: Academic Press.
- Tan, B. S., Tiong, K. H., Muruhadas, A., Randhawa, N., Choo, H. L., Bradshaw, T. D., . . . Leong, C. O. (2011). CYP2S1 and CYP2W1 mediate 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-fluorobenzothiazole (GW-610, NSC 721648) sensitivity in breast and colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 10(10), 1982-1992. doi:10.1158/1535-7163.Mct-11-0391

- Thomas, M., Bayha, C., Vetter, S., Hofmann, U., Schwarz, M., Zanger, U. M., & Braeuning, A. (2015). Activating and Inhibitory Functions of WNT/ β -Catenin in the Induction of Cytochromes P450 by Nuclear Receptors in HepaRG Cells. *Mol Pharmacol*, 87(6), 1013-1020. doi:10.1124/mol.114.097402
- Thomas, M., Burk, O., Klumpp, B., Kandel, B. A., Damm, G., Weiss, T. S., . . . Zanger, U. M. (2013). Direct transcriptional regulation of human hepatic cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α). *Mol Pharmacol*, 83(3), 709-718. doi:10.1124/mol.112.082503
- Thomas, M., Winter, S., Klumpp, B., Turpeinen, M., Klein, K., Schwab, M., & Zanger, U. M. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR α , directly regulates transcription of cytochrome P450 CYP2C8. *Front Pharmacol*, 6, 261. doi:10.3389/fphar.2015.00261
- Tian, H., McKnight, S. L., & Russell, D. W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, 11(1), 72-82. doi:10.1101/gad.11.1.72
- Trepiana, J., Meijide, S., Navarro, R., Hernández, M. L., Ruiz-Sanz, J. I., & Ruiz-Larrea, M. B. (2017). Influence of oxygen partial pressure on the characteristics of human hepatocarcinoma cells. *Redox Biol*, 12, 103-113. doi:10.1016/j.redox.2017.02.004
- Valencia-Cervantes, J., Huerta-Yepez, S., Aquino-Jarquín, G., Rodríguez-Enríquez, S., Martínez-Fong, D., Arias-Montaña, J. A., & Dávila-Borja, V. M. (2019). Hypoxia increases chemoresistance in human medulloblastoma DAOY cells via hypoxia-inducible factor 1 α -mediated downregulation of the CYP2B6, CYP3A4

- and CYP3A5 enzymes and inhibition of cell proliferation. *Oncol Rep*, 41(1), 178-190. doi:10.3892/or.2018.6790
- Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299-309. doi:10.1038/s41586-019-1730-1
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5510-5514. doi:10.1073/pnas.92.12.5510
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270(3), 1230-1237. doi:10.1074/jbc.270.3.1230
- Ward, P. S., & Thompson, C. B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*, 21(3), 297-308. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.014
- Westhouse, R. A., & Car, B. D. (2007). Chapter 9 - Concepts in Pharmacology and Toxicology. In G. C. Prendergast & E. M. Jaffee (Eds.), *Cancer Immunotherapy* (pp. 149-166). Burlington: Academic Press.
- Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45), 5904-5912. doi:10.1038/onc.2008.271
- Xu, C., Li, C. Y., & Kong, A. N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res*, 28(3), 249-268. doi:10.1007/bf02977789
- Yang, C., Zhou, Q., Li, M., Tong, X., Sun, J., Qing, Y., . . . Wan, C. (2016). Upregulation of CYP2S1 by oxaliplatin is associated with p53 status in colorectal cancer cell lines. *Sci Rep*, 6, 33078. doi:10.1038/srep33078

- Yu, T., Tang, B., & Sun, X. (2017). Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. *Yonsei Med J*, *58*(3), 489-496. doi:10.3349/ymj.2017.58.3.489
- Zhang, C., Liu, J., Wang, J., Zhang, T., Xu, D., Hu, W., & Feng, Z. (2021). The Interplay Between Tumor Suppressor p53 and Hypoxia Signaling Pathways in Cancer. *Front Cell Dev Biol*, *9*, 648808. doi:10.3389/fcell.2021.648808
- Zhang, Y., Qian, J., Gu, C., & Yang, Y. (2021). Alternative splicing and cancer: a systematic review. *Signal Transduct Target Ther*, *6*(1), 78. doi:10.1038/s41392-021-00486-7
- Zhu, C., Yu, J., Pan, Q., Yang, J., Hao, G., Wang, Y., . . . Cao, H. (2016). Hypoxia-inducible factor-2 alpha promotes the proliferation of human placenta-derived mesenchymal stem cells through the MAPK/ERK signaling pathway. *Sci Rep*, *6*, 35489. doi:10.1038/srep35489



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00238

Matrícula: 2193802132

Efecto de la hipoxia sobre la expresión del citocromo P450 CYP2S1 en células de cáncer de hígado.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 8 del mes de diciembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA
DR. JOSE ANTONIO VELAZQUEZ ARAGON
DR. SAUL GOMEZ MANZO
DRA. KARINA PASTEN HIDALGO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ALFREDO CABRERA CANO

ALFREDO CABRERA CANO
ALUMNO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL

DR. JOSE ANTONIO VELAZQUEZ ARAGON

VOCAL

DR. SAUL GOMEZ MANZO

SECRETARIA

DRA. KARINA PASTEN HIDALGO

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella