



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“Papel de NF- $\kappa$ B en la regulación de los citocromos P450 epoxigenasas durante un proceso inflamatorio desarrollado en astrocitos”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
CYNTHIA MARÍA NAVARRO MABARAK

DIRECTOR DE TESIS  
DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR  
DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. JULIO MORÁN ANDRADE  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*Dedico especialmente este trabajo  
a mi abuelita Adela  
y  
a Cristóbal, mi amado esposo  
por ser amor, por ser consejo, por ser paciencia, por ser pilares en mi vida.*

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio C-206 del Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre y en el laboratorio C-210 de la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el laboratorio del Dr. Alejandro Zentella Dehesa en la Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por ser la institución que me ha permitido crecer académicamente desde la licenciatura hasta mis estudios de posgrado.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Por la organización de todos los cursos, seminarios y congresos que enriquecieron mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (No. Apoyo 356644; Becario 289739). También por la beca otorgada posteriormente como ayudante de investigador.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por las becas otorgadas para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

A la Society for Neuroscience capítulo de la Ciudad México, por la beca de alojamiento que me proporcionaron para la asistencia a los congresos “Neuroscience 2015”, en Chicago IL, E.U.A. y “Neuroscience 2017”, en Washington DC, E.U.A.

A mi tutor principal, el Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por proporcionarme las herramientas para la realización de este trabajo, por su comprensión durante los momentos difíciles.

A la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, por formar parte de mi comité tutor, por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme asesoría cada vez que lo necesité, por su apoyo en la revisión del artículo de investigación y la tesis, por compartir conmigo su conocimiento y por sus consejos.

Al Dr. Julio Morán Andrade, por formar parte de mi comité tutor, por compartir conmigo su conocimiento en cada tutorial y apoyarme en la preparación y realización de mi examen de candidatura.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, por permitirme trabajar en su laboratorio en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por toda la ayuda teórica y consejos experimentales para el desarrollo de los Ensayos de Cambio en la Movilidad Electroforética, por los jalones de oreja, las pláticas amenas y los consejos.

A la Dra. Irma Guadalupe Mitre Aguilar, por el apoyo técnico y experimental para la realización de los Ensayos de Cambio en la Movilidad Electroforética en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Irma, muchas gracias por estar ahí conmigo, por enseñarme, tenerme paciencia y finalmente depositar tu confianza en mí para la realización de los experimentos, por las pláticas y los consejos.

Al Dr. Rafael Camacho Carranza, por participar activamente en los seminarios. Por todas las posadas y Halloweens

A los miembros del jurado para la obtención del grado: Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dra. Isabel Cristina Méndez Hernández, Dra. Aliesha

Araceli González Arenas y Dr. Óscar Próspero García, por la revisión de la tesis y sus valiosos comentarios.

A la Bióloga Sandra Luz Hernández Ojeda, por el apoyo técnico brindado para la realización de este trabajo. Sandy, muchas gracias por todo, el apoyo, los ánimos, las comidas, las salidas tarde donde nos acompañábamos, las pláticas y los consejos.

A la Dra. María Evangelina Ávila Muñoz por el apoyo técnico y consejos experimentales para la realización de los cultivos primarios de astrocitos. Eva, muchas gracias por tu paciencia.

Al Dr. Pavel Petrosyan, por el apoyo técnico brindado para la realización de este trabajo. Pavel, muchas gracias por siempre estar ahí viendo lo que uno pudiera estar haciendo mal, agradezco tus consejos experimentales y tus pildoritas culturales, principalmente de música clásica.

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

A la M. en C. María Guadalupe Domínguez Macouzet por el apoyo técnico para la realización de los cultivos primarios de astrocitos. Lupita, gracias por el apoyo que siempre me brindaste.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, por el apoyo técnico y experimental para la realización de las inmunofluorescencias dentro de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Miguel, muchas gracias por todo, por las pláticas y las risas.

Al M.V.Z Jorge Omar García Rebollar por el apoyo técnico en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por proveer los animales y estar siempre al pendiente. Jorge, muchas gracias por tu disposición y ayuda.

A Omar Rangel Rivera, por el apoyo técnico dentro de la sección de cómputo del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Omar, muchas gracias por tu disposición y ayuda.

A Betsabé Linares Ferrer, por el apoyo técnico dentro de la sección de cómputo del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Betsabé, muchas gracias por tu disposición y ayuda.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A mis padres, Elizabeth y Sergio, por apoyarme, quererme y siempre estar ahí para mí. Los amo.

A mi familia, a mis padres, a mi abuelita Adela, a mis tíos Paty, Adela, Rafael, Paty C, Constanza, Miguel, Adriana y Alejandra, por todo su apoyo y cariño, principalmente en los momentos difíciles, sin su apoyo, el logro de este objetivo hubiera sido mucho más difícil.

A Jimena, Carla González, Cynthia Paola, Eduardo, Claudia, Paty, Karen y Fabiola, por brindarme siempre un respiro, por acompañarme y permanecer en mi vida, por todas las pláticas, cafés, desayunos, comidas o cenas donde nos poníamos al corriente de nuestras vidas, por todos los consejos, risas, abrazos, penas y alegrías compartidas.

A Carla Garza y Carlitos Iván, por ser mi compañeros y amigos del doctorado. Gracias por siempre escucharme y hacerme saber que estaban ahí si necesitaba desahogarme o celebrar, reír o llorar, por compartir tragos amargos y momentos de felicidad.

A Lucio y Daniela, por tantas risas, consejos experimentales y personales, por los viajes, por los congresos, por las pláticas, por las risas, gracias por compartir buenos momentos conmigo.

A Moni y Raúl, por se los alumnos que siempre pedí, pero principalmente por ser mis amigos, gracias por su sinceridad en los momentos precisos. Con ustedes aprendí mucho. Muchas gracias por todo. Moni, gracias por hacerme sentir orgullosa de ti, por permitirme ser parte de tu crecimiento académico, por enseñarme a ser paciente, por tu optimismo, por tus ánimos (incluso para ir al gym) y por compartir conmigo muy buenos momentos incluso a lado de mi familia. Gracias por confiar en mi y brindarme tu amistad.

A Ana Valencia, por todos los consejos académicos y personales, que, sin importar la distancia, me ayudaron muchísimo. Anita, siempre sentí que eras mi hermana mayor académica. Muchas gracias por todo.

A los Chicos del Lab, Carlos Belman, Moni, Raúl, Rebe, Anitla, Laurel y Sandy. Muchas gracias por tantos buenos momentos, por las carcajadas que se escuchaban hasta abajo, por las películas, por los días interminables de trabajo que se aligeraban con música y un intermedio de pizza, por las posadas, por los Halloweens, por los intercambios, por los “amigos secretos”, en fin, una lista enorme de buenos momentos que quedarán por siempre en mi memoria.

A Cris, por ser parte fundamental de esta etapa en mi vida... ¡Y lo que falta! Nuestra vida, juntos, espera. En este espacio no caben las palabras para describir todo lo que significas para mí, pero tú lo sabes. Muchas gracias por todo tu amor, apoyo y comprensión, gracias por ser mi compañero de vida, mi mejor amigo y mi esposo. Te amo. Juntos, podemos.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>1. ABREVIATURAS</b> .....  | 6  |
| <b>2. RESUMEN</b> .....   | 8  |
| <b>3. ABSTRACT</b> .....  | 9  |
| <b>4. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 11 |
| 4.1 La inflamación.....   | 11 |
| 4.1.1 El NF- $\kappa$ B.....  | 11 |
| 4.2 Los citocromos P450.....  | 12 |
| 4.2.1 Descubrimiento de los citocromos P450.....                                      | 13 |
| 4.2.2 Características generales de los CYP.....                                       | 14 |
| 4.2.3 Los CYP en el cerebro.....  | 15 |
| 4.2.3.1 Los CYP en los astrocitos.....  | 16 |
| 4.2.4 Los CYP con actividad epoxigenasa.....  | 17 |
| 4.2.4.1 Actividad anti-inflamatoria de los EET.....                                   | 20 |
| 4.2.5 Los CYP con actividad epoxigenasa en el cerebro.....                            | 22 |
| 4.2.5.1 El efecto neuroprotector de los EETs.....                                     | 22 |
| 4.3 Regulación de los CYP durante procesos inflamatorios.....                         | 23 |
| 4.3.1 Papel de NF- $\kappa$ B en la regulación de los CYP durante la inflamación..... | 23 |
| <b>5. ANTECEDENTES</b> .....  | 25 |
| <b>6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....  | 27 |
| <b>7. HIPÓTESIS</b> .....   | 28 |
| <b>8. OBJETIVO GENERAL</b> .....  | 28 |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>9. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>  | <b>29</b> |
| 10.1 Reactivos.....  | 29        |
| 10.2 Cultivo primario de astrocitos de rata.....   | 29        |
| 10.3 Tratamiento de los astrocitos con LPS y LPS + IMD-0354.....   | 30        |
| 10.4 Determinación de los niveles de CYP2J3 y CYP2C11 por inmunofluorescencia....  | 31        |
| 10.5 Cuantificación de TNF- $\alpha$ del sobrenadante de los cultivos.....   | 31        |
| 10.6 Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA.....  | 32        |
| 10.7 Cuantificación de la expresión del mRNA por qRT-PCR.....  | 32        |
| 10.8 Obtención y cuantificación de proteínas totales a partir de los astrocitos.....   | 32        |
| 10.9 Inmunodetección por Western Blot.....   | 33        |
| 10.10 Determinación de la cantidad de 11,12-DHET + 11,12-EET a partir del cultivo primario de astrocitos.....                                | 33        |
| 10.11 Obtención de las fracciones nucleares y las proteínas nucleares.....   | 34        |
| 10.12 Inmunodetección de p65 (NF- $\kappa$ B) a partir de los extractos nucleares de los astrocitos.....                                     | 35        |
| 10.13 Análisis de secuencias de la base de datos.....  | 36        |
| 10.14 Construcción de los oligonucleótidos con la presencia de las secuencias de unión a NF- $\kappa$ B encontradas bioinformáticamente..... | 36        |
| 10.15 Marcaje de los oligonucleótidos con $\gamma^{32}$ P-ATP.....   | 38        |
| 10.16 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA).....                                     | 38        |
| 10.17 Análisis estadístico.....  | 39        |
| <b>11. RESULTADOS.....</b>   | <b>40</b> |
| 11.1 El cultivo primario de astrocitos está conformado por 99% de células positivas a GFAP y negativas para Iba-1.....                       | 40        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 11.2       | El tratamiento con LPS induce la secreción de TNF- $\alpha$ por los astrocitos.....  | 41        |
| 11.3       | La inflamación inducida por LPS disminuye la expresión del <i>Cyp2j3</i> y <i>Cyp2c11</i> , y este efecto se previene cuando se inhibe la vía de NF- $\kappa$ B.....                                   | 42        |
| 11.4       | Los niveles de proteína del CYP2J3 y CYP2C11 son disminuidos por el tratamiento con LPS de forma dependiente de la dosis.....  | 44        |
| 11.5       | La inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B previno parcialmente la disminución dependiente de LPS de los niveles de proteína del CYP2J3 y del CYP2C11.....  | 48        |
| 11.6       | La actividad epoxigenasa total disminuye con el tratamiento con LPS.....   | 50        |
| 11.7       | NF- $\kappa$ B se encuentra presente en el núcleo de los astrocitos tratados con LPS.....  | 51        |
| 11.8       | NF- $\kappa$ B es capaz de unirse específicamente, pero con diferentes afinidades, a cuatro elementos de respuesta encontrados en las regiones promotoras del <i>Cyp2j3</i> y del <i>Cyp2c11</i> ..... | 52        |
| <b>12.</b> | <b>DISCUSIÓN.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>13.</b> | <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>14.</b> | <b>PERSPECTIVAS.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>15.</b> | <b>REFERENCIAS.....</b>  | <b>64</b> |
| <b>16.</b> | <b>ANEXOS.....</b>   | <b>71</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B.....   | 12 |
| Figura 2. Esquema del pico de absorción del citocromo P450 con diferentes donadores de electrones. Modificado de (Omura 2011).....  | 14 |
| Figura 3. Metabolismo del ácido araquidónico mediado por los CYP con actividad epoxigenasa.....   | 19 |
| Figura 4. Actividad anti-inflamatoria de los EETs. Modificado de (Shahabi <i>et al.</i> 2014).....  | 21 |
| Figura 5. Regulación de los CYP por NF- $\kappa$ B. Modificado de (Zordoky & El-Kadi 2009).....   | 24 |
| Figura 6. Niveles de expresión transcripcional de los CYP epoxigenasas durante un proceso inflamatorio sistémico en rata. Modificado de (Anwar-mohamed <i>et al.</i> 2010).....               | 25 |
| Figura 7. Niveles de expresión transcripcional de los CYP epoxigenasas en hígado durante un proceso inflamatorio sistémico en ratón. Modificado de (Theken <i>et al.</i> 2011).....           | 25 |
| Figura 8. Niveles de proteína (A) y actividad (B) de los CYP epoxigenasas en corazón durante un proceso inflamatorio sistémico en rata. Modificado de (Anwar-mohamed <i>et al.</i> 2010)..... | 26 |
| Figura 9. Alineación de los oligonucleótidos de cadena sencilla.....  | 37 |
| Figura 10. Conteo del número de núcleos por medio del software “MacBiophotonics ImageJ”....   | 40 |
| Figura 11. Pureza del cultivo primario de astrocitos.....   | 41 |
| Figura 12. Niveles de expresión relativa de <i>Cyp2j3</i> y <i>Cyp2c11</i> .....  | 43 |
| Figura 13. Efecto del tratamiento con LPS en los niveles de proteína del CYP2J3 en astrocitos....   | 45 |
| Figura 14. Efecto del tratamiento con LPS en los niveles de proteína del CYP2C11 en astrocitos..  | 47 |
| Figura 15. Efecto del inhibidor selectivo de NF- $\kappa$ B, IMD-0354, en la disminución dependiente de LPS de los niveles de proteína del CYP2J3 y CYP2C11.....                              | 49 |
| Figura 16. Actividad epoxigenasa total determinada como la producción de 11,12-EET + 11,12-DHET.....  | 50 |
| Figura 17. Ensayo de Inmunodetección por Western Blot de p65.....   | 51 |
| Figura 18. Predicciones de sitios de unión putativos de NF- $\kappa$ B.....   | 53 |
| Figura 19. Ensayo de Cambio en Movilidad Electroforética (EMSA) para secuencias putativas de unión dentro del promotor de <i>Cyp2j3</i> .....   | 54 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 20. Ensayo de Cambio en Movilidad Electroforética (EMSA) para secuencias putativas de unión dentro del promotor de <i>Cyp2c11</i> ..... | 55 |
| Figura 21. Ensayo de Supershift para las secuencias con mayor afinidad encontradas en el promotor del <i>Cyp2j3</i> .....                      | 56 |
| Figura 22. Ensayo de Supershift para las secuencias con mayor afinidad encontradas en el promotor del <i>Cyp2c11</i> .....                     | 57 |
| Figura 23. Controles de los ensayos de supershift y de competencias.....   | 59 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Localización y metabolismo de los CYP con relevancia clínica en el cerebro.....       | 17 |
| Tabla 2. Preparación del buffer hipotónico para la realización del EMSA.....                   | 35 |
| Tabla 3. Preparación del buffer hipertónico para la realización del EMSA.....                  | 35 |
| Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para el EMSA.....   | 37 |
| Tabla 5. Preparación de la reacción para marcar radiactivamente los oligonucleótidos.....      | 38 |
| Tabla 6. Conteo del número total de astrocitos por cultivo.....                                | 40 |
| Tabla 7. Producción de TNF- $\alpha$ por los astrocitos después de su tratamiento con LPS..... | 42 |

## 1. ABREVIATURAS

**AA:** ácido araquidónico

**AINE:** anti-inflamatorio no esteroideo

**AL:** ácido linoleico

**BME:** Eagle's Basal Medium

**cDNA:** ácido desoxirribonucleico complementario

**cIAP1:** proteína inhibidora de la apoptosis celular 1

**COX:** ciclooxigenasa

**CYP:** citocromo P450

**DE:** desviación estándar

**DHET:** ácido dihidroxieicosatrienóico

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EET:** ácido epoxieicosatrienóico

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)

**EMSA:** ensayo de cambio en la movilidad electroforética

**ERO:** especie reactiva de oxígeno

**GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GFAP:** proteína fibrilar acídica de la glia (glial fibrillary acidic protein)

**IL:** interleucina

**LOX:** lipooxigenasa

**LPS:** lipopolisacárido

**LT:** leucotrieno

**LX:** lipoxina

**MCF7:** Michigan Cancer Foundation 7, línea celular de cáncer de mama

**MPTP:** 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina

**mRNA:** ácido ribonucleico mensajero

**5-MT:** 5-metoxitriptamina

**NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido reducida

**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**PB:** amortiguador de fosfatos (phosphate buffer)

**PBS:** solución salina amortiguada con fosfatos (phosphate-buffered saline)

**PG:** prostaglandina

**PLA2:** fosfolipasa A2

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo (phenylmethylsulfonyl fluoride)

**PPAR:** Receptor activado proliferador de peroxisomas

**PUFA:** ácido graso poliinsaturado

**sEH:** enzima epóxido hidrolasa soluble

**SFB:** suero fetal bovino

**SNC:** sistema nervioso central

**TBS:** solución salina amortiguada con Tris (Tris-buffered saline)

**TLR:** Receptor tipo Toll (Toll-like receptor)

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

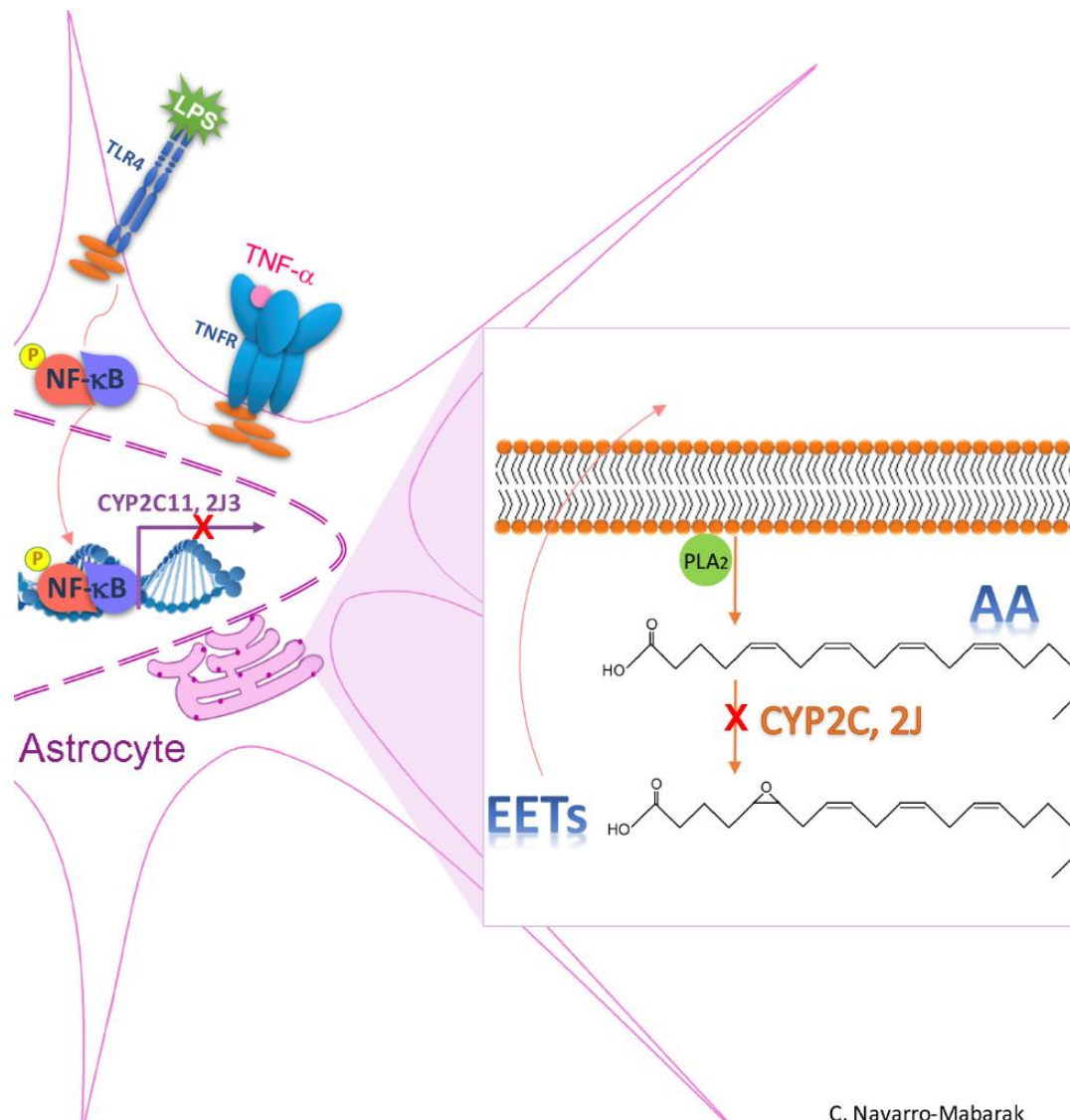
## 2. RESUMEN

Los citocromos P450 (CYP) con actividad de epoxigenasa y sus productos metabólicos, los ácidos epoxieicosatrienólicos (EETs), han sido propuestos como importantes blancos terapéuticos en el cerebro. Sin embargo, la expresión de los CYP puede ser modificada por la presencia de diversas citocinas pro-inflamatorias y la subsecuente activación de la vía de NF- $\kappa$ B. Se ha señalado que los CYP con actividad de epoxigenasa son regulados negativamente por la inflamación en el corazón, el riñón y el hígado. Sin embargo, hasta el momento, no ha habido evidencia alguna respecto a la regulación de los CYP epoxigenasas durante procesos inflamatorios en el cerebro. Por lo tanto, para explorar los efectos de la inflamación y la activación de NF- $\kappa$ B en la regulación de los CYP2J3 y CYP2C11, se trataron cultivos primarios de astrocitos con lipopolisacárido (LPS) con y sin la adición de IMD-0354 (inhibidor selectivo de NF- $\kappa$ B). Posteriormente, se determinó la expresión de los genes *Cyp2j3* y *Cyp2c11* mediante qRT-PCR; los niveles de las proteínas fueron determinados por inmunofluorescencia y por Western Blot y la actividad de epoxigenasa total se determinó mediante la cuantificación de los EETs por medio de un kit de ELISA. Además, se buscaron elementos de respuesta a NF- $\kappa$ B en la región de los promotores de *Cyp2c11* y *Cyp2j3* y se determinó si éstos eran capaces de unir complejos de NF- $\kappa$ B por medio de ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSAs). Los resultados muestran que el tratamiento con LPS es capaz de regular negativamente la expresión de los genes, los niveles de las proteínas y la actividad de los CYP2J3 y CYP2C11. Adicionalmente, se identificó a NF- $\kappa$ B como uno de los factores de transcripción involucrados en esta regulación.

### 3. ABSTRACT

Cytochrome P450 (CYP) epoxygenases and their metabolic products, epoxyeicosatrienoic acids (EETs), have been proposed as important therapeutic targets in the brain. However, CYP expression can be modified by the presence of diverse pro-inflammatory cytokines and the subsequent activation of the NF- $\kappa$ B pathway. It has been indicated that CYP epoxygenases are down-regulated by inflammation in the heart, kidney and liver. However, up to this point, there has been no evidence regarding regulation of CYP epoxygenases during inflammation in the brain. Therefore, in order to explore the effects of inflammation and NF- $\kappa$ B activation in CYP2J3 and CYP2C11 regulation, rat primary astrocytes cultures were treated with LPS with and without IMD-0354 (a selective NF- $\kappa$ B inhibitor). *Cyp2j3* and *Cyp2c11* mRNA expression was determined by qRT-PCR; protein expression was determined by immunofluorescence and by Western Blot and total epoxygenase activity was determined by the quantification of EETs by ELISA. To determine if each hypothetic response element was able to bind NF- $\kappa$ B complexes, NF- $\kappa$ B binding sites in *Cyp2j3* and *Cyp2c11* promoter regions were bioinformatically predicted and Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) were performed. Results shown that LPS treatment is able to down-regulate astrocyte CYP2J3 and CYP2C11 mRNA, protein and activity. Additionally, we have identified NK- $\kappa$ B as one of the transcription factors involved in this regulation.





C. Navarro-Mabarak

**Resumen gráfico (Graphical Abstract). Regulación de los citocromos P450 epoxigenasas durante un proceso inflamatorio en astrocitos.** La activación de la vía de NF-κB por un estímulo pro-inflamatorio como lo es el tratamiento con LPS, inhibe la expresión de los CYP2J3 y CYP2C11 desde la transcripción, al unirse NF-κB al promotor de sus genes. Por lo tanto, se inhibe también la concomitante producción de los ácidos epoxieicosatrienóicos a partir del ácido araquidónico. CYP: Citocromo P450; LPS: lipopolisacárido; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa; TLR4: receptor tipo Toll 4; TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral; NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; AA: ácido araquidónico; EETs: ácidos epoxieicosatrienóicos; PLA2: fosfolipasa A2. Modificado de (Navarro-Mabarak *et al.* 2019).

## 4. INTRODUCCIÓN

### 4.1 La inflamación

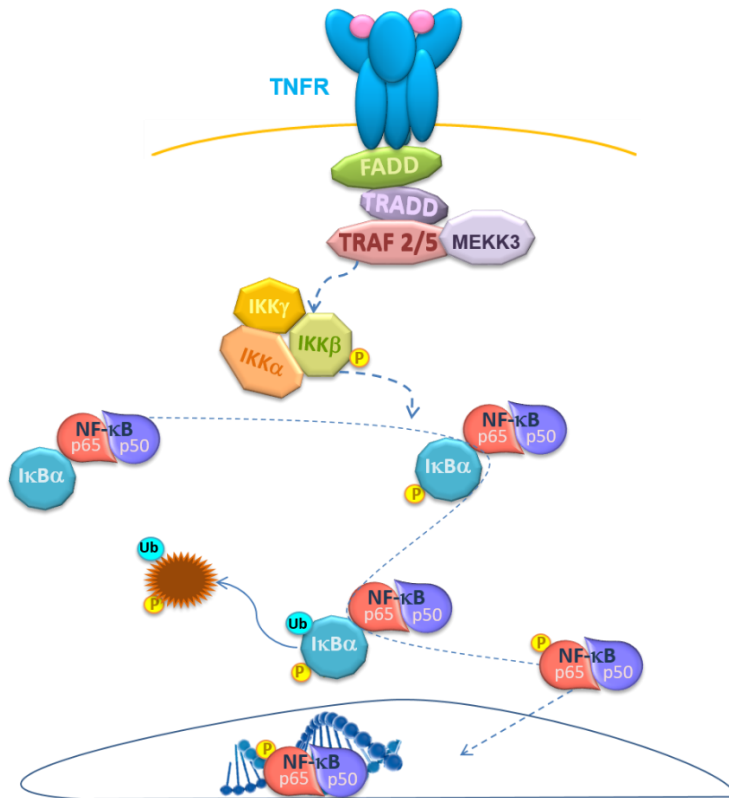
La inflamación es una respuesta biológica inespecífica que se produce en reacción a cualquier tipo de lesión corporal. Esta respuesta se da principalmente con el fin de eliminar los estímulos nocivos (patógenos, células dañadas, etc.) e iniciar el proceso de curación y reparación tisular. Una de las primeras respuestas del sistema inmunitario innato frente a la infección y el daño tisular es la secreción de citocinas por las células tisulares. Tres de las citocinas pro-inflamatorias más importantes del sistema inmunitario innato son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 1 (IL-1) y la interleucina 6 (IL-6), que, junto a las quimiocinas, tienen múltiples efectos sobre las células endoteliales vasculares, los leucocitos y la médula ósea, ya que juntos aumentan el reparto local de células que pueden combatir las infecciones y reparar los tejidos. Los macrófagos tisulares y los mastocitos son la principal fuente de estas citocinas, aunque otros tipos celulares también las pueden producir. La unión de las citocinas pro-inflamatorias a sus receptores, lleva a una cascada de señalización que finalmente activa diferentes factores de transcripción. El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) es uno de los factores de transcripción activados por las citocinas y al mismo tiempo es esencial para su síntesis.

#### 4.1.1 El NF- $\kappa$ B

El NF- $\kappa$ B consiste en una familia de factores de transcripción que desempeñan un papel primordial en la inflamación, inmunidad, proliferación celular, diferenciación y supervivencia. Esta familia de factores de transcripción consta de cinco miembros, p50, p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB, codificados por *NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *REL* y *RELB*, respectivamente, los cuales comparten un dominio de homología Rel N-terminal (RHD) responsable de la unión al DNA y la homo- y heterodimerización. Los dímeros de NF- $\kappa$ B se unen a sitios  $\kappa$ B dentro de los promotores/potenciadores de genes blanco y regulan la transcripción a través del reclutamiento de coactivadores y correpresores (Hayden & Ghosh 2012).

En su estado latente, NF- $\kappa$ B se encuentra secuestrado en el citosol por su inhibidor I $\kappa$ B. Cuando se estimulan receptores inmunes innatos, como los TLRs (Toll-like receptors) y los receptores de citocinas, una serie de eventos en la membrana proximal conducen a la activación de la IKK (cinasa

de IκB). La fosforilación de las proteínas IκB resulta en su degradación proteasomal y la liberación de NF-κB para su traslocación nuclear y la activación de la transcripción génica (Napetschnig & Wu 2013) (Figura 1).



**Figura 1. Activación de la vía de señalización de NF-κB. Imagen elaborada para este trabajo.**

#### 4.2 Los citocromos P450

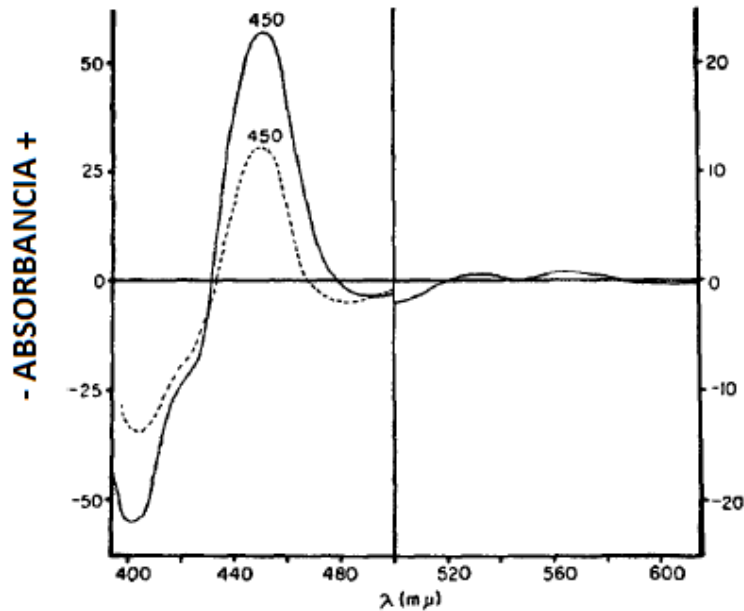
Los citocromos P450 (CYP) son un grupo amplio y diverso de enzimas membranales altamente conservadas en la naturaleza, situadas principalmente en el retículo endoplásmico de las células, aunque también se les puede encontrar en la mitocondria o la membrana plasmática. Estas enzimas se encuentran presentes en bacterias, plantas, animales e incluso en los virus. En el ser humano, se han encontrado 57 genes pertenecientes a algún CYP, y la búsqueda del papel endógeno de estas enzimas continúa. Los CYP catalizan principalmente la oxidación de compuestos orgánicos. La reacción más común mediante la cual lo llevan a cabo es la monoxigenación. Estas enzimas están

involucradas en el metabolismo del 75% de xenobióticos y fármacos, por lo que su estudio se ha enfocado principalmente en la relación que tienen éstas con la activación y eliminación de diversos compuestos en el organismo humano. Sin embargo, los CYP están presentes en diversos organismos y metabolizan una gran variedad de sustratos endógenos (colesterol, esteroides, hormonas, ácidos grasos) a intermediarios biológicamente activos (Dutheil *et al.* 2008).

#### **4.2.1 Descubrimiento de los citocromos P450**

En 1954 en la Universidad de Pensilvania, mientras se estudiaban las propiedades cinéticas de óxido-reducción del citocromo b5 en microsomas de hígado de rata, M. Klingenberg descubrió un nuevo pigmento que mostraba un gran pico de absorción a los 450 nm (Fig. 2) (Omura 2011). Este pigmento podía ser reducido con NADH y NADPH y se unía al monóxido de carbono (Klingenberg 2003). El estudio de este pigmento continuó y en 1962 Omura y Sato describieron su naturaleza hemoprotéica, nombrándolo P450 (P por pigmento y 450 por la longitud de onda a la que absorbía) (Omura & Sato 1962). Poco después, la función enzimática de este citocromo fue descrita por Estabrook y Cooper, quienes hallaron que el citocromo P450 estaba involucrado en la hidroxilación de la 17-hidroxiprogesterona en microsomas adrenales corticales y que, además, esta enzima era la encargada de activar el oxígeno molecular para llevar a cabo la reacción de hidroxilación (Cooper *et al.* 1963; Estabrook *et al.* 1963). Este mismo grupo de investigación confirmó la participación del citocromo P450 en el metabolismo oxidativo de varios fármacos por microsomas de hígado (Cooper *et al.* 1965). Después de esto, se identificó rápidamente que el CYP podía ser inducido en animales a través del pretratamiento con diversos fármacos y otros xenobióticos. También fue evidente, a través de purificación de proteínas, que existían múltiples formas del CYP en mamíferos y otras especies. Para la década de los 70s, ya se habían purificado diversas isoformas de los CYP y se habían determinado la especificidad de sus sustratos.

A partir de este momento, diversos grupos de investigación colaboraron en la descripción de esta familia enzimática y su versatilidad en el metabolismo de compuestos endógenos y xenobióticos.



**Figura 2. Esquema del pico de absorción del citocromo P450 con diferentes donadores de electrones. Modificado de (Omura 2011).**

#### 4.2.2 Características generales de los CYP

Los CYP son hemoproteínas de aproximadamente 500 aminoácidos y un grupo prostético de hierro-protoporfirina. El grupo prostético hemo es el centro catalítico de la enzima, el cual está unido de forma no covalente a la cadena polipeptídica. El hierro del grupo hemo fija oxígeno en el sitio activo del CYP, donde se realiza la oxidación de los sustratos. El  $H^+$  es aportado por la enzima NADPH-citocromo P450 oxidoreductasa y su cofactor NADPH. El metabolismo de un sustrato por parte de los CYP consume una molécula de  $O_2$  y genera un sustrato oxidado y una molécula de agua. Los CYP presentan una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que pueden catalizar, como en el elevado número de sustratos que son capaces de metabolizar. Si bien los CYP intervienen fundamentalmente en reacciones de oxidación, también son capaces de catalizar reducciones, hidrataciones o hidrólisis. Entre las oxidaciones catalizadas por los CYP se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S-oxidaciones, epoxidaciones, O-, N- y S-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones. Entre sus sustratos se incluyen tanto moléculas pequeñas como otras mucho mayores (por ejemplo, etanol y ciclosporina, con pesos moleculares de 40 y 1203 Da,

respectivamente), aromáticas o lineales, tanto planas como globulares, que contengan o no heteroátomos. Esta amplia diversidad de sustratos es debida a la existencia de múltiples formas de la enzima, cada una de las cuales se ha adaptado para el metabolismo de grupos de compuestos relacionados estructuralmente. Aun así, esta versatilidad no tiene precedentes y ninguna otra enzima puede acomodarse a sustratos de naturaleza química tan dispar (Donato *et al.* 2004).

### 4.2.3 Los CYP en el cerebro

Los niveles de CYP en cerebro fueron descritos por primera vez en 1977, cuando Sasame y colaboradores reportaron la presencia de actividad enzimática mediada por CYP en microsomas de cerebro. Además, se describió que el contenido de CYP era del 3% en comparación con lo encontrado en hígado y que la actividad enzimática correspondiente era 30 veces menor (Sasame *et al.* 1977). Desde entonces, varios informes han descrito los patrones de expresión de los CYP y su actividad en el cerebro (Tabla 1). La expresión de los CYP en el cerebro es heterogénea, y algunos CYP se expresan en mayor proporción en el cerebro que en el hígado. Por ejemplo, el CYP46A1 (involucrado en la eliminación del colesterol en cerebro) y el CYP2D6 (involucrado en la síntesis de dopamina y serotonina), se expresan principalmente en cerebro, posiblemente, debido a su importancia fisiológica en esta región (Komori 1993; Lund *et al.* 2003; Pikuleva 2006; Bromek *et al.* 2010). Por ejemplo, casi todo el colesterol del SNC es sintetizado *de novo* por las células gliales, particularmente por los astrocitos, ya que el colesterol no puede difundirse libremente a través de la barrera hematoencefálica (Nieweg *et al.* 2009). La vía principal de eliminación del colesterol cerebral se logra a través de su hidroxilación por el CYP46A1 con la producción concomitante de 24 (R) y 24 (S) hidroxicolesterol. La hidroxilación del colesterol aumenta su solubilidad y disminuye su coeficiente de permeabilidad pasiva con un efecto neto de aumento en la difusión pasiva de la molécula a través de la barrera hematoencefálica (Dietschy & Turley 2004; Anchisi *et al.* 2012). En ratón, el CYP46A1 se expresa en múltiples tipos de neuronas de diversas regiones del cerebro (Tabla 1). Las alteraciones en la homeostasis del colesterol se han implicado en la etiología de varios trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (Vance 2012; Boussicault *et al.* 2016).

#### 4.2.3.1 Los CYP en los astrocitos

Los astrocitos comprenden la clase más grande de células gliales en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos, al superar en más de cinco veces la cantidad de neuronas (Sofroniew & Vinters 2010). Los astrocitos tienen funciones clave en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica, en la regulación del flujo sanguíneo regional, proporcionando apoyo trófico, antioxidante y metabólico a las neuronas, reciclando los neurotransmisores y regulando la sinaptogénesis y la transmisión sináptica (Ben Haim & Rowitch 2017). Los CYP se encuentran tanto en las neuronas como en las células gliales, tanto en el soma como a lo largo de los procesos celulares. Algunas isoformas, como el CYP1A1, 2B, 2E1 y 3A, se encuentran principalmente en las neuronas, mientras que otras, como el CYP2D6, se encuentran presentes tanto en las neuronas como en las células gliales (Dutheil *et al.* 2009; Miksys & Tyndale 2013). El CYP2J2 y el CYP2C11 se encuentran presentes en astrocitos y neuronas de la corteza, hipocampo y cerebelo (Dutheil *et al.* 2009; Liu & Alkayed 2005; Ruparel *et al.* 2012; Carver *et al.* 2014). Además, recientemente se describió que el CYP2J9 está ampliamente distribuido en el cerebro, con una mayor presencia en el cerebelo, donde se ha propuesto que interviene en la homeostasis del recambio de neurotransmisores (Qu *et al.* 2001).

Los CYP cerebrales son inducibles por estímulos específicos y, bajo ciertas condiciones, los niveles de CYP en neuronas específicas pueden ser comparables o incluso mayores que los niveles presentes en los hepatocitos (Ferguson & Tyndale 2011). Algunos de los sustratos endógenos de los CYP en el cerebro incluyen ácidos grasos, colesterol, hormonas y precursores de neurotransmisores (Navarro-Mabarak *et al.* 2018).

**Tabla 1. Localización y metabolismo de los CYP con relevancia clínica en el cerebro.**

| CYP     | Localización   | Referencias  | Sustrato                 | Producto   |
|---------|--|--|--------------------------|--|
| CYP46A1 | <b>Humano y ratón:</b> Múltiples tipos de <b>neuronas</b> en el hipocampo, corteza, y cerebelo   | (Lund <i>et al.</i> 2003; Ramirez <i>et al.</i> 2008; Dutheil <i>et al.</i> 2009)  | Colesterol               | 24(S)-hidroxicoolesterol   |
| CYP2D6  | <b>Humano:</b> Múltiples tipos de <b>neuronas</b> en la corteza frontal, núcleo caudado, putamen, globo pálido, hipocampo, médula y sustancia negra; <b>astrocitos</b> de la corteza frontal e hipocampo | (Siegle <i>et al.</i> 2001; McFadyen <i>et al.</i> 1998; Chinta <i>et al.</i> 2002; Miksys <i>et al.</i> 2002; Dutheil <i>et al.</i> 2009) | Tiramina<br>5-MT<br>MPTP | Dopamina<br>5-HT (Serotonina)<br>MPTP-OH<br>PTP<br>MPDP <sup>+</sup><br>MPP <sup>+</sup>   |
| CYP2E1  | <b>Humano y rata:</b> Múltiples tipos de <b>neuronas</b> en la corteza frontal, hipocampo, cerebelo, giro dentado, estriado, tálamo y sustancia negra  | (Watts <i>et al.</i> 1998; Howard <i>et al.</i> 2003; Farin & Omiecinski 1993; Upadhyia <i>et al.</i> 2000; Wu <i>et al.</i> 2011)         | AA<br>Etanol<br>MPTP     | 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET y 14,15-EET<br>Acetaldehído<br>PTP<br>MPDP <sup>+</sup><br>MPP |
| CYP2J2  | <b>Humano:</b> Múltiples tipos de <b>neuronas</b> en el hipocampo y cerebelo; <b>astrocitos</b> en la corteza frontal, hipocampo y cerebelo  | (Dutheil <i>et al.</i> 2009)   | AA                       | 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET y 14,15-EET  |
| CYP2C11 | <b>Rata:</b> Astrocitos corticales y neuronas sensoriales  | (Liu & Alkayed 2005; Ruparel <i>et al.</i> 2012; Carver <i>et al.</i> 2014)  |                          |  |

AA: ácido araquidónico; CYP: citocromo P450; CYP46A1: citocromo P450, familia 46, subfamilia A, gen 1; CYP2D6: citocromo P450, familia 2, subfamilia D, gen 6; CYP2E1: citocromo P450 familia 2, subfamilia E, gen 1; CYP2J2: citocromo P450, familia 2, subfamilia J, gen 2; CYP2C11: citocromo P450, familia 2, subfamilia C, gen 11; EET: ácido epoxieicosatrienoico; MPTP: 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina; 5-HT: 5-hidroxitriptamina 5-MT: 5-metoxitriptamina. **Modificado de (Navarro-Mabarak *et al.* 2018).**

#### 4.2.4 Los CYP con actividad de epoxigenasa

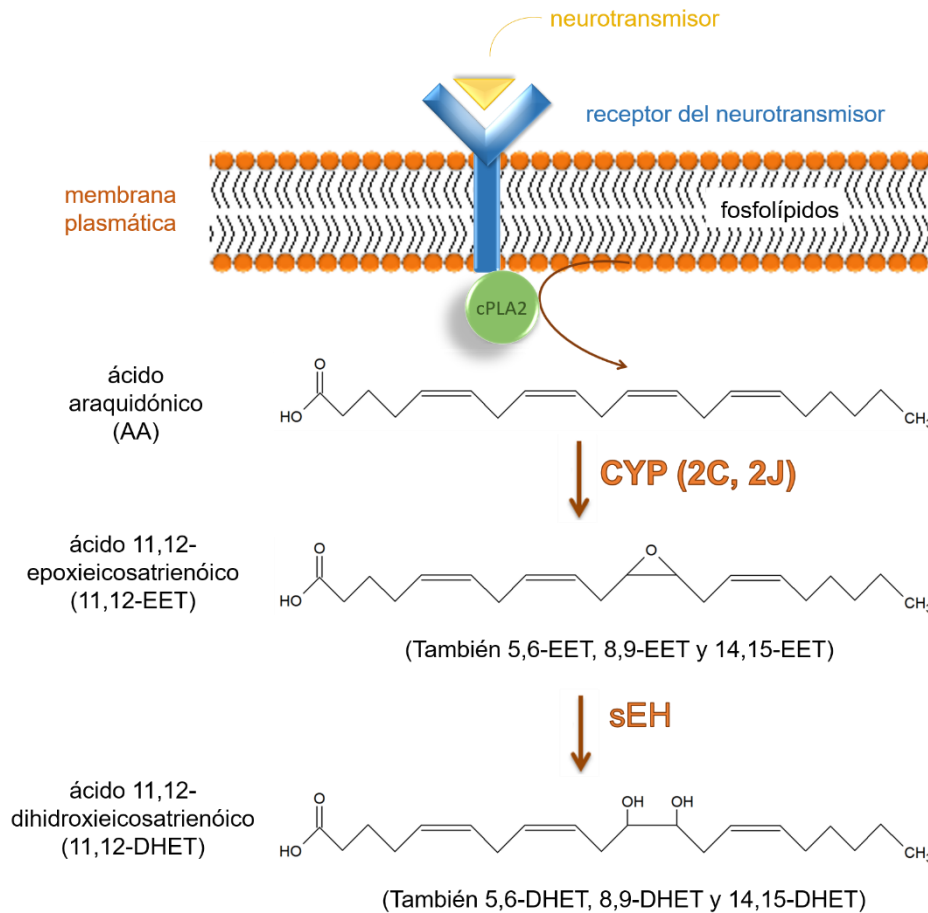
Los CYP con actividad de epoxigenasa llevan a cabo la oxidación del ácido araquidónico (AA), con la concomitante formación de los ácidos epoxieicosatrienoicos (EET). El AA es un ácido graso poliinsaturado (PUFA) formado por una cadena de 20 carbonos, derivado del ácido graso esencial, linoleico (AL). El AA es el PUFA omega-6 más abundante en el cerebro, principalmente



esterificado a los glicerofosfolípidos de colina en la membrana plasmática de las células (Bazinet & Layé 2014). Los mediadores lipídicos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados, como el AA, son sintetizados durante la homeostasis normal de las células, e incluso después de la activación celular y en condiciones de estrés, a partir del AL. El AA es liberado de los fosfolípidos tras la señal de los primeros mensajeros como neurotransmisores, neuromoduladores y neurohormonas. Tres enzimas pueden llevar a cabo la deacilación de los fosfolípidos: fosfolipasa A2 (PLA2), fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa D (PLD). Sin embargo, sólo la PLA2 puede liberar araquidonato en una sola reacción. En el cerebro, la PLA2 está acoplada a receptores de diversos tipos incluyendo receptores dopaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos o de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Fig. 3) (Bazinet & Layé 2014). Una vez que el AA es liberado de la membrana por la activación de PLA2, la cual hidroliza los enlaces éster de los fosfolípidos en la posición sn-2, el AA puede ser metabolizado por las enzimas ciclooxigenasas (COX), lipooxigenasas (LOX), y las vías monooxigenasa del CYP a mediadores lipídicos llamados colectivamente eicosanoides (Stables & Gilroy 2011). Las COX catalizan la conversión del AA en prostaglandinas (PGs) y tromboxanos, las LOX generan leucotrienos (LTs) y lipoxinas (LXs), y los CYP producen ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) y ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs) por las enzimas epoxigenasas e hidroxilasas respectivamente. Este conjunto de enzimas metabolizadoras del AA están involucradas en la iniciación, mantenimiento y modulación de los procesos inflamatorios, así como en el envejecimiento, la apoptosis y la actividad sináptica (Phillis *et al.* 2006). Los LTs y las PGs amplifican la inflamación aguda, mientras que las LXs y los EETs tienen acciones anti-inflamatorias.

Los CYP con actividad de epoxigenasa agregan un átomo de oxígeno a uno de los cuatro dobles enlaces del AA, lo que resulta en la formación de cuatro ácidos regioisoméricos que son nombrados de acuerdo al número correspondiente al doble enlace oxidado (5,6-, 8,9-, 11,12- y 14,15- EET). Los EETs pueden ser posteriormente hidrolizados por la enzima epóxido hidrolasa soluble (sEH) a metabolitos con menor actividad biológica, los ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs) (Fig. 3) (Stables & Gilroy 2011). La mayoría de los CYP epoxigenasas son miembros de la familia 2, principalmente miembros de las subfamilias CYP2B, 2C, 2D, 2G, 2J y 2N. Aunque también se ha descrito la actividad de epoxigenasa de los CYP1A1, 1A2 y 2E1 (Capdevila & Falck 2000; Zeldin 2001). Las subfamilias 2C y 2J son las encargadas de la mayor producción de EETs a partir del

AA (Capdevila & Falck 2000). Los CYP2C8, 2C9 y 2J2 son las principales isoformas encargadas de la epoxidación del ácido araquidónico en humanos (Enayetallah *et al.* 2004; Pfister *et al.* 2010). En la rata, el CYP2J3, homólogo del CYP2J2 humano (70% de homología en su secuencia de aminoácidos) es el que produce la mayor cantidad de EETs (Wu *et al.* 1997) . Cada isoforma de los CYP epoxigenasas produce los cuatro ácidos regioisoméricos (5,6-, 8,9-, 11,12- y 14,15- EET) en diferente proporción. El 11, 12- EET y el 14,15- EET son los que se producen mayoritariamente por diferentes células y tejidos. Una vez formados, estos lípidos de cadena corta pueden actuar de forma autocrina y paracrina. Los EET poseen diversas propiedades biológicas entre las que se encuentran la proliferación celular, la migración, la angiogénesis, la vasodilatación en tejido endotelial vascular (donde han sido mayoritariamente estudiados) y una potente actividad anti-inflamatoria (Node *et al.* 1999).



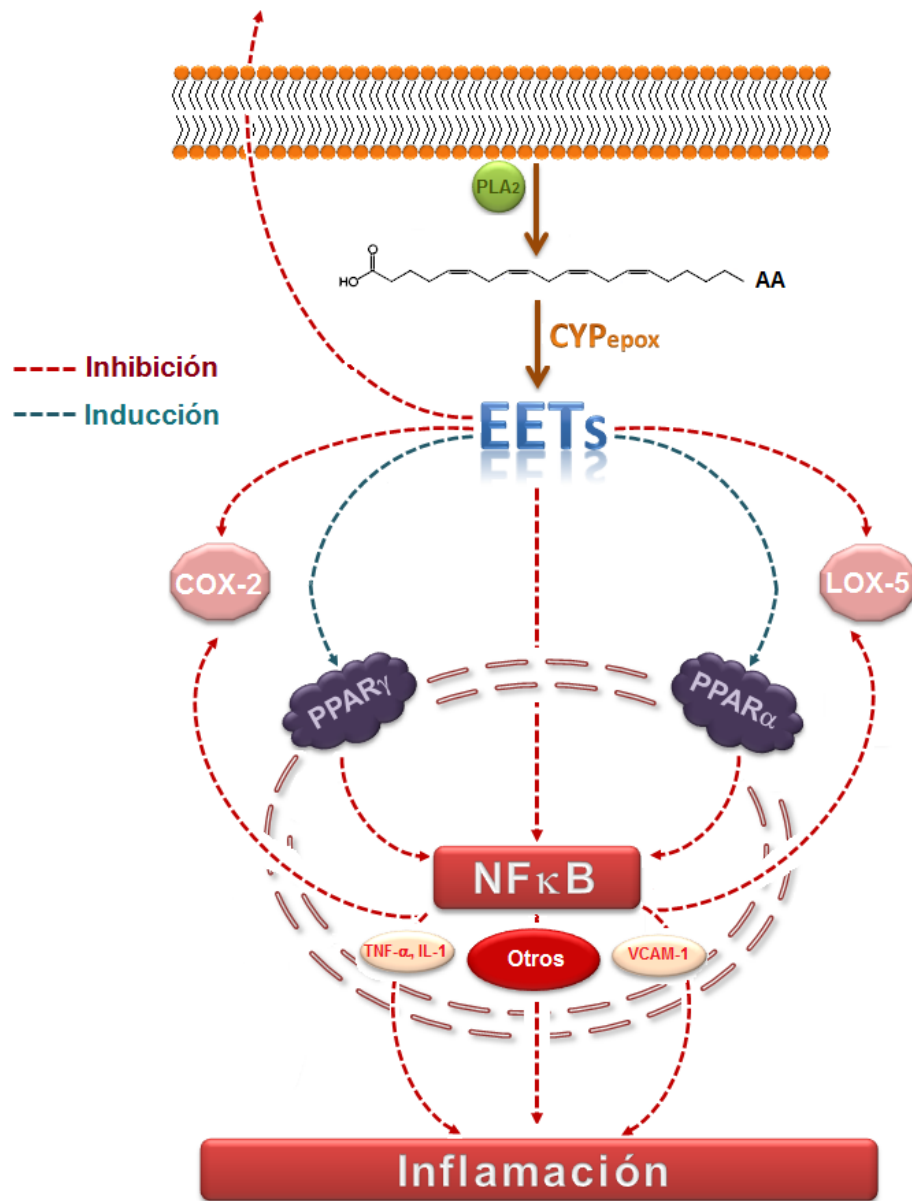
**Figura 3. Metabolismo del ácido araquidónico mediado por los CYP con actividad epoxigenasa. Imagen elaborada para este trabajo.**

#### 4.2.4.1 Actividad anti-inflamatoria de los EET

La actividad anti-inflamatoria de los EETs es mediada principalmente por la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B, ya sea a través de la inhibición de la actividad del complejo IKK o mediante la activación de los receptores nucleares PPAR- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$  (Node *et al.* 1999; Deng *et al.* 2010; Ng *et al.* 2007). Los PPAR pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares que son factores transcripcionales activados por ligando. Una gran variedad de ligandos naturales, como los ácidos grasos y eicosanoides, así como ligandos sintéticos como los fibratos pueden desencadenar la activación de los PPAR. Se ha reportado que la activación de los PPAR regula la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, en la homeostasis de la glucosa, y en la proliferación y diferenciación celular (Shahabi *et al.* 2014). Específicamente, PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  también inhiben la respuesta inflamatoria en la pared arterial reprimiendo la vía de NF- $\kappa$ B. La activación de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  suprime la expresión de moléculas asociadas a la inflamación inducidas por NF- $\kappa$ B como VCAM-1 e ICAM-1 (Ng *et al.* 2007). Como resultado, se ha observado que los EET inhiben la activación endotelial y la adhesión leucocitaria inducida por citocinas (Node *et al.* 1999). Además, los EET inhiben la transcripción de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), con lo que se ha demostrado en varios estudios que tienen una acción sinérgica con otros agentes anti-inflamatorios (Inceoglu *et al.* 2008; Schmelzer *et al.* 2006; Liu *et al.* 2010) (Fig. 4).

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) actúan principalmente mediante la inhibición de las enzimas COX y su concomitante producción de prostaglandinas (el ácido acetilsalicílico (la aspirina) es el más reconocido y utilizado fármaco dentro de esta clasificación) (Botting 2010). Asimismo, la inhibición de la síntesis de LTs por la LOX también ha sido utilizada como mecanismo anti-inflamatorio mediado por diversos fármacos. Los más reconocidos son aquéllos dirigidos a resolver procesos inflamatorios relacionados con las vías respiratorias como el asma. Entre ellos se encuentran el Montelukast y el Zafirlukast (Stables & Gilroy 2011). El interés en el estudio de los mediadores lipídicos involucrados en la regulación de procesos inflamatorios se ha centrado mayoritariamente en las vías de las enzimas COX y LOX, debido principalmente a que éstas fueron las primeras en ser descritas. Sin embargo, poca atención se ha prestado a la producción de mediadores lipídicos regulatorios llevada a cabo por los CYP. El metabolismo del AA a través del CYP comenzó a adquirir importancia cuando se le relacionó con la regulación de

la función renal y cardiovascular, sobre todo por la potente acción vasodilatadora de los EETs. Con el descubrimiento de las propiedades anti-inflamatorias de los EETs surgió un renovado y amplio interés en esta vía, con lo que se les ha llegado a proponer como un nuevo blanco terapéutico para tratar procesos inflamatorios tanto sistémicos como específicos en un órgano (Schmelzer *et al.* 2005; Schmelzer *et al.* 2006).



**Figura 4. Actividad anti-inflamatoria de los EETs. Modificado de (Shahabi *et al.* 2014).**

#### 4.2.5 Los CYP con actividad de epoxigenasa en el cerebro

La mayoría de familias de los CYP epoxigenasas se han encontrado en el cerebro por diversos métodos (Tabla 1) (Navarro-Mabarak *et al.* 2018). La producción y el metabolismo de los EETs en el cerebro abarca diversas regiones y se extiende a neuronas centrales y periféricas, astrocitos, oligodendrocitos, endotelio vascular y músculo liso vascular. En el SNC, los EETs son importantes moléculas de señalización involucradas en procesos como el acoplamiento neurovascular y la transmisión sináptica, y también participan en la protección neuronal y astrogliar durante procesos neuroinflamatorios (Ilf *et al.* 2010).

##### 4.2.5.1 El efecto neuroprotector de los EETs

En el cerebro, se ha demostrado que los EETs pueden contrarrestar la neuroinflamación generada en modelos que simulan eventos cerebrovasculares hemorrágicos e isquémicos (Zhang *et al.* 2007; Koerner *et al.* 2008) o la neuroinflamación generada por una lesión cerebral traumática (Hung, 2017). Se demostró además que la neuroprotección mediada por el 17 $\beta$ -estradiol involucra la inhibición de la sEH durante la lesión cerebral isquémica (Koerner *et al.* 2008). Además, la sobreexpresión endotelial del CYP2J2 ha mostrado tener un efecto neuroprotector contra la lesión isquémica cerebral global. Esta protección se ha relacionado con el aumento de la generación de EETs, la activación de la vía PI3K/AKT, el aumento de los niveles de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x1, la atenuación de las proteínas pro-apoptóticas Bax y caspasa-3, un incremento en el flujo sanguíneo cerebral y la densidad microvascular cerebral, y la supresión de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Li *et al.* 2012).

Adicionalmente, la inhibición de sEH o la sobreexpresión de los CYP epoxigenasas (y el consecuente aumento de los niveles de EETs), ha demostrado ser neuroprotector, ya que aumenta la viabilidad celular, reduce la apoptosis neuronal y aumenta el crecimiento de neuritas, la neurotransmisión sináptica y la plasticidad (Li *et al.* 2018; Wu *et al.* 2015; Wang *et al.* 2018). Por lo tanto, los CYP epoxigenasas y la sEH han adquirido cada vez mayor atención como blancos terapéuticos para enfermedades neurodegenerativas (Navarro-Mabarak *et al.* 2018), en donde los EETs han demostrado contrarrestar muchas de las características etiológicas por ejemplo de la

enfermedad de Parkinson (Lakkappa *et al.* 2016; Lakkappa *et al.* 2018; Lakkappa *et al.* 2019) o de la enfermedad de Alzheimer (Sarkar *et al.* 2014).

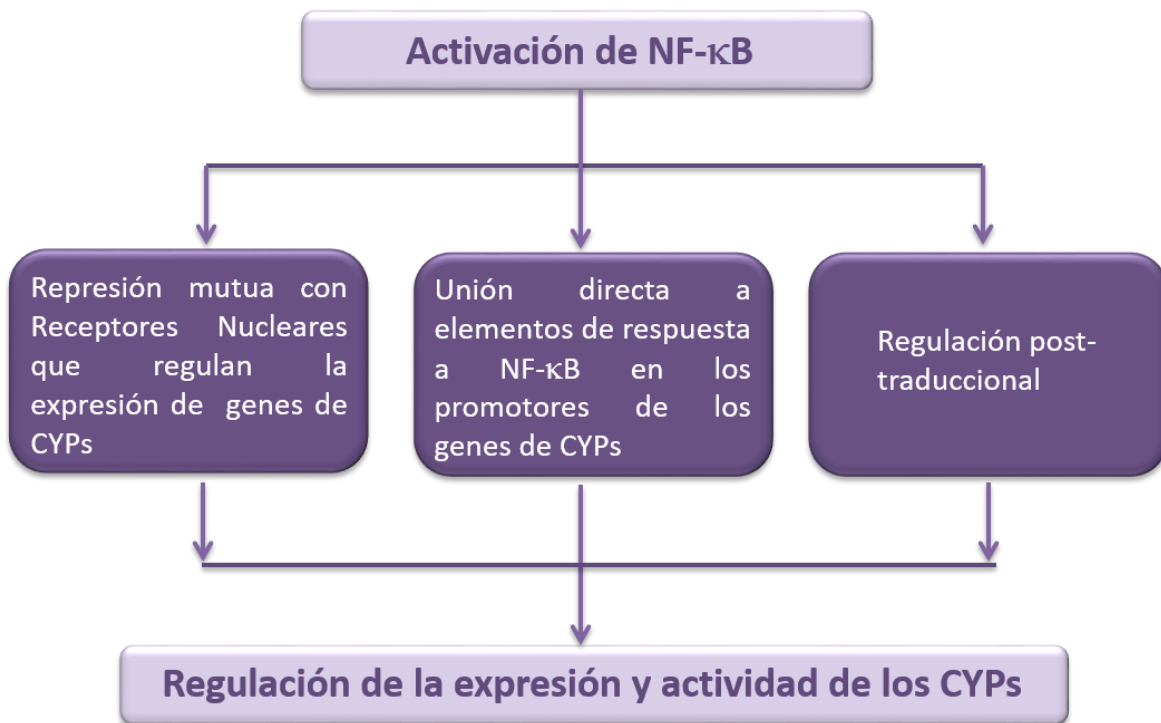
### **4.3 Regulación de los CYP durante procesos inflamatorios**

Se ha reportado que la expresión, niveles de proteína y actividad de los CYP son modulados por cambios en los niveles de citocinas pro-inflamatorias, tales como la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Nicholson & Renton 2001; Nicholson & Renton 2002; Abdel-Razzak *et al.* 1993; Aitken & Morgan 2007), principalmente en el hígado, aunque este fenómeno se ha descrito en diversos órganos, incluso en el cerebro (Abdel-Razzak K., 1993; Renton K.W., 1999). Además, se ha encontrado que esta regulación varía dependiendo del órgano en estudio. El CYP2E1 es un claro ejemplo de ello, ya que las citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\beta$  e IL-6 causan la disminución de la expresión de este CYP en el hígado, sin embargo, su expresión se incrementa durante procesos inflamatorios *in vivo* en el pulmón y el cerebro e incluso tras la administración de LPS a cultivos de células gliales (Abdel-Razzak K., 1993; Cribb A.E., 1994; Tindberg N., 1996). Es bien sabido que las citocinas pro-inflamatorias activan la vía de señalización de NF- $\kappa$ B (Baldwin 1996; Minogue *et al.* 2012; Schütze *et al.* 1995), y se ha demostrado que la regulación de los CYP que han sido estudiados dependiente de las citocinas es debida a la activación de este factor de transcripción (Morgan 2001; Ke *et al.* 2001; Gu *et al.* 2006; Iber *et al.* 2000; Bell & Strobel 2012).

#### **4.3.1 Papel de NF- $\kappa$ B en la regulación de los CYP durante la inflamación**

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es un miembro primordial de un elaborado sistema que permite a las células adaptarse y responder a cambios en su ambiente, un proceso fundamental para la supervivencia. Un gran número de diversos estímulos externos conducen a la activación de NF- $\kappa$ B y los genes cuya expresión es regulada por NF- $\kappa$ B juegan papeles importantes y conservados dentro de procesos como el desarrollo y la función del sistema inmunológico, la apoptosis, la proliferación celular, la diferenciación y el desarrollo (Oeckinghaus & Ghosh 2009; Hayden & Ghosh 2012).

NF- $\kappa$ B puede regular los CYP a diferentes niveles, ya sea uniéndose directamente a elementos de respuesta en la región promotora de sus genes; a través de la represión mutua de algunos receptores nucleares involucrados en la regulación de los CYP; o afectando la estabilidad de la proteína (Zordoky & El-Kadi 2009) (Fig. 5). Se ha demostrado que NF- $\kappa$ B es capaz de unirse al promotor y reprimir la expresión del CYP1A1, CYP2B1/2, CYP2C11, CYP2D5 y CYP27B principalmente en líneas celulares de hepatocitos (Zordoky & El-Kadi 2009). Sin embargo, no se había demostrado que isoformas de CYP con actividad de epoxigenasa como CYP2J y CYP2C fueran genes blanco de NF- $\kappa$ B.



**Figura 5. Regulación de los CYP por NF- $\kappa$ B. Modificado de (Zordoky & El-Kadi 2009).**

## 5. ANTECEDENTES

Recientemente se ha descrito el efecto de la inflamación aguda en la expresión y actividad de los CYP con actividad de epoxigenasa en corazón, riñón e hígado de rata y ratón (Anwar-mohamed *et al.* 2010; Theken *et al.* 2011). La administración intraperitoneal de LPS (1mg/kg) causó la disminución significativa en los niveles de mRNA de los CYP epoxigenasas (2B1, 2C11, 2J3 y 2E1 en rata (Fig.6); 2C29, 2C44 y 2J5 en ratón (Fig. 7)) a las 24 h de tratamiento, principalmente en hígado.

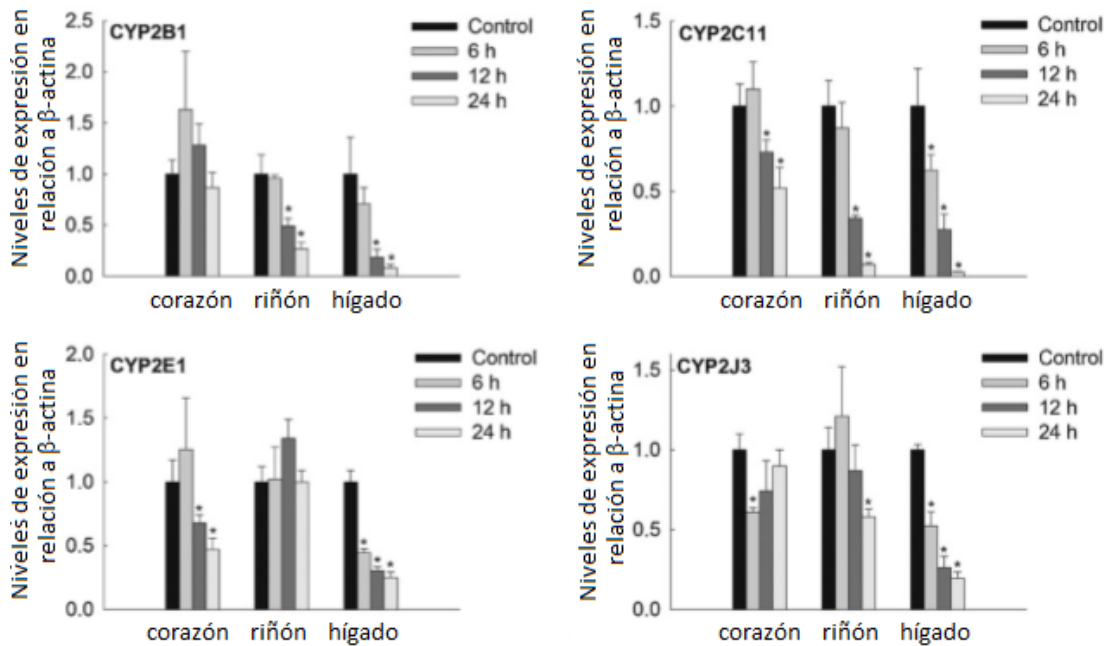


Figura 6. Niveles de expresión transcripcional de los CYP epoxigenasas durante un proceso inflamatorio sistémico en rata. Modificado de (Anwar-mohamed *et al.* 2010).

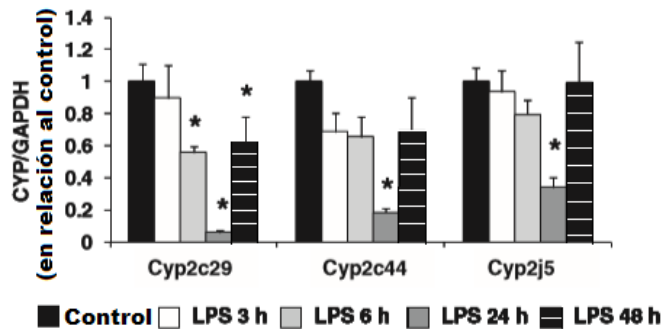
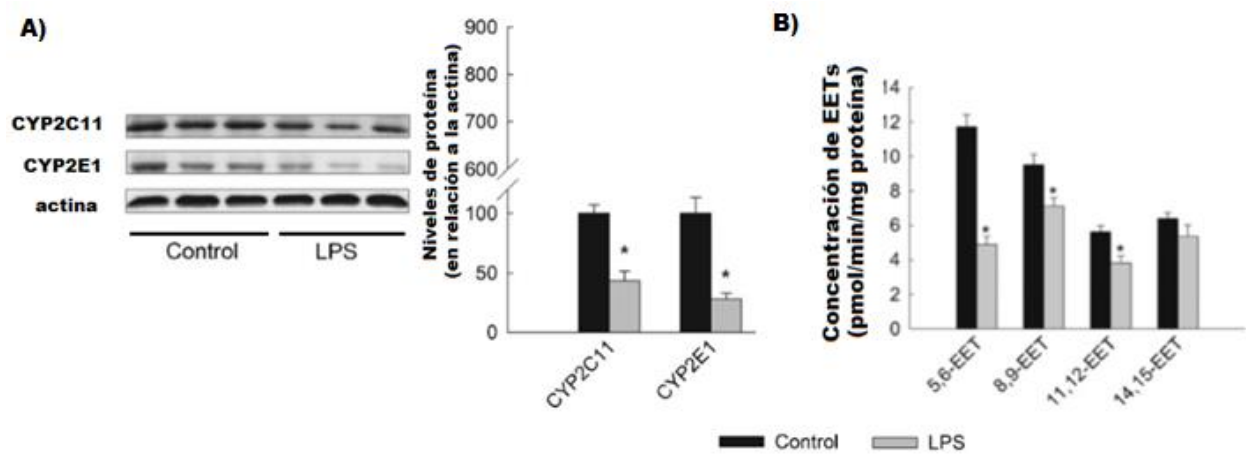


Figura 7. Niveles de expresión transcripcional de los CYP epoxigenasas en hígado durante un proceso inflamatorio sistémico en ratón. Modificado de (Theken *et al.* 2011).



También se demostró que los niveles de proteína (Fig. 8A) y la actividad (Fig. 8B) de los CYP con actividad de epoxigenasa disminuyeron significativamente en el corazón de los animales a las 24 h del tratamiento con LPS (Anwar-mohamed *et al.* 2010). En estos trabajos se demostró que la inflamación sistémica inducida por el tratamiento con LPS, disminuyó la expresión, los niveles de proteína y la actividad de los CYP epoxigenasas en diferentes órganos y a diferentes tiempos de tratamiento. Sin embargo, hasta este momento, no se había estudiado si los CYP2C y CYP2J son regulados por ambientes proinflamatorios en células del sistema nervioso central y la participación de NF- $\kappa$ B en este proceso de regulación.



**Figura 8.** Niveles de proteína (A) y actividad (B) de los CYP epoxigenasas en corazón durante un proceso inflamatorio sistémico en rata. Modificado de (Anwar-mohamed *et al.* 2010).

## **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Es bien conocido que la regulación de los CYP depende del órgano en estudio, e incluso varía en cada tipo celular. Hasta el momento, no se ha descrito si los procesos inflamatorios desarrollados en el SNC son capaces de regular a los CYP epoxigenasas en el cerebro, como lo hacen en otros órganos. Por lo tanto, es de nuestro interés dilucidar si un proceso inflamatorio desarrollado en células del SNC puede modificar la expresión de los CYP2J3 y 2C11, así como el mecanismo por el cual esto se podría llevar a cabo.

## 7. HIPÓTESIS

La administración de LPS a un cultivo primario de astrocitos provocará un proceso inflamatorio durante el cual se modularán negativamente la expresión transcripcional, los niveles de proteína y la actividad de los CYP2J3 y CYP2C11. Dicha disminución estará relacionada a la producción de citocinas pro-inflamatorias y la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

## 8. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen cambios en la expresión transcripcional, niveles de proteína y actividad de los CYP2J3 y CYP2C11 durante un proceso inflamatorio desarrollado en astrocitos. Explorar si el factor de transcripción NF- $\kappa$ B está involucrado en este fenómeno.

## 9. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer un modelo *in vitro* de activación celular inflamatoria mediante la administración de LPS a un cultivo primario de astrocitos de rata.
- Realizar la identificación por inmunocitoquímica, del tipo celular que conforma mayoritariamente el cultivo, con el fin de demostrar su pureza y la eficiencia de obtención de las células.
- Cuantificar la concentración de la citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  como marcador del proceso inflamatorio inducido.
- Determinar si hay cambios en los niveles de expresión transcripcional del *Cyp2j3* y *Cyp2c11*.
- Determinar la variación en los niveles de las proteínas CYP2J3 y CYP2C11.
- Determinar la actividad de los CYP epoxigenasas mediante la determinación de uno de sus metabolitos (11,12-EET+DHET).
- Determinar el efecto de la administración conjunta del LPS con IMD-0354 (inhibidor selectivo de NF- $\kappa$ B) sobre la expresión transcripcional, niveles de proteína y actividad del CYP2J3 y CYP2C11.
- Determinar si existen elementos de respuesta a NF- $\kappa$ B en el promotor del *Cyp2j3* y *Cyp2c11* utilizando herramientas bioinformáticas y corroborar experimentalmente su capacidad de unir complejos NF- $\kappa$ B mediante EMSAs.

## 10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 10.1 Reactivos

Medio basal de Eagle (Eagle's Basal Medium, BME), Glucosa, Lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 0127: B8, IMD-0354, y sal sódica de Poli dI dC poli [Poly (2'-deoxyinosinic-2'-deoxycytidylic acid)] (SIGMA-Aldrich). Glutamina, inhibidor de Tripsina y Penicilina-Estreptomicina (Gibco). Suero Fetal Bovino (SFB) (Byproducts). Marcador de peso molecular biotinilado (Cell Signaling). Anticuerpo policlonal de pollo anti-GFAP de rata (glial fibrillary acidic protein glial fibrillary acidic protein) y anticuerpo secundario IgG de burro anti-pollo conjugado con biotina (Merck Millipore). El anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (GeneTex). Kit de ELISA para la detección de TNF- $\alpha$  de rata (PIERCE). Kit de ELISA para la detección de 11,12-EET/DHET y anticuerpo monoclonal de ratón anti-CYP2C11 de rata (Detroit R&D). Reactivo de detección para Western Blot, ECL (General Electric-Amersham). Desoxirribonucleasa I (DNase), Oligo (dT), inhibidor de ribonucleasa (RNase OUT), M-MLV RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) y el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen Life Technologies). TRIzol (Ambion Life Technologies). TaqMan Master Mix Multiplex (Applied Biosystems). El oligonucleótido con la secuencia consenso de NF- $\kappa$ B, el oligonucleótido con la secuencia consenso mutada de NF- $\kappa$ B, el anticuerpo policlonal anti-p65 de NF- $\kappa$ B y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CYP2J2 (Santa Cruz Biotechnology). Texas Red Avidina D (VECTOR Laboratories).

### 10.2 Cultivo primario de astrocitos de rata.

El protocolo utilizado para la obtención de los cultivos primarios de astrocitos, con número de folio ID: 249 fue revisado y aprobado por la Comisión para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los astrocitos se aislaron de la corteza cerebral de ratas Wistar macho de 2 días de edad, según lo descrito por Morán y Patel (1989) con algunas modificaciones (Moran & Patel 1989). Cada cultivo se derivó de un conjunto de células obtenidas a partir de las cortezas de 4 ratas. En resumen, las cortezas se aislaron y se removieron las meninges

y los vasos sanguíneos. Las cortezas se cortaron en trozos pequeños y fueron digeridas en 0.25 mg/ml de Tripsina a 37°C durante 8 min. La digestión se detuvo con 1 mg/ml de inhibidor de Tripsina en presencia de 0.003% de DNAsa a Tamb. El tejido se disoció con micropipeta de 1 ml y se filtró en malla. La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 2400 rpm por 10 min y el pellet fue diluido en medio fresco. El medio de cultivo consistió en BME suplementado con 10% SFB inactivado por calor (60°C, 1h), 2 mM glutamina, 750 mg glucosa, 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomicina. Los astrocitos se cultivaron en una incubadora humidificada a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, hasta que alcanzaron una confluencia del 90-95% (aproximadamente a los 10 días de incubación), estado en el que la inhibición por contacto impide una mayor división celular (Lange *et al.* 2012). El medio de cultivo fue reemplazado con medio fresco cada tercer día. Para confirmar el predominio de astrocitos en el cultivo, se determinó el porcentaje de células positivas para GFAP mediante inmunofluorescencia (Fig. 7), y se realizó una co-tinción con Iba-1 para descartar la presencia de células microgliales (Fig. 8).

### **10.3 Tratamiento de los astrocitos con LPS y LPS + IMD-0354.**

El medio de cultivo fue reemplazado con medio fresco 18 h antes de los tratamientos. Las células fueron estimuladas con 100 ng/ml LPS (para la determinación de mRNA, proteína y EETs); 100, 200, 400 y 800 ng/ml LPS (para la detección de los niveles de proteína por inmunofluorescencia y WB); 500 ng/ml LPS (para los EMSAs). Las concentraciones utilizadas de LPS se encuentran dentro del rango de concentraciones más bajo que se han reportado en trabajos previos (Nicholson & Renton 2002; Tindberg *et al.* 1996; Kelicen & Tindberg 2004; Nicholson & Renton 1999). El inhibidor específico de NF-κB, el IMD-0354 fue adicionado concurrentemente a los tratamientos de LPS para obtener una concentración final de 1 ng/ml. Se ha demostrado que el IMD-0354 inhibe la fosforilación de IκB, lo que finalmente, inhibe la fosforilación de NF-κB y su translocación al núcleo (Onai *et al.* 2004; Kanduri *et al.* 2011). Además, se ha corroborado que la inhibición mediada por IMD-0354 afecta la expresión de genes regulados río abajo por NF-κB, como aquellos involucrados en la producción de citocinas pro-inflamatorias (Sugita *et al.* 2009; Ogawa *et al.* 2011; Onai *et al.* 2004).

#### **10.4 Determinación de los niveles de CYP2J3 y CYP2C11 por inmunofluorescencia.**

Para las determinaciones por inmunofluorescencia, el cultivo primario de astrocitos se llevó a cabo en una placa de 12 pozos. Cuando los cultivos llegaron a un 95% de confluencia (aproximadamente), éstos fueron tratados con concentraciones creciente de LPS (100, 200, 400 ó 800 ng/ml) durante 24 horas. Una vez concluido el tratamiento, se lavaron los pozos con 1 ml de PBS. Posteriormente, se llevó a cabo el procedimiento para la inmunodetección. Brevemente, los cubreobjetos fueron fijados con paraformaldehído al 1% (en PB 0.1M) durante 10 minutos a 4°C y posteriormente se les lavó tres veces con 0.1 M PB/0.3% Tritón X-100 a la misma temperatura. Las células fueron permeabilizadas con la solución de lavado por 10 min a temperatura ambiente (Tamb) en agitación y luego se les bloqueó con 0.1 M PB/0.3% Tritón X-100/10% SFB por 2 h (a Tamb) o durante toda la noche (a 4°C). Los anticuerpos primarios fueron preparados en la solución de bloqueo (anti GFAP 1:1000; anti CYP2C11 1:1000; anti CYP2J3 1:500) e incubados con las células durante toda la noche en agitación a 4°C. Luego, los cubreobjetos fueron lavados tres veces con 0.1 M PB/0.3% Tritón X-100 e incubados con el anticuerpo secundario correspondiente (1:2500) por 2 h a Tamb. El anticuerpo secundario se lavó tres veces con 0.1 M PB/0.3% Tritón X-100 por 10 min a Tamb. Para marcar los núcleos, los cubreobjetos fueron incubados con 10% Hoechst por 30 min a 4°C. y fueron lavados 2 veces con 0.1 M PB/0.3% Tritón X-100 por 10 min a Tamb. Finalmente, se incubó con Texas Red Avidina-D por 30 min a Tamb y se lavó 2 veces con 0.1 M PB/0.3% Tritón X-100 por 10 min. Los cubreobjetos fueron colocados con medio de montaje en portaobjetos y finalmente fueron observados con un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS IX2 acoplado a una unidad de disco giratorio (DSU).

#### **10.5 Cuantificación de TNF- $\alpha$ del sobrenadante de los cultivos.**

A las 0, 6, 12 y 24 horas de tratamiento con LPS, el sobrenadante de los cultivos se recuperó y se centrifugó a 4500 rpm por 5 min. a 4°C para remover las células o restos celulares que pudieran estar presentes. La cuantificación se llevó a cabo utilizando un kit de ELISA Thermo Scientific específico para TNF- $\alpha$  de rata. El procedimiento se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se leyó la absorbancia a 450 nm. Las concentraciones fueron calculadas a partir de una curva estándar. Las concentraciones se determinaron a partir de cuatro cultivos diferentes (n = 4).

## 10.6 Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA.

El RNA total fue obtenido de los cultivos utilizando el reactivo TRIzol, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El RNA fue cuantificado espectrofotométricamente a 260 nm. La pureza de las muestras se determinó mediante la relación espectrofotométrica  $A_{260}/A_{280}$  (relación > 1.85) y la integridad del RNA se confirmó por electroforesis desnaturante de las muestras (en gel de agarosa al 1% en TAE 1X) y su posterior observación con bromuro de etidio. Posteriormente, el cDNA fue obtenido a partir de 1 µg de RNA total por transcripción inversa utilizando la enzima M-MLV RT, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

## 10.7 Cuantificación de la expresión del mRNA por qRT-PCR.

El análisis cuantitativo de la expresión del mRNA de los CYP se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Se utilizaron cebadores de expresión genética TaqMan comerciales para detectar el *Cyp2j3*, *Cyp2c11* y *GAPDH*. El *GAPDH* fue seleccionado como el gen de referencia debido a que su expresión se mantuvo constante bajo nuestras condiciones experimentales. El RT-PCR fue realizado en un equipo Corbett Rotor-Gene 6000 (QIAGEN). Para la amplificación, las reacciones fueron incubadas a 55°C por 2 min y luego a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 s más 1 min a 60°C. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado, con el cDNA obtenido de cuatro experimentos diferentes (n = 4). Los niveles de expresión se calcularon utilizando el algoritmo matemático  $\Delta\Delta^C_T$ , en donde cada muestra fue primero normalizada con el gen constitutivo *GAPDH* de acuerdo a la cantidad de templado agregado; posteriormente estos valores fueron expresados con respecto al grupo control ajustado a 1. y. Los resultados se graficaron como la media  $\pm$  DE, tomando como calibrador los controles por cada tiempo evaluado.

## 10.8 Obtención y cuantificación de proteínas totales a partir de los astrocitos.

Después de 24 h de tratamiento con LPS (100, 200, 400 y 800 ng/ml) o LPS + IMD-0354, el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron una vez con PBS 1X frío y se rasparon con 1 ml de PBS nuevo. La suspensión se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4°C y el pellet de células se congeló a -80°C hasta su utilización. Las muestras congeladas se re-suspendieron en buffer de lisis [50 mM

Tris-HCl pH = 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) del detergente NP40 y 0.5% (w/v) de desoxicolato sódico]. La suspensión obtenida se sonicó en 3 ciclos de 10 s, 3 veces, siempre sobre hielo. La cantidad de proteína total en las muestras se cuantificó por el método de Bradford.

### **10.9 Inmunodetección por Western Blot.**

Se separaron 60 µg de proteína mediante su electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 mm. Las membranas fueron posteriormente bloqueadas por 2 h a Tamb con una solución de albúmina al 5% en TBS-Tween 0.3%. Después del bloqueo, las membranas fueron expuestas al anticuerpo primario correspondiente (anti-CYP2J2 1:500; anti-CYP2C11 1:500; anti-GAPDH 1:5000) por toda la noche a 4°C en agitación. El anticuerpo primario fue lavado 3 veces con TBS-Tween 0.3%. El anticuerpo secundario correspondiente se incubó por 1 h a Tamb (1:5000) y las membranas fueron finalmente lavadas 2 veces con TBS-Tween 0.3% y 1 vez con TBS 1X. Para llevar a cabo la reacción de quimioluminiscencia se utilizó el reactivo ECL y las imágenes resultantes fueron adquiridas con un fotodocumentador Kodak GEL Logic 1500. La cuantificación relativa de las proteínas se llevó a cabo mediante la determinación de la intensidad de las bandas detectadas mediante el software ImageJ. Los niveles de proteína fueron determinados a partir de tres experimentos independientes (n = 3).

### **10.10 Determinación de la cantidad de 11,12-DHET + 11,12-EET a partir del cultivo primario de astrocitos.**

Para determinar la actividad epoxigenasa total de los CYP, se determinó la cantidad de 11,12-EET y de su producto hidrolizado, el 11,12-DHET, a partir de los astrocitos utilizando un kit comercial de ELISA de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, después de 24 h de tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se lavó 1 vez con PBS/0.1 mM TPP (trifenilfosfina). Las células fueron raspadas, recuperadas y sonicadas en este buffer. Una vez sonicadas, la suspensión fue acidificada con ácido acético hasta llegar a un pH de 3-4 (determinado mediante tiras reactivas para la detección de pH). Después de ajustar el pH, se realizaron 3 extracciones orgánicas con acetato de etilo de las suspensiones ácidas previamente obtenidas. Para cada extracción, se agregó un volumen idéntico de acetato de etilo a la muestra, se le agitó con vortex y



se centrifugó. Se formaron dos fases, de las cuales se colectó la fase orgánica. Una vez que se realizaron tres extracciones de la misma muestra, se agruparon las fases orgánicas colectadas y se evaporó el acetato de etilo mediante su burbujeo con nitrógeno. El residuo seco obtenido se disolvió en 20  $\mu$ L de etanol. A fin de hidrolizar los EETs a DHETs, se llevó a cabo una hidrólisis ácida agregando 20  $\mu$ l de ácido acético durante 18 h (por toda la noche) a Tamb. Posteriormente, se agregaron 60  $\mu$ l de agua destilada y se volvieron a realizar tres extracciones. Después de evaporar el acetato de etilo, el residuo seco se disolvió finalmente en 30  $\mu$ L de etanol. Para preparar una solución stock, se agregaron 90  $\mu$ l de TBS 10X, obteniendo un volumen final de 120  $\mu$ l. Para llevar a cabo la ELISA, las muestras fueron diluidas 20X. Posteriormente, se siguieron las especificaciones del fabricante para determinar por ELISA la cantidad de 11,12-DHET + 11,12-EET. Se determinó la actividad epoxigenasa total a partir de 3 experimentos independientes (n = 3).

#### **10.11 Obtención de las fracciones nucleares y las proteínas nucleares.**

Los extractos nucleares se obtuvieron como se describió originalmente (Dignam *et al.* 1983), con algunas modificaciones (López-Bojórquez *et al.* 2004; Blancas-Flores *et al.* 2012). Después del tratamiento, los astrocitos fueron lavados dos veces con PBS frío, raspados y centrifugados a 850 x g rpm por 5 min. para obtener un pellet de células. El pellet fue congelado en un baño hielo seco/acetona por 3 min. Después de congelar el pellet, éste se descongeló en un buffer hipotónico para facilitar el rompimiento de las células (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 7.9) (Tabla 2) por 10 min. a 4°C. Posteriormente, se centrifugó la suspensión a 1160 x g para separar las fracciones citoplasmática y nuclear. La fracción citoplasmática se desechó y la fracción nuclear fue resuspendida en buffer hipertónico (20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% glicerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9) (Tabla 3), y se mantuvo en agitación en vortex por 30 min. a 4°C. La suspensión obtenida fue centrifugada a 18,600 x g por 20 min. a 4°C. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se colectó, pues es ahí donde se encuentran las proteínas nucleares, y se determinó la concentración de proteína por medio del método de Bradford. El sobrenadante se almacenó en alícuotas a -70°C hasta su utilización.

**Tabla 2. Preparación del buffer hipotónico para la realización del EMSA.**

| <b>Componente</b> | <b>[Stock]</b> | <b>Lo que se toma del stock</b>  | <b>[Final]</b> |
|-------------------|----------------|----------------------------------|----------------|
| HEPES             | 1 M            | 250 $\mu$ l                      | 10 mM          |
| KCl               | 3 M            | 83.3 $\mu$ l                     | 10 mM          |
| MgCl <sub>2</sub> | 200 mM         | 187.5 $\mu$ l                    | 1.5 mM         |
| DTT*              | 1 M            | 1 $\mu$ l por cada 1mL preparado | 1 mM           |
| H <sub>2</sub> O  | -              | cbp 25 ml                        | -              |

\* Se agrega al momento de la utilización del buffer.

**Tabla 3. Preparación del buffer hipertónico para la realización del EMSA.**

| <b>Componente</b> | <b>[Stock]</b> | <b>Lo que se toma del stock</b>  | <b>[Final]</b> |
|-------------------|----------------|----------------------------------|----------------|
| HEPES             | 1 M            | 500 $\mu$ l                      | 20 mM          |
| NaCl              | 1 M            | 10 ml                            | 400 mM         |
| MgCl <sub>2</sub> | 200 mM         | 187.5 $\mu$ l                    | 1.5 mM         |
| EDTA              | 250 mM         | 20 $\mu$ l                       | 0.2 mM         |
| Glicerol          | 100 %          | 6.25 ml                          | 25 %           |
| DTT*              | 1 M            | 1 $\mu$ l por cada 1mL preparado | 1 mM           |
| PMSF*             | 100 mM         | 5 $\mu$ l por cada 1mL preparado | 0.5 mM         |
| H <sub>2</sub> O  | -              | cbp 25 ml                        | -              |

\* Se agrega al momento de la utilización del buffer.

### **10.12 Inmunodetección de p65 (NF- $\kappa$ B) a partir de los extractos nucleares de los astrocitos.**

Se obtuvo la fracción nuclear de las células control y las tratadas con 500 ng/ml de LPS. Se cuantificó la cantidad de proteína total presente en las fracciones por el método de Bradford. Se determinó la presencia de p65 (NF- $\kappa$ B) en las fracciones nucleares de las células tratadas mediante su inmunodetección por Western Blot. Se separaron 15  $\mu$ g de proteína nuclear en un gel al 11% de

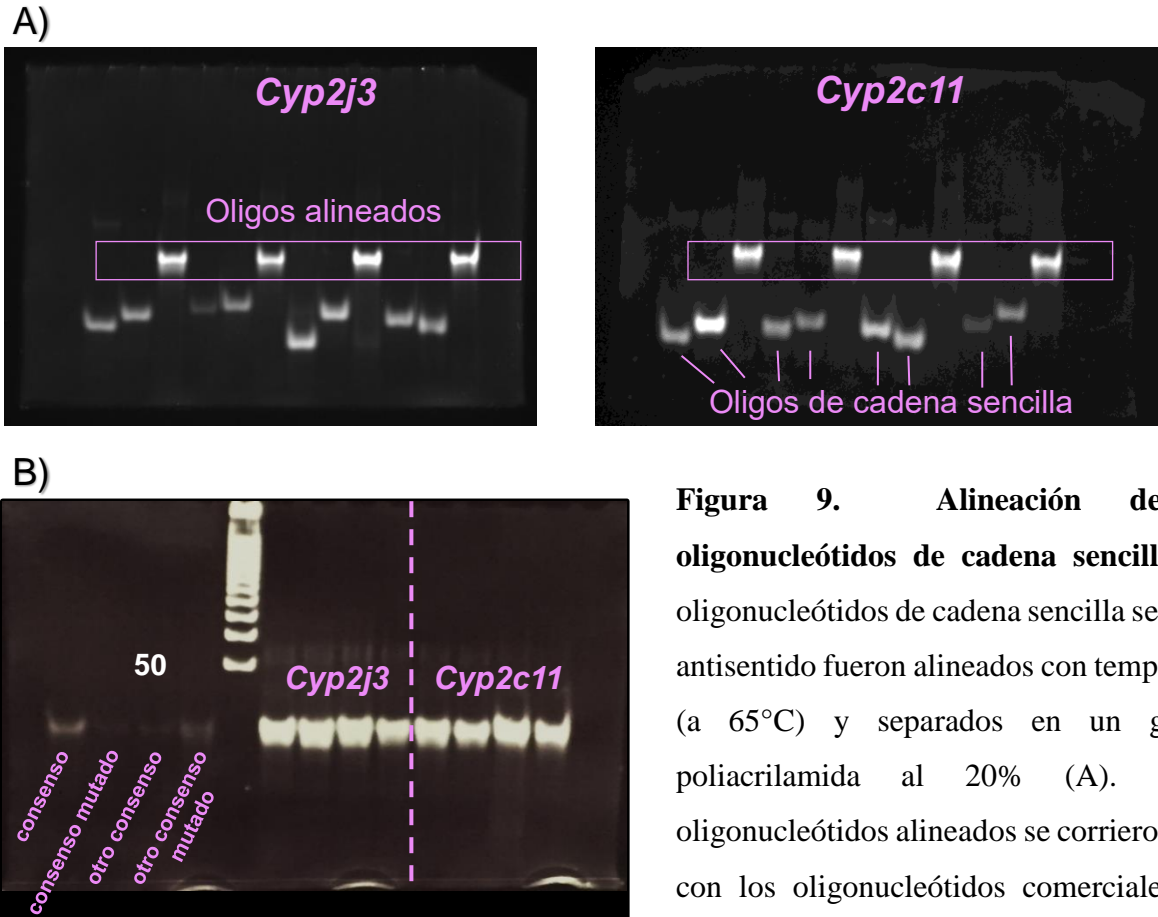
poliacrilamida. Se utilizó un marcador de peso molecular biotilado (Cell Signaling) como referencia. El anticuerpo primario anti-p65 se utilizó en una dilución 1:5000.

### **10.13 Análisis de secuencias de la base de datos.**

Se realizó una búsqueda de sitios de unión de NF- $\kappa$ B (elementos de respuesta) dentro del promotor de los genes *Cyp2j3* y *Cyp2c11*. La búsqueda se realizó con el programa de libre acceso AliBaba 2.1 (BIOBASE), utilizando para realizar la búsqueda 4500 pares de bases río arriba del codón de inicio de la transcripción ATG.

### **10.14 Construcción de los oligonucleótidos con la presencia de las secuencias de unión a NF- $\kappa$ B encontradas bioinformáticamente.**

Se mandaron construir oligonucleótidos de cadena sencilla (sentido y antisentido) con las secuencias encontradas bioinformáticamente (Invitrogen Life Technologies) (Tabla 4). Los oligonucleótidos constaron de 22 bases en total, las bases que no formaron parte de los elementos de respuesta a NF- $\kappa$ B fueron completadas de tal manera que coincidieran con la secuencia consenso comercial (Figura 17). Los oligonucleótidos de cadena sencilla sentido y antisentido fueron alineados a 65°C y fueron mantenidos a temperatura ambiente durante toda la noche (aproximadamente 16 h). Posteriormente, se realizó una electroforesis de los oligonucleótidos no alineados y alineados en un gel de poliacrilamida al 20% para corroborar el alineamiento (Figura 9A). Como controles, se corrieron también los oligonucleótidos comerciales con la secuencia consenso de NF- $\kappa$ B y con la secuencia consenso mutada (Santa Cruz Biotechnology) (Figura 9B).



**Figura 9. Alineación de los oligonucleótidos de cadena sencilla.** Los oligonucleótidos de cadena sencilla sentido y antisentido fueron alineados con temperatura (a 65°C) y separados en un gel de poliacrilamida al 20% (A). Los oligonucleótidos alineados se corrieron junto con los oligonucleótidos comerciales para corroborar su peso (B).

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para el EMSA.**

| Identificador    | 5' Secuencia sentido 3'   | 5' Secuencia antisentido 3'           |
|------------------|---|---------------------------------------|
| 2C11 1           | AGTCACAGGGAATTTCCCAGGC  | GCCTGGGAAATTCCTGTGACT                 |
| 2C11 2           | AGTTGAGGGGAGACTCCCAGGC  | GCCTGGGAGTCTCCCCTCAACT                |
| 2C11 3           | AGTTGAGTGAATCCCTCAGGC   | GCCTGAGGGATTCCACTCAACT                |
| 2C11 4           | AGTTGAGCGGAAATTTCCCAGGC   | GCCTGGGAATTTCCGCTCAACT                |
| 2J3 1            | AGTTAGAGGGACTTCCTCAGGC  | GCCTGAGGAAGTCCCTCTAACT                |
| 2J3 2            | AGTTGAGAGAAATTTCCCAGGC  | GCCTGGGGAATTTCTCTCAACT                |
| 2J3 3            | AGTTGAGGGAAATCCAACAGGC  | GCCTGTTGGATTTCCCTCAACT                |
| 2J3 4            | AGTTGAGAGGAGTCTCCCAGGC  | GCCTGGGAGACTCCTCTCAACT                |
| Sec consenso     | AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC  | Suministrado como DNA de doble cadena |
| Sec consenso mut | AGTTGAGGCGACTTTCCCAGGC  | Suministrado como DNA de doble cadena |
| sox2             | AACTGCACATGGGTGTGTGCAAACCG<br>T (Martínez-Ramírez <i>et al.</i> 2017) | Suministrado como DNA de doble cadena |

### 10.15 Marcaje de los oligonucleótidos con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ .

Se marcaron veinte nanogramos (20 ng) de oligonucleótido de doble cadena con  $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ . La reacción de marcaje se llevó a cabo con la cinasa de polinucleótidos T4 (Thermo Scientific), en la presencia del buffer de reacción A (10X). La reacción se incubó a 37°C por 30 min. y se detuvo calentándola a 65°C por 15 min. Finalmente, se agregaron 30  $\mu\text{l}$  de TBE 1X a la reacción, obteniéndose un volumen final de 40  $\mu\text{l}$  con una concentración final de 0.5 ng/ $\mu\text{l}$  de oligonucleótido marcado (Tabla 5). Los oligonucleótidos marcados se almacenaron en viales de 200  $\mu\text{l}$  contenidos en recipientes de plomo a -70°C hasta su utilización.

**Tabla 5. Preparación de la reacción para marcar radiactivamente los oligonucleótidos.**

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| H <sub>2</sub> O                | 7 $\mu\text{l}$                             |
| Oligonucleótido                 | 1 $\mu\text{l}$ (20 ng)                     |
| Buffer A (10X)                  | 1 $\mu\text{l}$                             |
| Enzima T4 cinasa                | 0.5 $\mu\text{l}$                           |
| $\gamma^{32}\text{P-ATP}$       | 0.5 $\mu\text{l}$                           |
| TBE 1X                          | 30 $\mu\text{l}$                            |
| Volumen total / [Concentración] | 40 $\mu\text{l}$ / [0.5 ng/ $\mu\text{l}$ ] |

### 10.16 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA).

Para realizar los EMSAs, se utilizaron 20  $\mu\text{g}$  de la proteína nuclear más 2  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido marcado (1 ng). La mezcla de reacción se llevó a cabo en presencia del buffer de reacción (20 mM HEPES, 50 mM KCl, 20% glicerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA, 1 mg/ml poli-dI-dC). La mezcla de reacción se cargó en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 6.5% y se resolvió a 80V durante 1 h y luego a 120V durante 50 min. La electroforesis se llevó a cabo en buffer TBE 1X. El gel se secó y los complejos DNA-proteína se visualizaron exponiendo el gel a una pantalla de almacenamiento de fósforo y posteriormente leyéndola en un equipo Typhoon 9400. Las imágenes fueron procesadas con el software ImageQuant (Molecular

Dynamics, San Francisco, CA). La identidad de NF- $\kappa$ B en los complejos DNA-proteína fue corroborada mediante ensayos de supershift (mayor retraso del corrimiento electroforético), utilizando concentraciones crecientes de un anticuerpo anti-p65 de NF- $\kappa$ B. En los ensayos de supershift se utilizó un anticuerpo anti-cIAP1 (celular Inhibitor of Apoptosis Protein 1) como control negativo de unión, proporcionado por el grupo de investigación del Dr. Alejandro Zentella Dehesa. Adicionalmente, la identidad de NF- $\kappa$ B fue corroborada por ensayos de competencia contra el oligonucleótido consenso comercial. En estos ensayos, se colocó un excedente (100X) de los oligonucleótidos encontrados con mayor afinidad para cada gen sin marca radiactiva (secuencias CYP2C11 1 y CYP2C11 4 para el gen *Cyp2c11* y secuencias CYP2J3 1 y CYP2J3 2 para el gen *Cyp2j3*), llamados coloquialmente “oligos fríos”, para competir con la cantidad establecida previamente de oligonucleótido con la secuencia consenso comercial marcada radiactivamente. De esta forma, mientras menor fuera la marca radiactiva detectada, mayor sería el número de complejos formados con los oligonucleótidos con las secuencias putativas de unión encontradas, lo que demostraría que los complejos fueron arrestados, que ya no pudieron unir con el oligonucleótido de la secuencia consenso comercial y por lo tanto a la marca radiactiva. En los ensayos de competencia con los “oligos fríos” se utilizó como control negativo, un oligonucleótido que contuvo una secuencia de unión putativa a *sox2* (Tabla 4), que fue proporcionado por la Dra. Marcela Lizano (Martínez-Ramírez *et al.* 2017). Se realizaron cuatro experimentos diferentes (n = 4) con los extractos nucleares obtenidos de cuatro cultivos primarios diferentes y se obtuvieron las imágenes de los EMSA para validar la reproducibilidad.

### **10.17 Análisis estadístico.**

Se corroboró la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene. Por lo tanto, los resultados fueron analizados utilizando pruebas de ANOVA, y para realizar comparaciones múltiples se utilizó el procedimiento LSD de Fisher. Cuando se detectó heterogeneidad en las varianzas, se utilizó la prueba de ANOVA de Welch. Los resultados fueron analizados por bloques cuando se requirió. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó utilizando el software SAS 9.0.

## 11. RESULTADOS

### 11.1 El cultivo primario de astrocitos está conformado por 99% de células positivas a GFAP y negativas para Iba-1.

Se llevó a cabo la identificación del tipo celular que conformaba mayoritariamente los cultivos primarios obtenidos, con el fin de demostrar su pureza y la eficiencia la obtención de las células. El número total de células se definió al contar el número total de núcleos teñidos con Hoechst (Figura 10). El número total de astrocitos se definió al contar las células que estuvieran marcadas con GFAP (núcleo y GFAP). De esta forma, se definió que la pureza del cultivo fue del 99 % (Tabla 6).

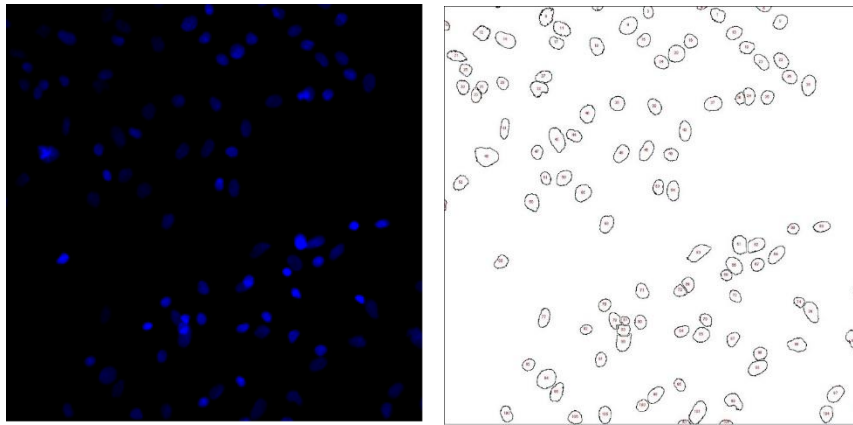
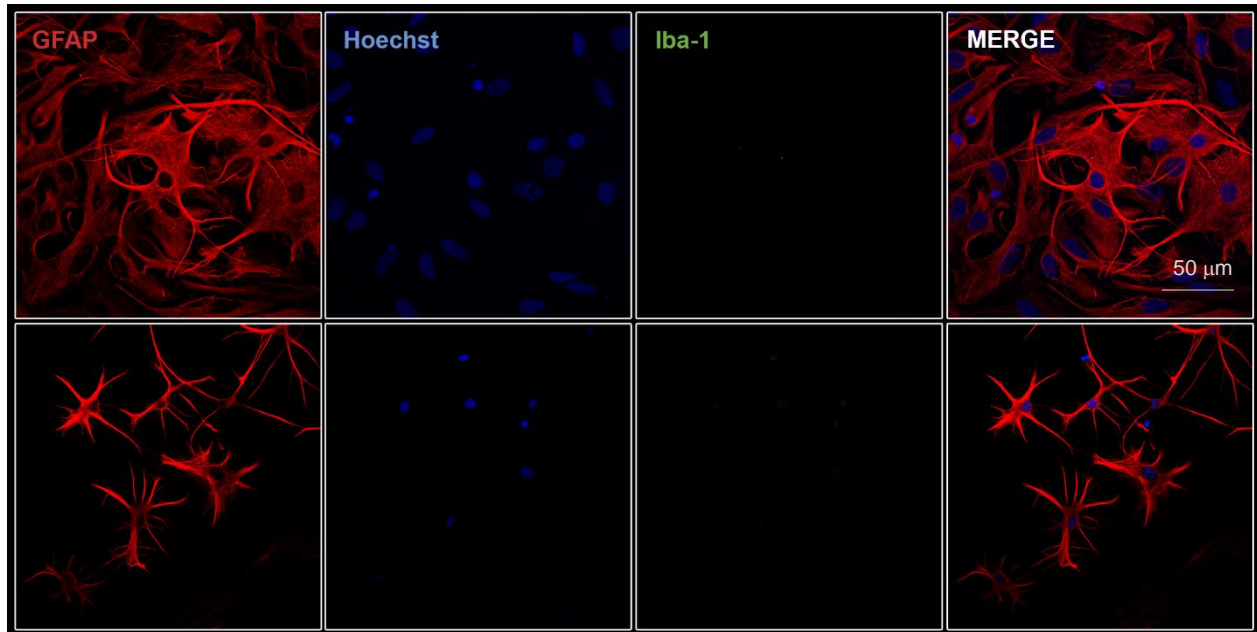


Figura 10. Conteo del número de núcleos por medio del software “MacBiophotonics ImageJ”.

Tabla 6. Conteo del número total de astrocitos por cultivo.

|                | # Total de células<br>(marcadas con<br>Hoescht) | # Total de astrocitos<br>(marcados con<br>GFAP) | % Astrocitos |
|----------------|---|---|--------------|
| <b>Campo 1</b> | 108   | 106   | 98.2         |
| <b>Campo 2</b> | 114   | 113   | 99.1         |
| <b>Campo 3</b> | 124   | 124   | 100          |
|                |   | <b>Promedio</b>                                 | <b>99.09</b> |
|                |   | <b>Desviación estándar</b>                      | <b>0.92</b>  |

Adicionalmente, se realizó una co-tinción de GFAP e Iba-1 para descartar la presencia de células microgliales. No se encontró la presencia de células microgliales, como se muestra en la Fig. 11.



**Figura 11. Pureza del cultivo primario de astrocitos.** Los cultivos primarios fueron incubados con anticuerpos primarios anti-GFAP (1:1000) y anti-Iba-1 (1:1000) de forma concurrente. Posteriormente, se incubaron los cubreobjetos con los anticuerpos secundarios correspondientes. No se encontraron células microgliales teñidas con Iba-1. Las imágenes de las inmunofluorescencias se tomaron en un microscopio invertido Olympus IX2 con una cámara Hamamatsu c9100-02 y un lente 40X. La barra de escala = 50 μm.

### 11.2 El tratamiento con LPS induce la secreción de TNF- $\alpha$ por los astrocitos.

Se ha establecido que la estimulación de cultivos de astrocitos con LPS, conduce a la producción de citocinas pro-inflamatorias (Minogue *et al.* 2012). Para corroborar que el tratamiento con 100 ng/ml de LPS inducía una respuesta inflamatoria en nuestro modelo, se cuantificó la producción de TNF- $\alpha$  en los medios de cultivo condicionados, estimulados y sin estimular con LPS, utilizando un kit de ELISA específico. Se encontró que los astrocitos estimulados produjeron aproximadamente 25 veces más TNF- $\alpha$  que los cultivos control ( $p < 0.05$ ; Tabla 7), alcanzando a producir 3 ng/ml aproximadamente, como ha sido reportado anteriormente (Minogue *et al.* 2012).



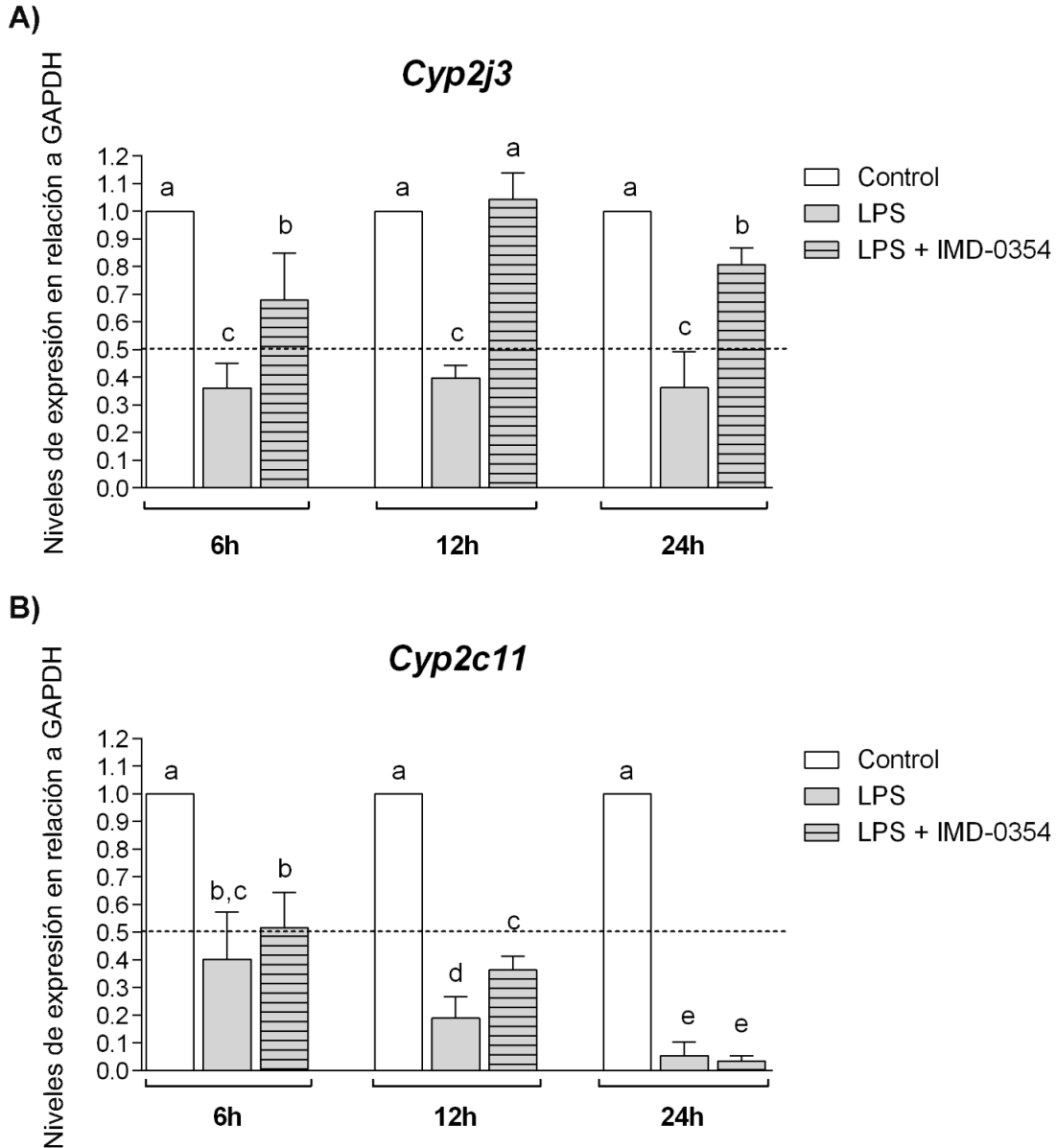
**Tabla 7. Producción de TNF- $\alpha$  por los astrocitos después de su tratamiento con LPS.**

| Tratamiento          | Tiempo de exposición | [TNF- $\alpha$ ] Promedio (pg/ml) | DE   |
|----------------------|----------------------|-----------------------------------|------|
| Control              | 6h                   | 90                                | 40   |
| <b>100 ng/ml LPS</b> |                      | <b>2154*</b>                      | 831  |
| Control              | 12h                  | 134                               | 85   |
| <b>100 ng/ml LPS</b> |                      | <b>3131*</b>                      | 1679 |
| Control              | 24h                  | 108                               | 35   |
| <b>100 ng/ml LPS</b> |                      | <b>3156*</b>                      | 1556 |

**11.3 La inflamación inducida por LPS disminuye la expresión del *Cyp2j3* y *Cyp2c11*, y este efecto se previene cuando se inhibe la vía de NF- $\kappa$ B.**

Los cultivos primarios de astrocitos fueron tratados en presencia o ausencia de 100 ng/ml de LPS y 100 ng/ml LPS + 1 ng/ml de IMD-0354. La cantidad de mRNA de los CYP epoxigenasas fue determinada a las 6, 12 y 24 h de tratamiento. El tratamiento con LPS disminuyó significativamente la expresión del *Cyp2j3* y del *Cyp2c11* en más del 50% en comparación con los controles en todos los tiempos evaluados ( $p < 0.05$ ; Fig. 12). Cabe destacar que el tratamiento con LPS disminuyó la expresión del *Cyp2c11* de forma creciente dependiendo del tiempo de exposición, alcanzando una disminución de más del 90% a las 24h de tratamiento con LPS (Fig. 12B).

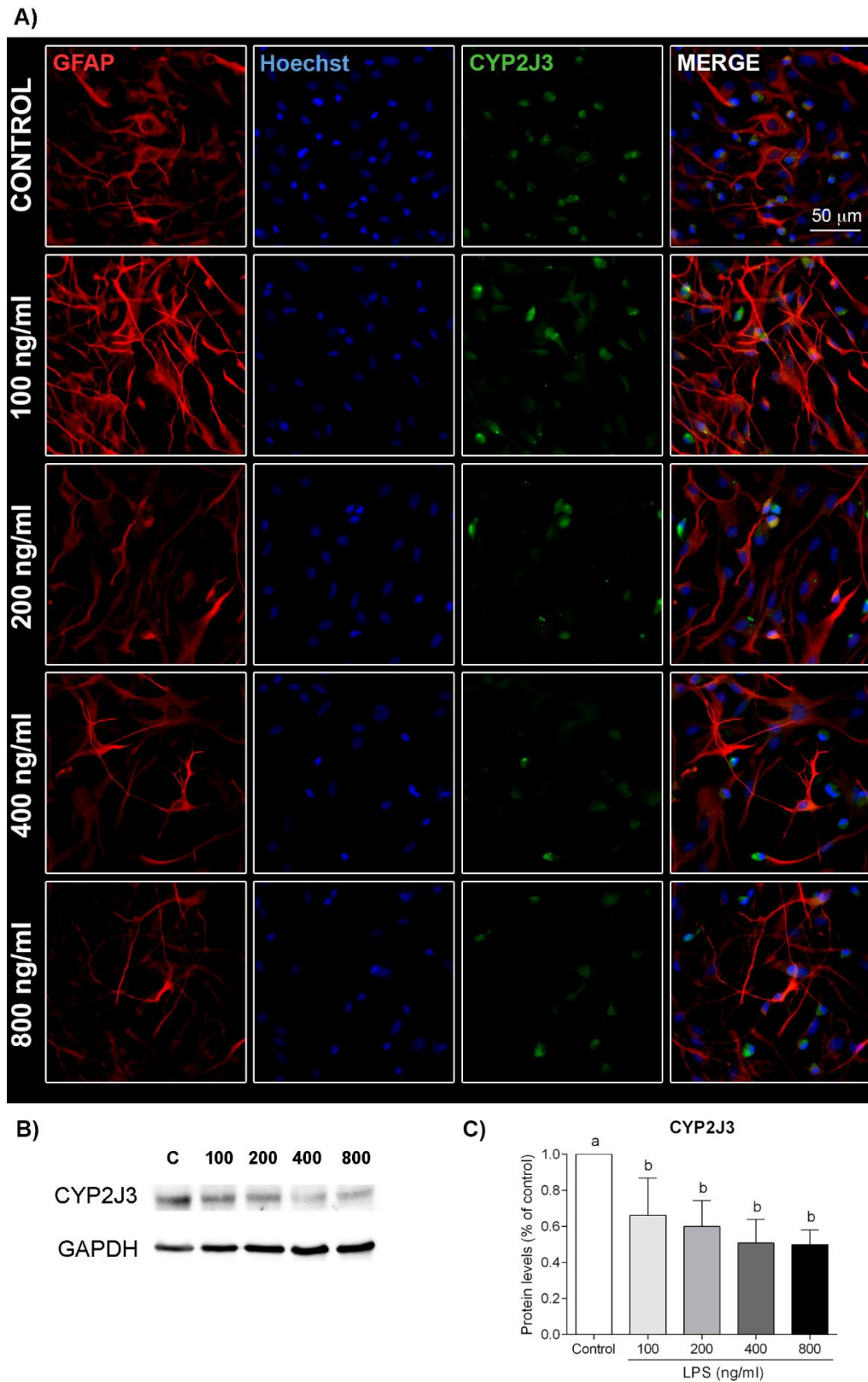
El tratamiento con LPS desencadena la producción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$ , que, a su vez, conducen a la activación de la vía de NF- $\kappa$ B (Minogue *et al.* 2012). Para investigar el papel de NF- $\kappa$ B en la regulación de los CYP epoxigenasas, se llevó a cabo el co-tratamiento de los astrocitos con LPS y el inhibidor selectivo de NF- $\kappa$ B (IMD-0354). Cuando la vía de NF- $\kappa$ B fue inhibida, se logró prevenir casi por completo la disminución en la expresión del *Cyp2j3* por la inflamación inducida por el LPS, alcanzando los niveles de expresión de los cultivos control a las 12 h de tratamiento ( $p < 0.05$ ; Fig. 12A). Por otra parte, la disminución en la expresión del *Cyp2c11* se logró prevenir sólo parcialmente a las 6 y 12 h de tratamiento, pero no a las 24 h ( $p < 0.05$ ; Fig. 12B).



**Figura 12. Niveles de expresión relativa de *Cyp2j3* y *Cyp2c11*.** Los cultivos primarios de astrocitos fueron tratados o no con LPS o LPS + IMD-0354 (inhibidor selectivo de NF- $\kappa$ B). Se determinaron los niveles de expresión relativa del *Cyp2j3* (A) y *Cyp2c11* (B) con respecto a la expresión de *GAPDH* por qRT-PCR. Las barras representan las medias  $\pm$  DE de cuatro experimentos diferentes (n = 4). Los datos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . Los promedios señalados con letras diferentes son diferentes significativamente entre ellos.

#### **11.4 Los niveles de proteína del CYP2J3 y CYP2C11 son disminuidos por el tratamiento con LPS de forma dependiente de la dosis.**

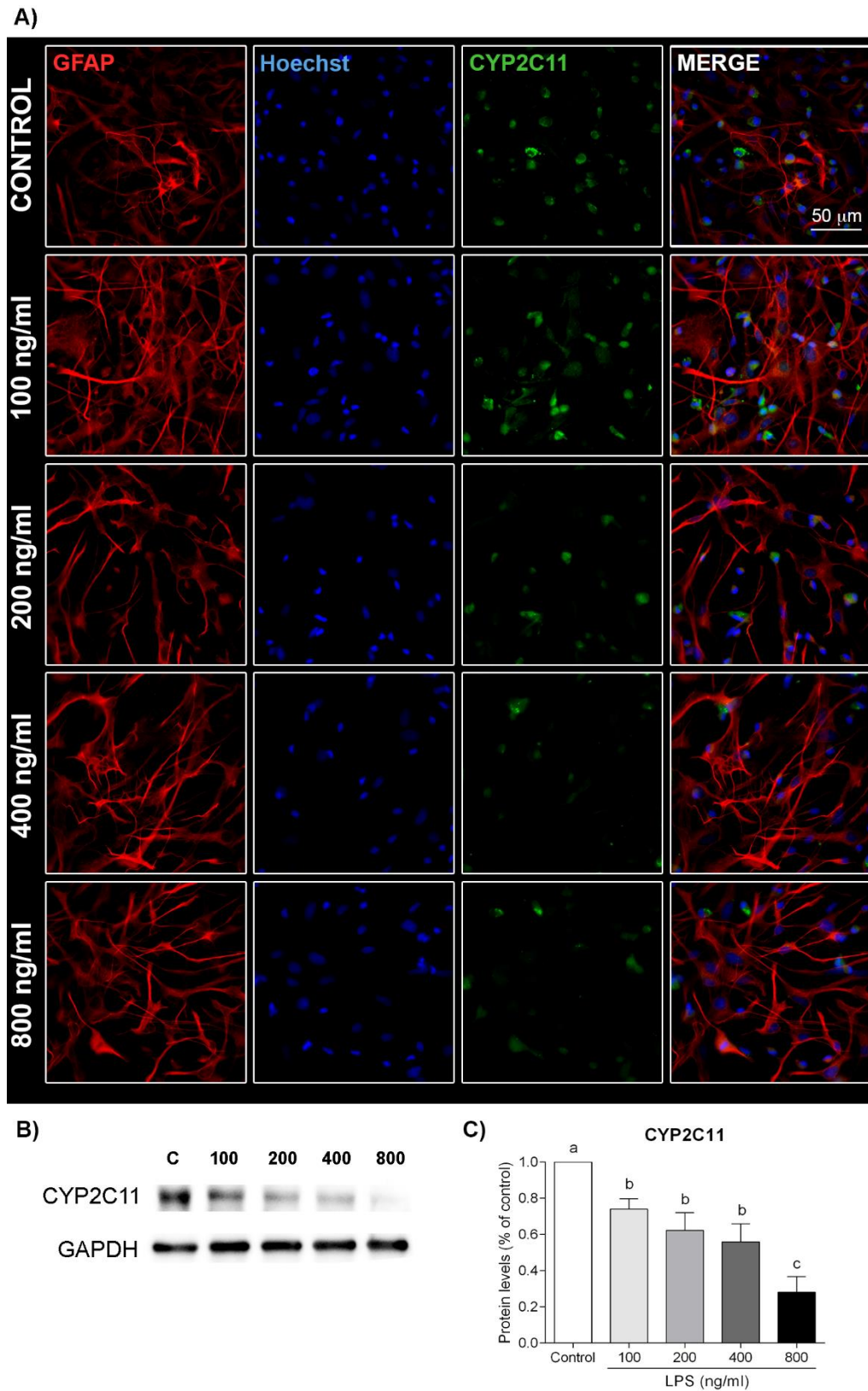
Para determinar si la regulación negativa del *Cyp2j3* y *Cyp2c11* mediada por LPS se podría traducir en una disminución de los niveles de proteína de estos CYP epoxigenasas, los astrocitos fueron tratados con concentraciones crecientes de LPS (de 100 a 800 ng/ml) por 24 h. Los niveles de proteína de los CYP fueron determinados por inmunofluorescencia y por Western Blot. Las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia mostraron que la localización del CYP2J3 y CYP2C11 se encuentra principalmente alrededor del núcleo de los astrocitos, de acuerdo a la localización característica de los CYP, en el retículo endoplásmico de las células. También se pudo observar que la señal del CYP2J3 (Fig. 13A) y CYP2C11 (Fig. 14A) disminuyó de forma dependiente de la dosis de LPS. Sin embargo, para corroborar cuantitativamente este efecto, los niveles de proteína de los CYP fueron determinados por Western Blot (Fig. 13B y Fig. 14B). Los niveles de proteína del CYP2J3 y CYP2C11 fueron disminuidos significativamente a partir de la menor concentración utilizada de LPS (100 ng/ml), en adelante ( $p < 0.05$ ; Fig. 13C y Fig. 14C). Los niveles del CYP2J3 presentaron una tendencia a disminuir dependiente de la dosis (Fig. 13C). Sin embargo, sólo los niveles del CYP2C11 presentaron una disminución dependiente de la dosis estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ , Fig. 14C). También se encontró que los niveles de proteína del CYP2C11 disminuyeron en mayor medida (alcanzando una disminución máxima del 78%, con la mayor concentración utilizada, 800 ng/ml de LPS), comparados con los del CYP2J3 (que sólo alcanzaron un 50% de disminución máxima, utilizando 800 ng/ml de LPS). Estos resultados concuerdan con el efecto que tuvo el LPS en la expresión del *Cyp2j3* y *Cyp2c11*, en donde los niveles del mRNA del *Cyp2c11* disminuyeron en mayor medida.



**Figura 13.**

**Figura 13. Efecto del tratamiento con LPS en los niveles de proteína del CYP2J3 en astrocitos.** Los astrocitos fueron tratados con concentraciones crecientes de LPS (de 100 a 800 ng/ml) por 24 h. Los niveles de proteína del CYP2J3 fueron determinados por inmunofluorescencia (A) y por Western Blot (B). Las imágenes de las inmunofluorescencias se tomaron en un microscopio invertido Olympus IX2 con una cámara Hamamatsu c9100-02 y un lente 40X. La barra de escala = 50  $\mu$ m. La cuantificación relativa de los niveles de proteína del CYP2J3 fue llevada a cabo mediante la determinación de la intensidad de las bandas utilizando el software Image J (C). Los niveles de proteína del CYP fueron normalizados con respecto a los niveles de proteína del GAPDH y los resultados se muestran como el porcentaje respecto al control (% del control). Las barras representan las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . Los promedios señalados con letras diferentes son diferentes significativamente entre ellos.

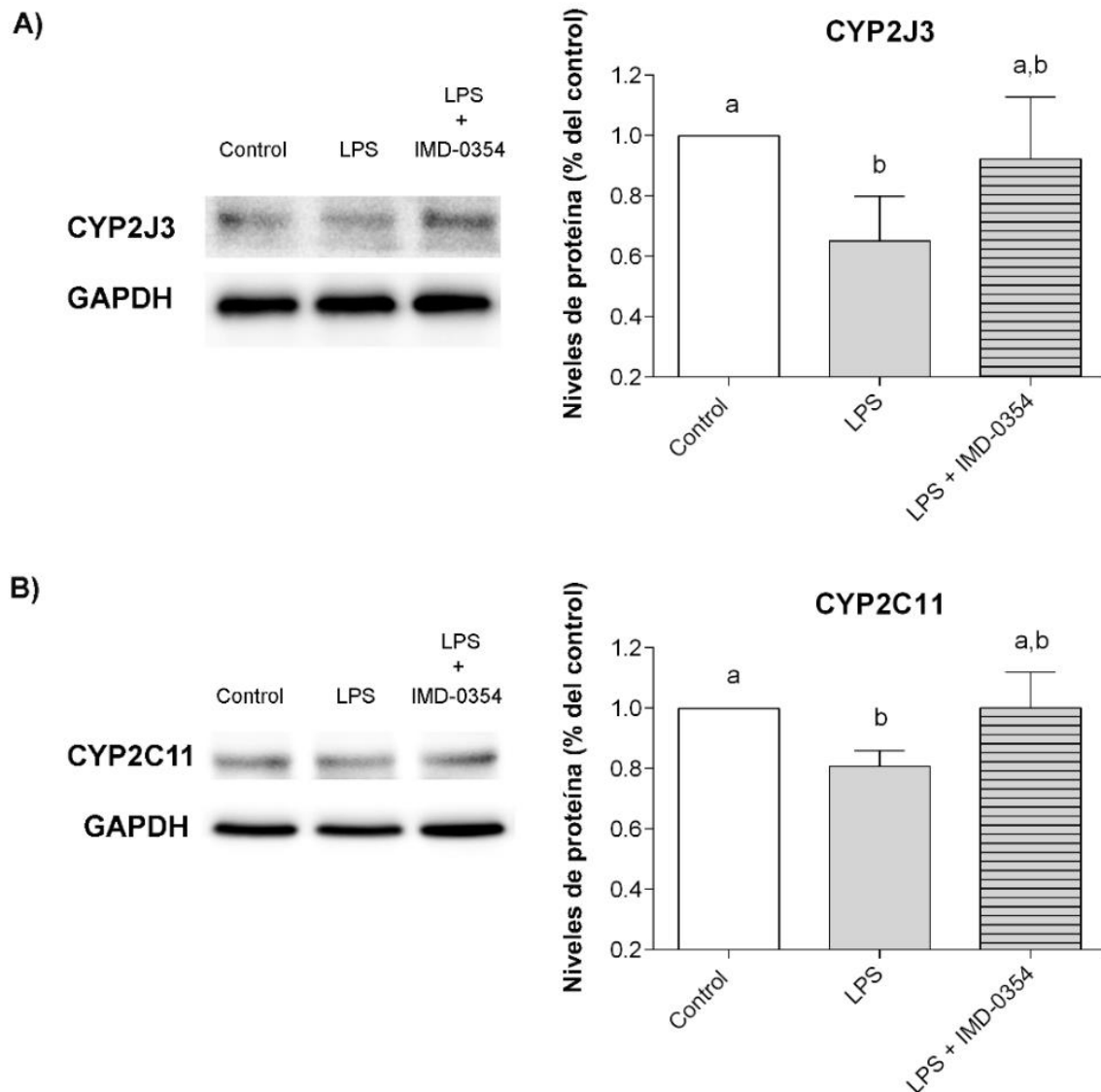
**Figura 14. Efecto del tratamiento con LPS en los niveles de proteína del CYP2C11 en astrocitos.** Los astrocitos fueron tratados con concentraciones crecientes de LPS (de 100 a 800 ng/ml) por 24 h. Los niveles de proteína del CYP2C11 fueron determinados por inmunofluorescencia (A) y por Western Blot (B). Las imágenes de las inmunofluorescencias se tomaron en un microscopio invertido Olympus IX2 con una cámara Hamamatsu c9100-02 y un lente 40X. La barra de escala = 50  $\mu$ m. La cuantificación relativa de los niveles de proteína del CYP2C11 fue llevada a cabo mediante la determinación de la intensidad de las bandas utilizando el software Image J (C). Los niveles de proteína del CYP fueron normalizados con respecto a los niveles de proteína del GAPDH y los resultados se muestran como el porcentaje respecto al control (% del control). Las barras representan las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . Los promedios señalados con letras diferentes son diferentes significativamente entre ellos.



**Figura 14.**

### **11.5 La inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B previno parcialmente la disminución dependiente de LPS de los niveles de proteína del CYP2J3 y del CYP2C11.**

Los niveles de proteína del CYP2J3 y CYP2C11 disminuyeron significativamente con el tratamiento con LPS (100 ng/ml, 24 h), y este efecto se evitó parcialmente cuando se agregó 1 ng/ml de IMD-0354 simultáneamente ( $p < 0.05$ ; Fig. 15). Estos resultados corroboran la participación de NF- $\kappa$ B en la disminución de los niveles de proteína del CYP2J3 y CYP2C11 durante el proceso inflamatorio desencadenado por la administración de LPS. Además, estos resultados concuerdan con los obtenidos a nivel transcripcional, principalmente para el CYP2J3 (Fig. 15A), dado que los niveles de sus transcritos alcanzaron los niveles del control a las 12 h, y casi alcanzaron los niveles del control a las 6 y 24 h de tratamiento concurrente con IMD-0354 (Fig. 12A). La disminución en los niveles de proteína del CYP2C11 también logró prevenirse parcialmente cuando se bloqueó la vía de NF- $\kappa$ B (Fig. 12 B), lo que también coincidió con sus niveles de mRNA a las 6 y 12 h de tratamiento concurrente, aunque el efecto fue menos notorio a nivel transcripcional (Fig. 12B).



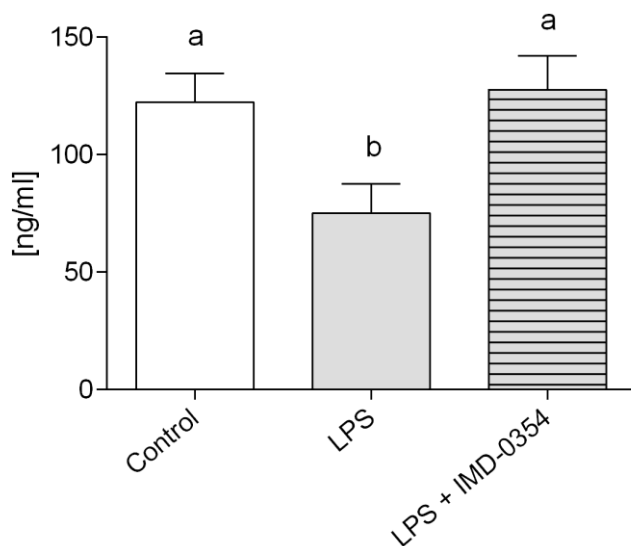
**Figura 15. Efecto del inhibidor selectivo de NF- $\kappa$ B, IMD-0354, en la disminución dependiente de LPS de los niveles de proteína del CYP2J3 y CYP2C11.** Los cultivos primarios de astrocitos fueron tratados o no con LPS o LPS + IMD-0354 durante 24 h. Los niveles de proteína del CYP2J3 (A) y CYP2C11 (B) fueron determinados por Western Blot. La cuantificación relativa de los niveles de proteína de los CYP fue llevada a cabo mediante la determinación de la intensidad de las bandas utilizando el software Image J. Los niveles de proteína del CYP fueron normalizados con respecto a los niveles de proteína del GAPDH y los resultados se muestran como el porcentaje respecto al control (% del control). Las barras representan las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes (n = 3). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . Los promedios señalados con letras diferentes son diferentes significativamente entre ellos.



## 11.6 La actividad epoxigenasa total disminuye con el tratamiento con LPS.

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B no sólo puede regular a los CYP a nivel transcripcional, sino que, también puede interferir en última instancia con la actividad de estas enzimas (Zordoky & El-Kadi 2009). Para investigar si la inflamación inducida por el LPS podía afectar la actividad de epoxigenasa total, así como el papel de NF- $\kappa$ B en esta regulación, los astrocitos fueron tratados con 100 ng/ml de LPS ó 100 ng/ml de LPS + 1 ng/ml de IMD-0354 por 24 h, y se cuantificaron los niveles de 11,12-EET + 11,12-DHET a partir de los astrocitos. El 11,12-EET ha sido previamente identificado como el EET con la mayor actividad anti-inflamatoria (Node *et al.* 1999); por lo tanto, se le seleccionó como el epóxido representativo a cuantificar. La actividad de epoxigenasa total disminuyó significativamente después del tratamiento con LPS, cuantificada como niveles de 11,12-EET + 11,12-DHET ( $p < 0.05$ ; Fig 16). La inhibición de la actividad de NF- $\kappa$ B pudo prevenir este efecto, lo que demostró que la inflamación inducida por el LPS afectó la producción de EETs en los astrocitos a través de la activación de la vía de NF- $\kappa$ B.

**Producción de 11,12-EETs + 11,12-DHETs en astrocitos**

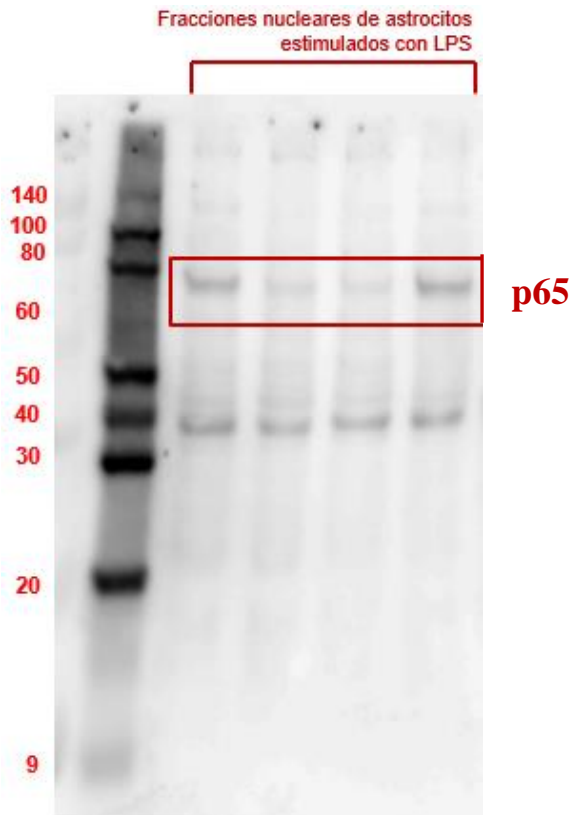


**Figura 16. Actividad epoxigenasa total determinada como la producción de 11,12-EET + 11,12-DHET.** El epóxido 11,12-EET y su producto hidrolizado, el 11,12-DHET, fueron cuantificados a partir de los cultivos de astrocitos tratados o no con LPS y LPS + IMD-0354 (inhibidor selectivo de NF- $\kappa$ B), utilizando un kit de ELISA comercial. Se cuantificó la

actividad epoxigenasa total a partir de tres experimentos independientes ( $n = 3$ ). Las barras representan las medias  $\pm$  DE. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . Los promedios señalados con letras diferentes son diferentes significativamente entre ellos.

### 11.7 NF- $\kappa$ B se encuentra presente en el núcleo de los astrocitos tratados con LPS.

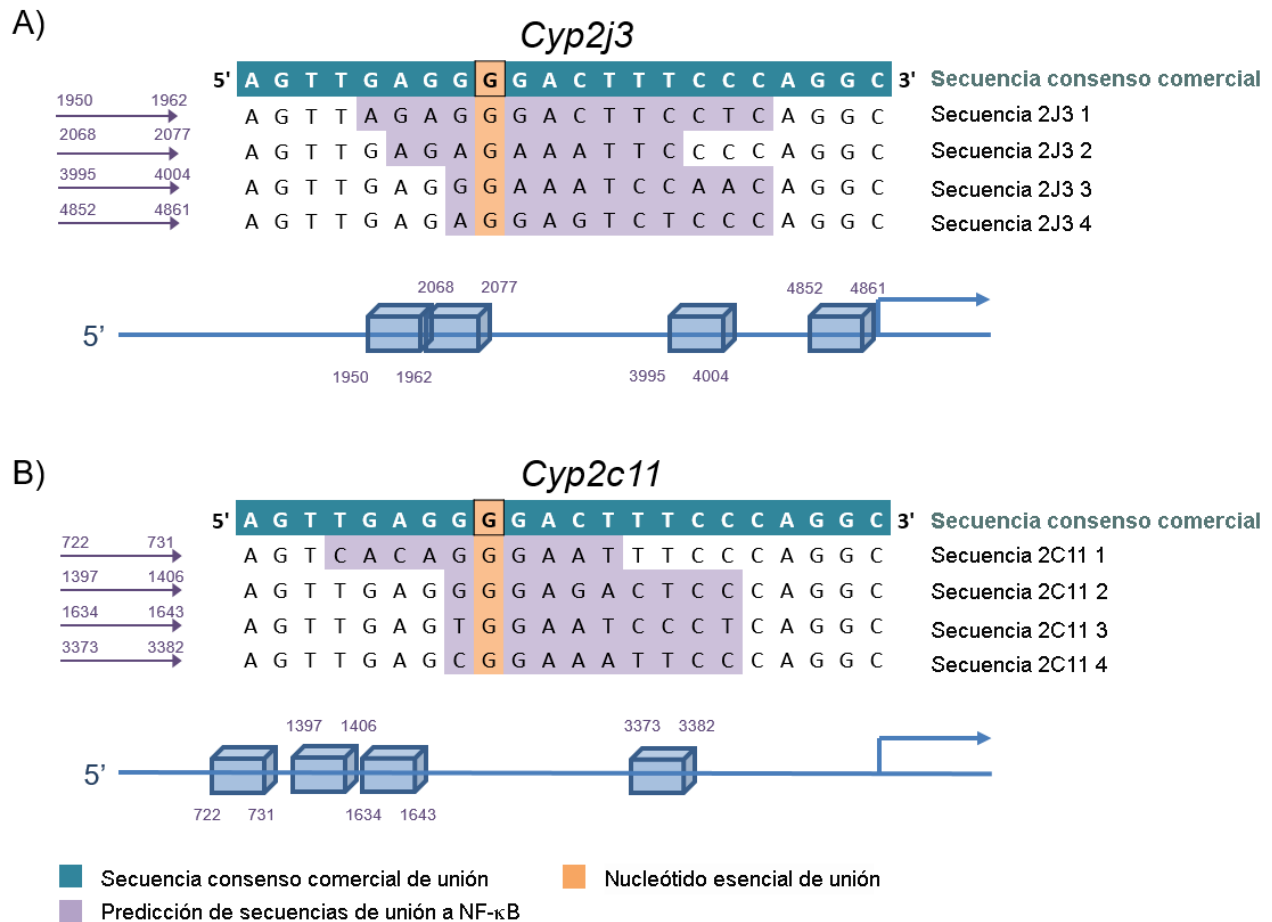
Se realizó una electroforesis de las proteínas nucleares de los astrocitos tratados con LPS. Por medio de un anticuerpo específico anti-p65 de NF- $\kappa$ B se logró determinar la presencia de este factor de transcripción en los núcleos de los astrocitos tratados (Figura 17). De esta forma se corroboró que los extractos nucleares a utilizar sí contenían NF- $\kappa$ B.



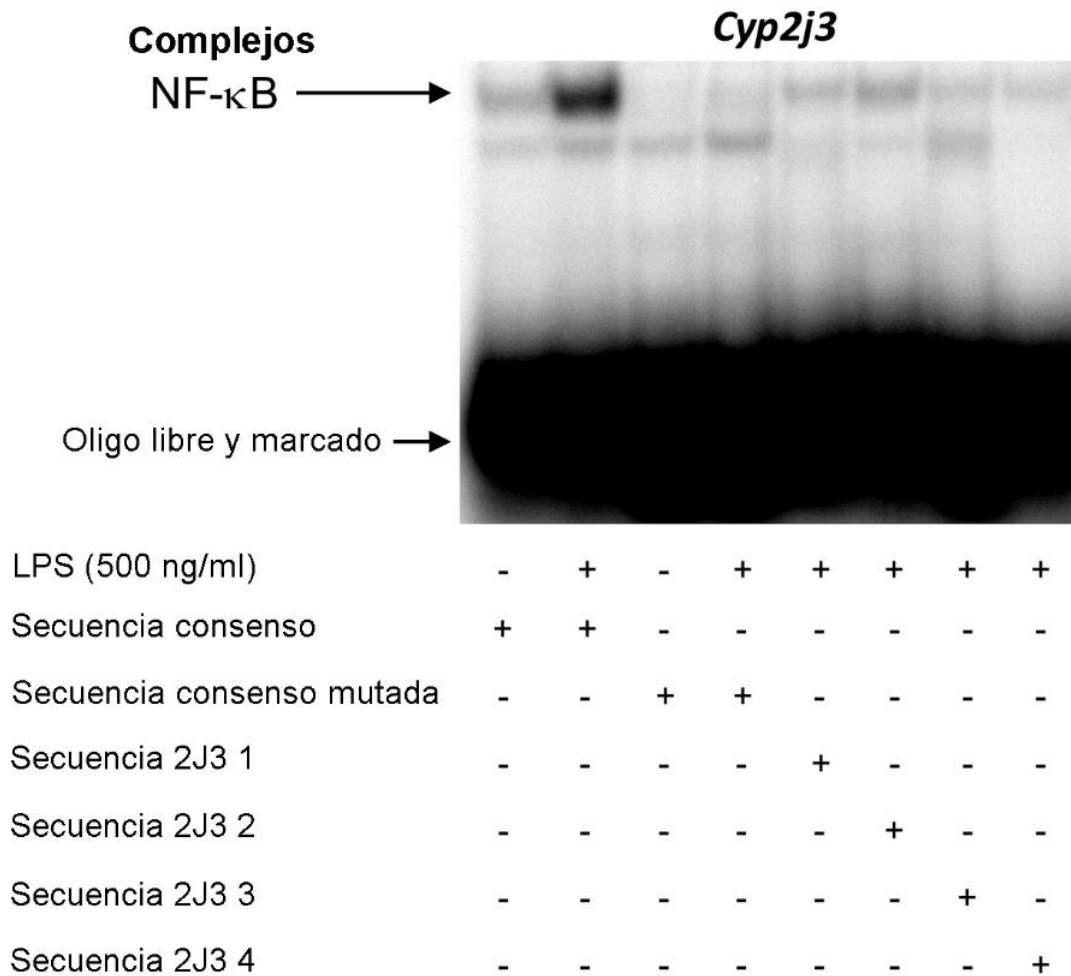
**Figura 17. Ensayo de Inmunodetección por Western Blot de p65.** Se llevó a cabo la electroforesis de los extractos nucleares de los astrocitos estimulados con 500 ng/ml de LPS en un gel de acrilamida al 11%. Se utilizaron 15  $\mu$ g de proteína total.

### **11.8 NF- $\kappa$ B es capaz de unirse específicamente, pero con diferentes afinidades, a cuatro elementos de respuesta encontrados en las regiones promotoras del *Cyp2j3* y del *Cyp2c11*.**

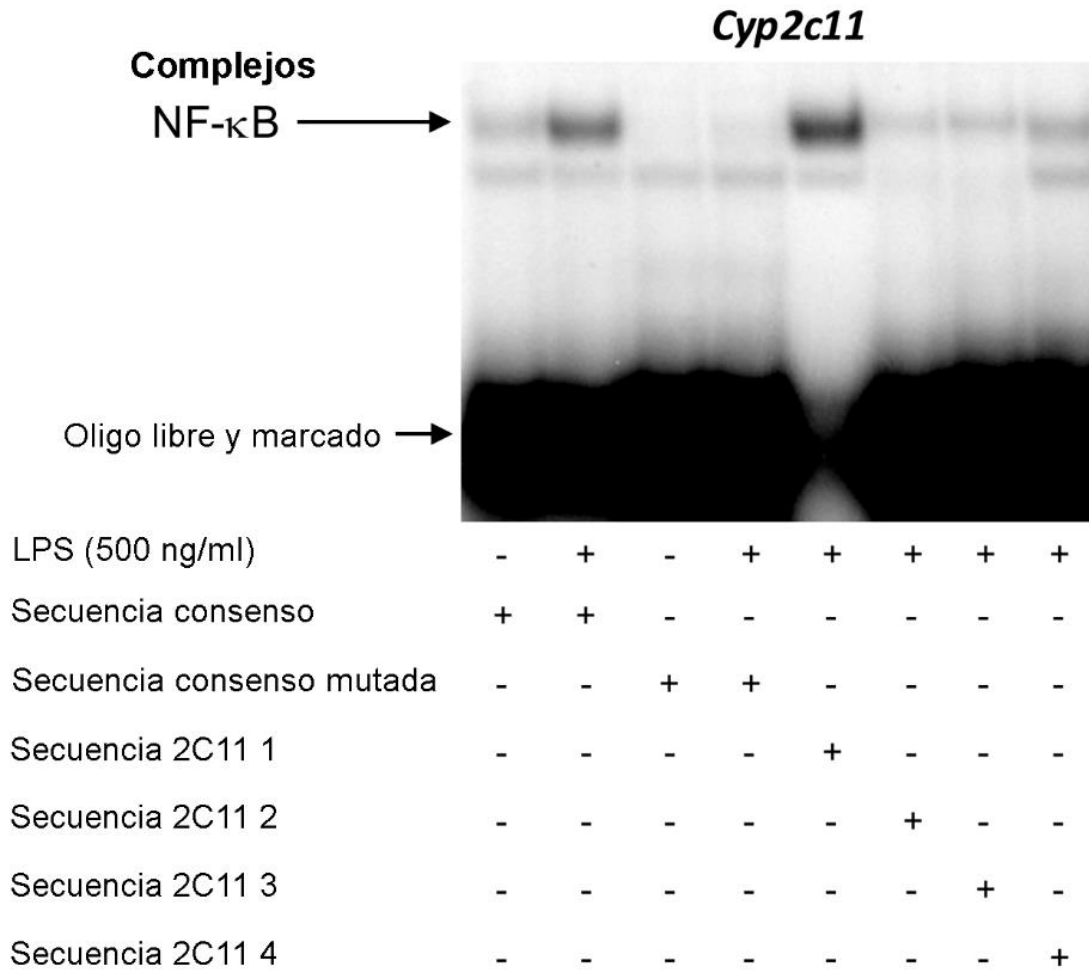
Se encontraron cuatro sitios de unión putativos dentro de las regiones promotoras del *Cyp2c11* y *Cyp2j3*, utilizando el software de libre acceso AliBaba 2.1 (Tabla 4; Fig. 18). Se realizaron EMSAs para determinar si los complejos de NF- $\kappa$ B tendrían la capacidad de reconocer y unirse a los cuatro elementos de respuesta putativos. Las proteínas nucleares de los astrocitos estimulados con o sin LPS fueron utilizadas para llevar a cabo las reacciones de unión. Se identificaron dos complejos DNA-proteína principales cuando se llevaron a cabo las reacciones de unión con la secuencia consenso comercial, pero solamente el complejo más pesado incrementó su tamaño e intensidad cuando se administró LPS. Adicionalmente, sólo el complejo más pesado desapareció cuando en las reacciones de unión se utilizó la secuencia consenso mutada (Fig. 18 y Fig. 19). Por lo tanto, el complejo más pesado fue seleccionado como el complejo de interés. NF- $\kappa$ B fue capaz de unirse a los cuatro elementos de respuesta putativos para cada uno de los genes, *Cyp2c11* y *Cyp2j3*, pero con diferente afinidad. Las secuencias identificadas como CYP2J3 1 y CYP2J3 2 (Fig. 19) y las secuencias CYP2C11 1 y CYP2C11 4 (Fig. 20) mostraron la mayor afinidad, lo que se pudo observar como bandas más gruesas e intensas (Fig. 19 y Fig. 20). La secuencia CYP2C11 1 incluso mostró mayor afinidad que la secuencia consenso comercial. Para determinar la identidad de NF- $\kappa$ B en los complejos DNA-proteína, se realizaron ensayos de Supershift utilizando 300, 600 ó 1200 ng de anticuerpo anti-p65 de NF- $\kappa$ B. Sólo las secuencias con las mayores afinidades de unión fueron probadas en los ensayos de Supershift (CYP2C11 1, CYP2C11 4, CYP2J3 1 y CYP2J3 2) (Fig. 21 y Fig. 22). La adición del anticuerpo anti-p65 resultó en un retraso sutil en el corrimiento electroforético de las bandas y en la reducción de los complejos DNA-proteína, lo que se pudo observar como bandas más delgadas y menos intensas (Fig. 21 y Fig. 22; carriles 4-6 y 8-10), lo que demostró la identidad de NF- $\kappa$ B. Para demostrar de otra manera la identidad de NF- $\kappa$ B, se utilizó un anticuerpo específico para una proteína diferente a NF- $\kappa$ B (anticuerpo anti-cIAP1) como control negativo (Fig. 23; carril 10), y no se observó ningún cambio en el corrimiento electroforético o en la intensidad o grosor de las bandas (no hubo reducción de los complejos DNA-proteína).



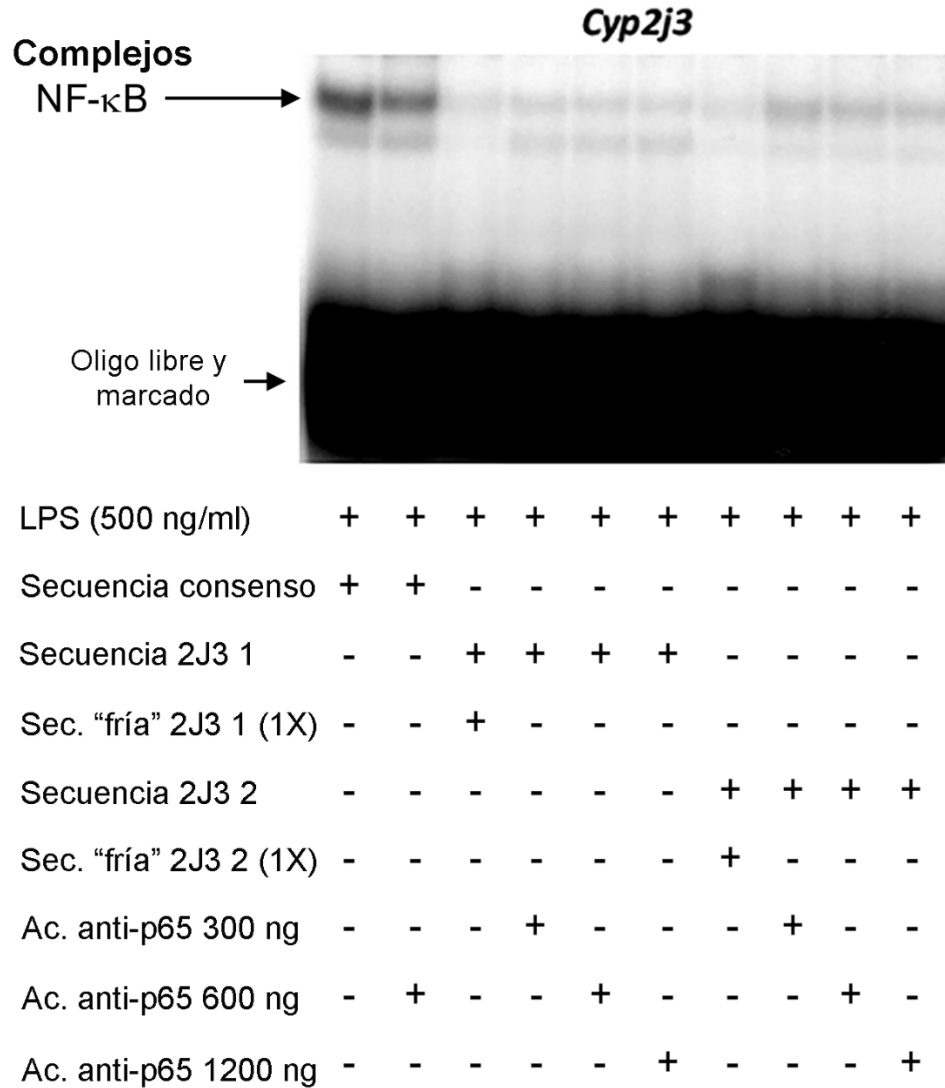
**Figura 18. Predicciones de sitios de unión putativos de NF-κB.** Se realizó una búsqueda de posibles sitios de unión de NF-κB dentro de la región promotora de los genes *Cyp2j3* y *Cyp2c11*. La búsqueda se realizó con el software de libre acceso AliBaba 2.1 (BIOBASE) utilizando 4500 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción ATG. Se encontraron cuatro posibles sitios de unión a NF-κB para cada gen. Se construyeron oligonucleótidos de cadena sencilla de 22 bases que contenían las secuencias de unión predichas y se probaron mediante EMSAs. En color azul se muestra la secuencia consenso de unión a NF-κB comercializada por Santa Cruz Biotechnology. En anaranjado se muestra el nucleótido indispensable para que la unión del factor transcripcional se pueda dar. En morado se muestran las secuencias predichas por el programa.



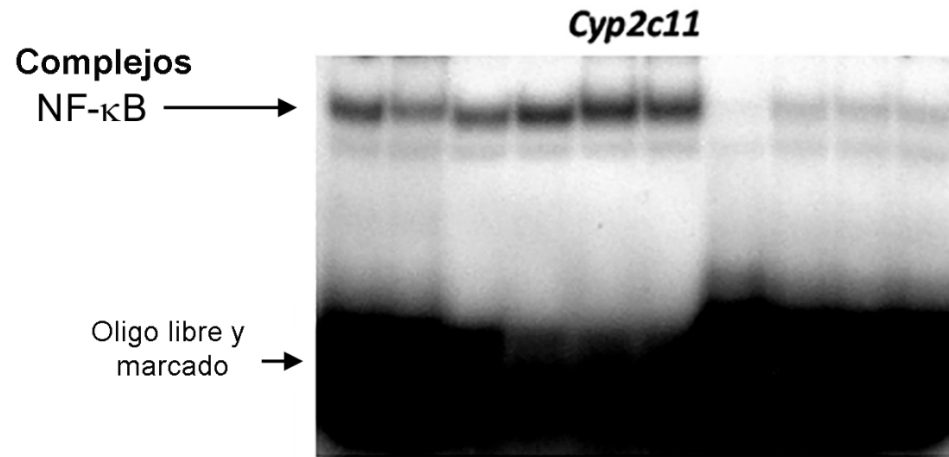
**Figura 19. Ensayo de Cambio en Movilidad Electroforética (EMSA) para secuencias putativas de unión dentro del promotor de *Cyp2j3*.** Los complejos NF-κB son capaces de reconocer y unirse a los cuatro elementos de respuesta putativos encontrados dentro de la región promotora de *Cyp2j3*. Se incubaron 20 μg de la proteína nuclear con 2 μl del oligonucleótido marcado con  $\gamma^{32}$ -P para llevar a cabo las reacciones de unión. El oligonucleótido de la secuencia consenso comercial se utilizó como control positivo de unión. El oligonucleótido de la secuencia consenso comercial mutada se utilizó como control negativo de unión.



**Figura 20. Ensayo de Cambio en Movilidad Electroforética (EMSA) para secuencias putativas de unión dentro del promotor de *Cyp2c11*.** Los complejos NF- $\kappa$ B son capaces de reconocer y unirse a los cuatro elementos de respuesta putativos encontrados dentro de la región promotora de *Cyp2c11*. Se incubaron 20  $\mu$ g de la proteína nuclear con 2  $\mu$ l del oligonucleótido marcado con  $\gamma^{32}$ -P para llevar a cabo las reacciones de unión. El oligonucleótido de la secuencia consenso comercial se utilizó como control positivo de unión. El oligonucleótido de la secuencia consenso comercial mutada se utilizó como control negativo de unión.



**Figura 21. Ensayo de Supershift para las secuencias con mayor afinidad encontradas en el promotor del *Cyp2j3*.** La identidad de NF- $\kappa$ B en los complejos DNA-proteína se confirmó utilizando 300, 600 ó 1200 ng de anticuerpo anti-p65 de NF- $\kappa$ B. Sólo las secuencias con las mayores afinidades de unión fueron probadas en los ensayos de Supershift (CYP2J3 1 y CYP2J3 2). Además, se realizaron ensayos de competencia utilizando las mismas secuencias sin marcar (en frío) (1x).

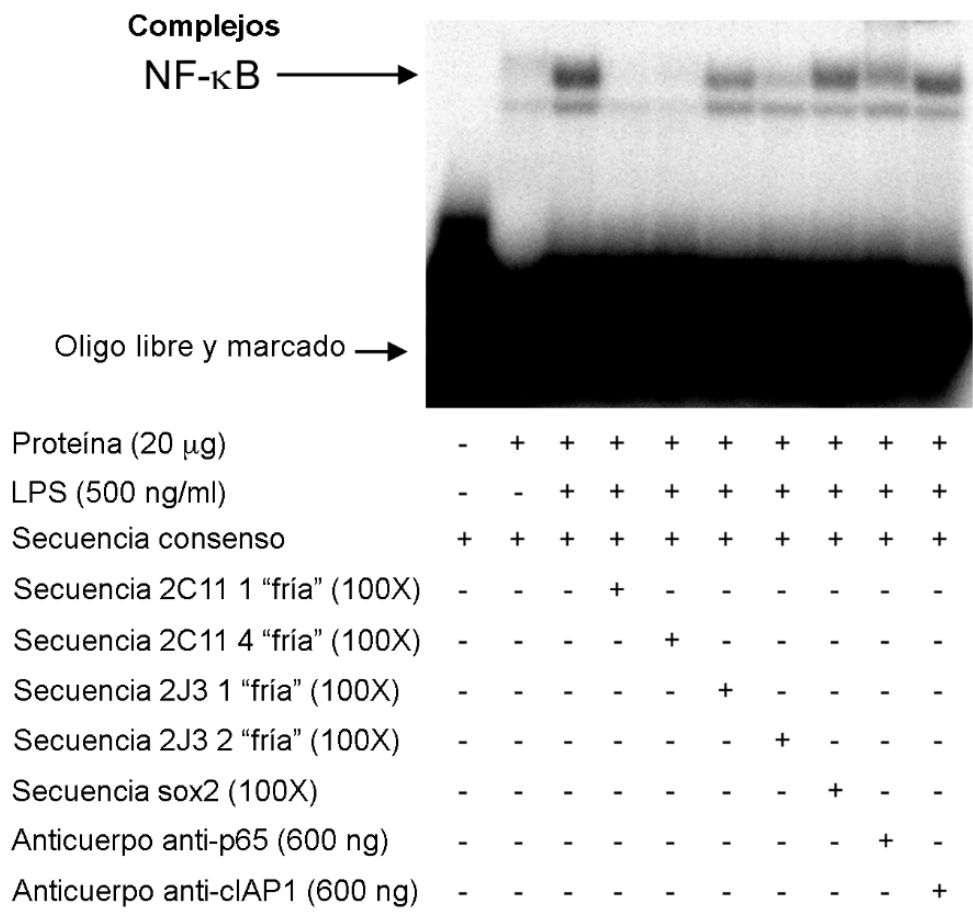


|                         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LPS (500 ng/ml)         | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Secuencia consenso      | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Secuencia 2C11 1        | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| Sec. "fría" 2C11 1 (1X) | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Secuencia 2C11 4        | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| Sec. "fría" 2C11 4 (1X) | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Ac. anti-p65 300 ng     | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - |
| Ac. anti-p65 600 ng     | - | + | - | - | + | - | - | - | + | - |
| Ac. anti-p65 1200 ng    | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + |

**Figura 22. Ensayo de Supershift para las secuencias con mayor afinidad encontradas en el promotor del *Cyp2c11*.** La identidad de NF-κB en los complejos DNA-proteína, se confirmó utilizando 300, 600 ó 1200 ng de anticuerpo anti-p65 de NF-κB. Sólo las secuencias con las mayores afinidades de unión fueron probadas en los ensayos de Supershift (CYP2C11 1 y CYP2C11 4). Además, se realizó un ensayo de competencia utilizando las mismas secuencias en frío (1x).



Adicionalmente, para evaluar si los sitios de unión putativos eran capaces de competir con la secuencia consenso comercial para generar los complejos DNA-proteína, se realizaron ensayos de competencia con los oligonucleótidos de interés, pero sin marca radiactiva (oligonucleótidos “fríos”). Se agregó 100 veces más de oligonucleótidos fríos CYP2C11 1, CYP2C11 4, CYP2J3 1 y CYP2J3 a las mezclas de reacción (Fig. 23; carriles 4-10). El oligonucleótido marcado de la secuencia consenso comercial fue completamente competido por los oligonucleótidos de las secuencias CYP2C11 1 y CYP2C11 4, ya que los complejos DNA-proteína estuvieron principalmente conformados por los oligonucleótidos sin marcar, lo que se observó como la ausencia de las bandas (Fig. 23 carriles 4 y 5). En cambio, las secuencias CYP2J3 1 y CYP2J3 2 compitieron de forma diferencial con la secuencia consenso comercial, dependiendo de la afinidad que presentaron. La secuencia CYP2J3 2 mostró una mayor afinidad por NF- $\kappa$ B; por lo tanto, su oligonucleótido frío compitió más por la unión con los complejos de NF- $\kappa$ B, y consecuentemente, la banda fue menos visible (Fig. 23; carril 7). La secuencia CYP2J3 1 también compitió con la secuencia consenso comercial, pero en menor medida; por lo tanto, la banda conformada por los complejos de NF- $\kappa$ B unidos a la secuencia consenso comercial no desapareció por completo (Fig. 23 carril 6).



**Figura 23. Controles de los ensayos de supershift y de competencia.** Los ensayos de supershift y de competencia fueron realizados para confirmar las interacciones DNA-proteína. El anticuerpo anti-p65 de NF-κB fue utilizado para confirmar la identidad de NF-κB. Como control negativo se utilizó el anticuerpo anti-clAP1. Además, los ensayos de competencia se realizaron utilizando oligonucleótidos fríos, específicos y no específicos. Se utilizó 100X de los oligonucleótidos fríos CYP2C11 1, CYP2C11 4, CYP2J3 1 y CYP2J3 4 para competir con la secuencia consenso comercial marcada. Como control negativo, se utilizó 100X del oligonucleótido inespecífico, con la secuencia de unión de *sox2*.

## 12. DISCUSIÓN

En este estudio, se demostró que, en astrocitos, un estímulo inflamatorio es capaz de disminuir la expresión del mRNA, los niveles de proteína y la actividad enzimática de los CYP epoxigenasas, y que, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B tiene un papel muy importante en esta regulación. Previamente, se ha reportado que la inflamación sistémica tiene la capacidad de regular negativamente a los CYP epoxigenasas en el corazón, el hígado y el riñón (Anwar-mohamed *et al.* 2010). Sin embargo, en el cerebro, no existía evidencia acerca de la regulación de estas enzimas, específicamente de los CYP2J y 2C (enzimas con la mayor actividad de epoxigenasa). Por lo que, en este trabajo se analizó la regulación del CYP2J3 y del CYP2C11 durante un proceso inflamatorio en astrocitos. Para lograr esto, se indujo inflamación en cultivos primarios de astrocitos con LPS, lo que fue capaz de disminuir la expresión del *Cyp2j3* y *Cyp2c11* en más de un 50% (Fig. 12). El *Cyp2c11* fue más susceptible a esta regulación negativa, de una forma dependiente del tiempo de exposición, como se ha observado previamente en otros tejidos durante inflamación sistémica (Anwar-mohamed *et al.* 2010). Por otra parte, el *Cyp2j3* exhibió la disminución inicial en sus niveles de mRNA, pero estos se mantuvieron constantes independientemente del tiempo de exposición. Previamente, se ha demostrado que la inflamación regula de forma diferencial la expresión del *Cyp2j3* en el corazón, en el riñón y en el hígado, siendo éste último el único órgano en donde la expresión es disminuida dependiendo del tiempo de tratamiento (Anwar-mohamed *et al.* 2010).

En estudios previos, ya se había reportado que el *Cyp2c11* es regulado a la baja en el hígado o en cultivos primarios de hepatocitos de rata durante la inflamación (Wright & Morgan 1990), principalmente como resultado de la presencia de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 ó TNF- $\alpha$  (Chen *et al.* 1995b; Chen *et al.* 1995a; Sewer & Morgan 1997). La regulación negativa dependiente de citocinas fue entonces atribuida a la activación de NF- $\kappa$ B y su unión a elementos de respuesta dentro del sitio de inicio de la transcripción del *Cyp2c11* (Iber *et al.* 2000). En este trabajo se buscaron elementos de respuesta para NF- $\kappa$ B dentro de los 4500 pares de bases antes del inicio de la transcripción (ATG) del *Cyp2j3* y del *Cyp2c11* (Fig. 17). Se encontraron cuatro diferentes posibles sitios de unión para cada gen, y se demostró que NF- $\kappa$ B es capaz de unirse específicamente a ellos (Fig. 18 y Fig. 19). Esta es la primera vez que se reporta la presencia de

sitios de unión para NF- $\kappa$ B dentro del promotor del *Cyp2j3*, a pesar de que se han descrito otros mecanismos de regulación transcripcional para este gen, como por ejemplo a través de los receptores nucleares PPAR (Murray 2016; Cizkova *et al.* 2012; Cizkova *et al.* 2016). Sin embargo, la evidencia más convincente de que los CYP epoxigenasas son regulados transcripcionalmente por NF- $\kappa$ B, es el hecho de que, cuando se bloqueó la vía de activación de NF- $\kappa$ B con el inhibidor IMD-0354, se disminuyó el efecto de la inflamación en los niveles del mRNA del *Cyp2j3* y *Cyp2c11* (Fig. 12), reflejándose como un incremento significativo en la cantidad de mRNA de ambos genes con respecto a los niveles obtenidos con el tratamiento con LPS. Cabe destacar que los niveles de expresión del *Cyp2j3* alcanzaron incluso los niveles obtenidos con el control cuando se inhibió la vía de NF- $\kappa$ B (a las 12 h de tratamiento), demostrando que, al menos durante procesos inflamatorios, NF- $\kappa$ B es uno de los principales factores de transcripción involucrados en la regulación del *Cyp2j3*. Por otra parte, incluso cuando se encontró que el promotor del *Cyp2c11* contiene al menos dos elementos de respuesta que unen complejos NF- $\kappa$ B con gran afinidad (Fig. 19), la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B sólo previno parcialmente la disminución en la expresión del *Cyp2c11* por la inflamación, sugiriendo que existen mecanismos de regulación adicionales para este gen durante la inflamación. En trabajos previos, se ha reportado que el *Cyp2c11* puede ser regulado negativamente por agonistas del receptor nuclear PPAR- $\alpha$ , demostrando que PPAR- $\alpha$  participa en la regulación del *Cyp2c11* (Corton *et al.* 1998; Shaban *et al.* 2005; Večeřa *et al.* 2011). Adicionalmente, también ha sido demostrado que el *Cyp2c11* puede ser regulado negativamente por el factor de transcripción AhR y que incluso puede existir un efecto inhibitorio sinérgico con PPAR- $\alpha$  (Shaban *et al.* 2005).

Además, los niveles de proteína del CYP2J3 y del CYP2C11 también disminuyeron en presencia del estímulo pro-inflamatorio LPS, y este efecto fue parcialmente prevenido cuando la vía de NF- $\kappa$ B se bloqueó. Los niveles de proteína del CYP2C11 disminuyeron de una forma dependiente de la dosis (Fig. 14), mientras que los niveles de proteína del CYP2J3 disminuyeron significativamente, pero sólo mostraron tendencia a disminuir dependiente de la dosis (Fig. 13). Estos resultados concuerdan con lo que se encontró en el nivel de expresión transcripcional a las 24 h, dado que el mRNA del *Cyp2j3* disminuyó inicialmente 60%, pero no disminuyó más con el tiempo (Fig. 12). Cuando se agregó concurrentemente el inhibidor IMD-0354 al tratamiento con LPS, los niveles de proteína del CYP2J3 y CYP2C11 se incrementaron significativamente ( $p <$

0.05; Fig. 15), demostrando la participación de NF- $\kappa$ B en esta regulación. El CYP2J3 es aparentemente regulado por la inflamación hasta cierto punto, pero esta regulación es casi completamente dependiente de la actividad de NF- $\kappa$ B, como se puede observar transcripcionalmente y en los niveles de proteína. En cambio, el CYP2C11 es regulado en mayor medida por la inflamación (ya que sus niveles de mRNA y proteína disminuyen más), pero debe haber otros factores de transcripción involucrados además de la vía de NF- $\kappa$ B, ya que, al bloquear la vía, no se restablecen los niveles de mRNA y proteína a los niveles de los controles, como sucedió con el CYP2J3. Otros estudios han reportado el CYP2C11 puede ser regulado negativamente por factores de transcripción que están estrechamente relacionados a la inflamación, como el receptor nuclear PPAR- $\alpha$  (Shaban *et al.* 2005; Corton *et al.* 1998), o el factor de transcripción AhR (Shaban *et al.* 2005).

También se encontró que la producción total de EETs disminuyó significativamente por la inflamación inducida por el LPS, y alcanzó los niveles del control cuando la vía de NF- $\kappa$ B se bloqueó (Fig. 16). Esto apoya las evidencias que sugieren que las subfamilias CYP2J y CYP2C son las que contribuyen mayoritariamente a la producción de EETs (Capdevila & Falck 2000). Por lo tanto, la disminución en los niveles del CYP2J3 y CYP2C11 puede verse reflejado en gran medida en la cantidad total de EETs. Estos resultados confirman que la inflamación puede disminuir la actividad de los CYP epoxigenasas vía la activación de NF- $\kappa$ B en los astrocitos. Los cambios significativos que se encontraron en los niveles de estos metabolitos son una evidencia sólida de la respuesta biológica que se dio durante la inflamación.

Actualmente se sabe que los CYP son regulados durante la inflamación (Zordoky & El-Kadi 2009; Morgan 2001; Aitken *et al.* 2006). Sin embargo, la importancia que esta regulación puede tener en procesos fisiológicos que involucran el metabolismo endógeno mediado por los CYP ha sido en gran medida pasado por alto. Los CYP epoxigenasas y sus productos metabólicos, los EETs, han sido propuestos como importantes blancos terapéuticos anti-inflamatorios (Liu *et al.* 2010; Oni-Orisan *et al.* 2013; Schmelzer *et al.* 2005). Al mismo tiempo, ha sido demostrado que la inflamación sistémica puede regular los niveles de los CYP epoxigenasas y la producción de EETs (Anwar-mohamed *et al.* 2010). Por lo tanto, se ha propuesto que existe un ciclo entre la inflamación y la expresión de los CYP epoxigenasas/producción de EETs, que posiblemente participa en la

resolución de la inflamación, y que, si de alguna manera falla, puede promover el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos (Shahabi *et al.* 2014). Por lo tanto, es de gran importancia el estudio de la regulación de los CYP epoxigenasas en el SNC, en donde los procesos inflamatorios crónicos han sido relacionados con la etiología de diversas enfermedades neurodegenerativas (Pimplikar 2014; Qin *et al.* 2007; Hong *et al.* 2016).

### 13. CONCLUSIONES

La inflamación inducida por el LPS en astrocitos es capaz de disminuir los niveles de mRNA y proteína del CYP2J3 y CYP2C11, así como la cantidad total de EETs (reflejo de la actividad enzimática). Este efecto puede deberse, en parte, a la producción de citocinas pro-inflamatorias y la subsecuente activación de la vía del NF- $\kappa$ B, dado que, cuando se inhibió esta vía, se previnieron los efectos observados. Adicionalmente, se encontró que el NF- $\kappa$ B es capaz de unirse específicamente y con gran afinidad a, por lo menos, dos elementos de respuesta presentes en el promotor de los genes *Cyp2j3* y *Cyp2c11*, indicando así que este podría ser el mecanismo a través del cual NF- $\kappa$ B lleva a cabo la regulación de la transcripción de estos genes.

### 14. PERSPECTIVAS

- En este trabajo se encontró que NF- $\kappa$ B es uno de los factores de transcripción involucrados en la regulación de los CYP epoxigenasas durante un proceso inflamatorio en astrocitos, principalmente del CYP2J3. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que deben de existir otros factores involucrados en esta regulación, ya que al inhibir la vía de NF- $\kappa$ B no se recuperaron por completo los niveles de EETs, mRNA y proteína. Una vía que podría estar involucrada en la regulación de los CYP epoxigenasas durante procesos inflamatorios en células del SNC podría ser la de los receptores nucleares PPAR, principalmente por la relevancia que éstos tienen en la homeostasis de lípidos en las células y dado que los EETs son mediadores lipídicos, ésta vía es una buena opción para explorar.

## 15. REFERENCIAS

- Abdel-Razzak, Z., Loyer, P., Fautrel, A., Gautier, J. C., Corcos, L., Turlin, B., Beaune, P. and Guillouzo, A. (1993) Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* **44**, 707-715.
- Aitken, A. E. and Morgan, E. T. (2007) Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **35**, 1687-1693.
- Aitken, A. E., Richardson, T. A. and Morgan, E. T. (2006) Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**, 123-149.
- Anchisi, L., Dessì, S., Pani, A. and Mandas, A. (2012) Cholesterol homeostasis: a key to prevent or slow down neurodegeneration. *Front Physiol* **3**, 486.
- Anwar-mohamed, A., Zordoky, B. N., Aboutabl, M. E. and El-Kadi, A. O. (2010) Alteration of cardiac cytochrome P450-mediated arachidonic acid metabolism in response to lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation. *Pharmacol Res* **61**, 410-418.
- Baldwin, A. S. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**, 649-683.
- Bazinet, R. P. and Layé, S. (2014) Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* **15**, 771-785.
- Bell, J. C. and Strobel, H. W. (2012) Regulation of cytochrome P450 4F11 by nuclear transcription factor- $\kappa$ B. *Drug Metab Dispos* **40**, 205-211.
- Ben Haim, L. and Rowitch, D. H. (2017) Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* **18**, 31-41.
- Blancas-Flores, G., Alarcón-Aguilar, F. J., García-Macedo, R. et al. (2012) Glycine suppresses TNF- $\alpha$ -induced activation of NF- $\kappa$ B in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol* **689**, 270-277.
- Botting, R. M. (2010) Vane's discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. *Pharmacol Rep* **62**, 518-525.
- Boussicault, L., Alves, S., Lamazière, A. et al. (2016) CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain* **139**, 953-970.
- Bromek, E., Haduch, A. and Daniel, W. A. (2010) The ability of cytochrome P450 2D isoforms to synthesize dopamine in the brain: An in vitro study. *Eur J Pharmacol* **626**, 171-178.
- Capdevila, J. H. and Falck, J. R. (2000) Biochemical and molecular characteristics of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **62**, 271-292.
- Carver, K. A., Lourim, D., Tryba, A. K. and Harder, D. R. (2014) Rhythmic expression of cytochrome P450 epoxygenases CYP4x1 and CYP2c11 in the rat brain and vasculature. *Am J Physiol Cell Physiol* **307**, C989-998.
- Chen, J., Nikolova-Karakashian, M., Merrill, A. H. and Morgan, E. T. (1995a) Regulation of cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) gene expression by interleukin-1, sphingomyelin hydrolysis, and ceramides in rat hepatocytes. *J Biol Chem* **270**, 25233-25238.
- Chen, J. Q., Ström, A., Gustafsson, J. A. and Morgan, E. T. (1995b) Suppression of the constitutive expression of cytochrome P-450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: comparison with induction of acute-phase genes and demonstration that

- CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. *Mol Pharmacol* **47**, 940-947.
- Chinta, S. J., Pai, H. V., Upadhyaya, S. C., Boyd, M. R. and Ravindranath, V. (2002) Constitutive expression and localization of the major drug metabolizing enzyme, cytochrome P4502D in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* **103**, 49-61.
- Cizkova, K., Konieczna, A., Erdosova, B., Lichnovska, R. and Ehrmann, J. (2012) Peroxisome proliferator-activated receptors in regulation of cytochromes P450: new way to overcome multidrug resistance? *J Biomed Biotechnol* **2012**, 656428.
- Cizkova, K., Steigerova, J., Gursky, J. and Ehrmann, J. (2016) Stimulating effect of normal-dosing of fibrates on cell proliferation: word of warning. *Lipids Health Dis* **15**, 164.
- Cooper, D. Y., Estabrook, R. W. and Rosenthal, O. (1963) The stoichiometry of C21 hydroxylation of steroids by adrenocortical microsomes. *J Biol Chem* **238**, 1320-1323.
- Cooper, D. Y., Levin, S., Narasimulu, S. and Rosenthal, O. (1965) Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* **147**, 400-402.
- Corton, J. C., Fan, L. Q., Brown, S., Anderson, S. P., Bocos, C., Cattley, R. C., Mode, A. and Gustafsson, J. A. (1998) Down-regulation of cytochrome P450 2C family members and positive acute-phase response gene expression by peroxisome proliferator chemicals. *Mol Pharmacol* **54**, 463-473.
- Deng, Y., Theken, K. N. and Lee, C. R. (2010) Cytochrome P450 epoxygenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 331-341.
- Dietschy, J. M. and Turley, S. D. (2004) Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* **45**, 1375-1397.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. and Roeder, R. G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**, 1475-1489.
- Donato, M. T., Jiménez, N., Castell, J. V. and Gómez-Lechón, M. J. (2004) Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **32**, 699-706.
- Dutheil, F., Beaune, P. and Lorient, M. A. (2008) Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie* **90**, 426-436.
- Dutheil, F., Dauchy, S., Diry, M. et al. (2009) Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function. *Drug Metab Dispos* **37**, 1528-1538.
- Enayetallah, A. E., French, R. A., Thibodeau, M. S. and Grant, D. F. (2004) Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem* **52**, 447-454.
- Estabrook, R. W., Cooper, D. Y. and Rosenthal, O. (1963) The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem Z* **338**, 741-755.
- Farin, F. M. and Omiecinski, C. J. (1993) Regiospecific expression of cytochrome P-450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue. *J Toxicol Environ Health* **40**, 317-335.



- Ferguson, C. S. and Tyndale, R. F. (2011) Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends Pharmacol Sci* **32**, 708-714.
- Gu, X., Ke, S., Liu, D., Sheng, T., Thomas, P. E., Rabson, A. B., Gallo, M. A., Xie, W. and Tian, Y. (2006) Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents. *J Biol Chem* **281**, 17882-17889.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2012) NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* **26**, 203-234.
- Hong, H., Kim, B. S. and Im, H. I. (2016) Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. *Int Neurorol J* **20**, S2-7.
- Howard, L. A., Miksys, S., Hoffmann, E., Mash, D. and Tyndale, R. F. (2003) Brain CYP2E1 is induced by nicotine and ethanol in rat and is higher in smokers and alcoholics. *Br J Pharmacol* **138**, 1376-1386.
- Iber, H., Chen, Q., Cheng, P. Y. and Morgan, E. T. (2000) Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukin-1 mediated by NF-kappaB binding at the transcription start site. *Arch Biochem Biophys* **377**, 187-194.
- Iliff, J. J., Jia, J., Nelson, J., Goyagi, T., Klaus, J. and Alkayed, N. J. (2010) Epoxyeicosanoid signaling in CNS function and disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **91**, 68-84.
- Inceoglu, B., Jinks, S. L., Ulu, A. et al. (2008) Soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosatrienoic acids modulate two distinct analgesic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18901-18906.
- Kanduri, M., Tobin, G., Aleskog, A., Nilsson, K. and Rosenquist, R. (2011) The novel NF-κB inhibitor IMD-0354 induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J* **1**, e12.
- Ke, S., Rabson, A. B., Germino, J. F., Gallo, M. A. and Tian, Y. (2001) Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **276**, 39638-39644.
- Kelicen, P. and Tindberg, N. (2004) Lipopolysaccharide induces CYP2E1 in astrocytes through MAP kinase kinase-3 and C/EBPbeta and -delta. *J Biol Chem* **279**, 15734-15742.
- Klingenberg, M. (2003) The dragging emergence of the P450 cytochrome. *Arch Biochem Biophys* **412**, 2.
- Koerner, I. P., Zhang, W., Cheng, J., Parker, S., Hurn, P. D. and Alkayed, N. J. (2008) Soluble epoxide hydrolase: regulation by estrogen and role in the inflammatory response to cerebral ischemia. *Front Biosci* **13**, 2833-2841.
- Komori, M. (1993) A novel P450 expressed at the high level in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **196**, 721-728.
- Lakkappa, N., Krishnamurthy, P. T., Hammock, B. D., Velmurugan, D. and Bharath, M. M. (2016) Possible role of Epoxyeicosatrienoic acid in prevention of oxidative stress mediated neuroinflammation in Parkinson disorders. *Med Hypotheses* **93**, 161-165.
- Lakkappa, N., Krishnamurthy, P. T., M D, P., Hammock, B. D. and Hwang, S. H. (2019) Soluble epoxide hydrolase inhibitor, APAU, protects dopaminergic neurons against rotenone induced neurotoxicity: Implications for Parkinson's disease. *Neurotoxicology* **70**, 135-145.
- Lakkappa, N., Krishnamurthy, P. T., Yamjala, K., Hwang, S. H., Hammock, B. D. and Babu, B. (2018) Evaluation of antiparkinson activity of PTUPB by measuring dopamine and its metabolites

- in *Drosophila melanogaster*: LC-MS/MS method development. *J Pharm Biomed Anal* **149**, 457-464.
- Lange, S. C., Bak, L. K., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A. and Norenberg, M. D. (2012) Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem Res* **37**, 2569-2588.
- Li, R., Xu, X., Chen, C., Yu, X., Edin, M. L., Degraff, L. M., Lee, C. R., Zeldin, D. C. and Wang, D. W. (2012) Cytochrome P450 2J2 is protective against global cerebral ischemia in transgenic mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **99**, 68-78.
- Li, Y., Wu, J., Yu, X., Na, S., Li, K., Yang, Z., Xie, X., Yang, J. and Yue, J. (2018) The Protective Role of Brain CYP2J in Parkinson's Disease Models. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 2917981.
- Liu, J. Y., Yang, J., Inceoglu, B., Qiu, H., Ulu, A., Hwang, S. H., Chiamvimonvat, N. and Hammock, B. D. (2010) Inhibition of soluble epoxide hydrolase enhances the anti-inflammatory effects of aspirin and 5-lipoxygenase activation protein inhibitor in a murine model. *Biochem Pharmacol* **79**, 880-887.
- Liu, M. and Alkayed, N. J. (2005) Hypoxic preconditioning and tolerance via hypoxia inducible factor (HIF) 1 $\alpha$ -linked induction of P450 2C11 epoxygenase in astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 939-948.
- Lund, E. G., Xie, C., Kotti, T., Turley, S. D., Dietschy, J. M. and Russell, D. W. (2003) Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J Biol Chem* **278**, 22980-22988.
- López-Bojórquez, L. N., Arechavaleta-Velasco, F., Vadillo-Ortega, F., Montes-Sánchez, D., Ventura-Gallegos, J. L. and Zentella-Dehesa, A. (2004) NF- $\kappa$ B translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Inflamm Res* **53**, 567-575.
- Martínez-Ramírez, I., Del-Castillo-Falconi, V., Mitre-Aguilar, I. B. et al. (2017) SOX2 as a New Regulator of HPV16 Transcription. *Viruses* **9**.
- McFadyen, C., Melvin, W. T. and Murray, G. I. (1998) Regional distribution of individual forms of cytochrome P450 mRNA in normal adult human brain. *Biochem Pharmacol* **55**, 825-830.
- Miksys, S., Rao, Y., Hoffmann, E., Mash, D. C. and Tyndale, R. F. (2002) Regional and cellular expression of CYP2D6 in human brain: higher levels in alcoholics. *J Neurochem* **82**, 1376-1387.
- Miksys, S. and Tyndale, R. F. (2013) Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *J Psychiatry Neurosci* **38**, 152-163.
- Minogue, A. M., Barrett, J. P. and Lynch, M. A. (2012) LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1 $\beta$  in a JAK2-dependent manner. *J Neuroinflammation* **9**, 126.
- Moran, J. and Patel, A. J. (1989) Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res* **486**, 15-25.
- Morgan, E. T. (2001) Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos* **29**, 207-212.
- Murray, M. (2016) CYP2J2 - regulation, function and polymorphism. *Drug Metab Rev* **48**, 351-368.
- Napetschnig, J. and Wu, H. (2013) Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling. *Annu Rev Biophys* **42**, 443-468.

- Navarro-Mabarak, C., Camacho-Carranza, R. and Espinosa-Aguirre, J. J. (2018) Cytochrome P450 in the central nervous system as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Drug Metab Rev* **50**, 95-108.
- Navarro-Mabarak, C., Mitre-Aguilar, I. B., Camacho-Carranza, R., Arias, C., Zentella-Dehesa, A. and Espinosa-Aguirre, J. J. (2019) Role of NF- $\kappa$ B in cytochrome P450 epoxygenases down-regulation during an inflammatory process in astrocytes. *Neurochem Int* **129**, 104499.
- Ng, V. Y., Huang, Y., Reddy, L. M., Falck, J. R., Lin, E. T. and Kroetz, D. L. (2007) Cytochrome P450 eicosanoids are activators of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Drug Metab Dispos* **35**, 1126-1134.
- Nicholson, T. E. and Renton, K. W. (1999) Modulation of cytochrome P450 by inflammation in astrocytes. *Brain Res* **827**, 12-18.
- Nicholson, T. E. and Renton, K. W. (2001) Role of cytokines in the lipopolysaccharide-evoked depression of cytochrome P450 in the brain and liver. *Biochem Pharmacol* **62**, 1709-1717.
- Nicholson, T. E. and Renton, K. W. (2002) The role of cytokines in the depression of CYP1A activity using cultured astrocytes as an in vitro model of inflammation in the central nervous system. *Drug Metab Dispos* **30**, 42-46.
- Nieweg, K., Schaller, H. and Pfrieger, F. W. (2009) Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem* **109**, 125-134.
- Node, K., Huo, Y., Ruan, X., Yang, B., Spiecker, M., Ley, K., Zeldin, D. C. and Liao, J. K. (1999) Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* **285**, 1276-1279.
- Oeckinghaus, A. and Ghosh, S. (2009) The NF- $\kappa$ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a000034.
- Ogawa, H., Azuma, M., Muto, S. et al. (2011) I $\kappa$ B kinase  $\beta$  inhibitor IMD-0354 suppresses airway remodelling in a Dermatophagoides pteronyssinus-sensitized mouse model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* **41**, 104-115.
- Omura, T. (2011) Recollection of the early years of the research on cytochrome P450. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **87**, 617-640.
- Omura, T. and Sato, R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* **237**, 1375-1376.
- Onai, Y., Suzuki, J., Kakuta, T., Maejima, Y., Haraguchi, G., Fukasawa, H., Muto, S., Itai, A. and Isobe, M. (2004) Inhibition of I $\kappa$ B phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **63**, 51-59.
- Oni-Orisan, A., Deng, Y., Schuck, R. N. et al. (2013) Dual modulation of cyclooxygenase and CYP epoxygenase metabolism and acute vascular inflammation in mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **104-105**, 67-73.
- Pfister, S. L., Gauthier, K. M. and Campbell, W. B. (2010) Vascular pharmacology of epoxyeicosatrienoic acids. *Adv Pharmacol* **60**, 27-59.
- Phillis, J. W., Horrocks, L. A. and Farooqui, A. A. (2006) Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev* **52**, 201-243.
- Pikuleva, I. A. (2006) Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol Ther* **112**, 761-773.
- Pimplikar, S. W. (2014) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to a therapeutic target. *J Clin Immunol* **34 Suppl 1**, S64-69.

- Qin, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G. R., Hong, J. S., Knapp, D. J. and Crews, F. T. (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* **55**, 453-462.
- Qu, W., Bradbury, J. A., Tsao, C. C. et al. (2001) Cytochrome P450 CYP2J9, a new mouse arachidonic acid omega-1 hydroxylase predominantly expressed in brain. *J Biol Chem* **276**, 25467-25479.
- Ramirez, D. M., Andersson, S. and Russell, D. W. (2008) Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J Comp Neurol* **507**, 1676-1693.
- Ruparel, S., Henry, M. A., Akopian, A., Patil, M., Zeldin, D. C., Roman, L. and Hargreaves, K. M. (2012) Plasticity of cytochrome P450 isozyme expression in rat trigeminal ganglia neurons during inflammation. *Pain* **153**, 2031-2039.
- Sarkar, P., Zaja, I., Bienengraeber, M., Rarick, K. R., Terashvili, M., Canfield, S., Falck, J. R. and Harder, D. R. (2014) Epoxyeicosatrienoic acids pretreatment improves amyloid  $\beta$ -induced mitochondrial dysfunction in cultured rat hippocampal astrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **306**, H475-484.
- Sasame, H. A., Ames, M. M. and Nelson, S. D. (1977) Cytochrome P-450 and NADPH cytochrome c reductase in rat brain: formation of catechols and reactive catechol metabolites. *Biochem Biophys Res Commun* **78**, 919-926.
- Schmelzer, K. R., Inceoglu, B., Kubala, L., Kim, I. H., Jinks, S. L., Eiserich, J. P. and Hammock, B. D. (2006) Enhancement of antinociception by coadministration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13646-13651.
- Schmelzer, K. R., Kubala, L., Newman, J. W., Kim, I. H., Eiserich, J. P. and Hammock, B. D. (2005) Soluble epoxide hydrolase is a therapeutic target for acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9772-9777.
- Schütze, S., Wiegmann, K., Machleidt, T. and Krönke, M. (1995) TNF-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology* **193**, 193-203.
- Sewer, M. B. and Morgan, E. T. (1997) Nitric oxide-independent suppression of P450 2C11 expression by interleukin-1beta and endotoxin in primary rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **54**, 729-737.
- Shaban, Z., Soliman, M., El-Shazly, S. et al. (2005) AhR and PPARalpha: antagonistic effects on CYP2B and CYP3A, and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica* **35**, 51-68.
- Shahabi, P., Siest, G. and Visvikis-siest, S. (2014) Influence of inflammation on cardiovascular protective effects of cytochrome P450 epoxygenase-derived epoxyeicosatrienoic acids. *Drug Metab Rev* **46**, 33-56.
- Siegle, I., Fritz, P., Eckhardt, K., Zanger, U. M. and Eichelbaum, M. (2001) Cellular localization and regional distribution of CYP2D6 mRNA and protein expression in human brain. *Pharmacogenetics* **11**, 237-245.
- Sofroniew, M. V. and Vinters, H. V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**, 7-35.
- Stables, M. J. and Gilroy, D. W. (2011) Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* **50**, 35-51.

- Sugita, A., Ogawa, H., Azuma, M. et al. (2009) Antiallergic and anti-inflammatory effects of a novel I kappaB kinase beta inhibitor, IMD-0354, in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* **148**, 186-198.
- Theken, K. N., Deng, Y., Kannon, M. A., Miller, T. M., Poloyac, S. M. and Lee, C. R. (2011) Activation of the acute inflammatory response alters cytochrome P450 expression and eicosanoid metabolism. *Drug Metab Dispos* **39**, 22-29.
- Tindberg, N., Baldwin, H. A., Cross, A. J. and Ingelman-Sundberg, M. (1996) Induction of cytochrome P450 2E1 expression in rat and gerbil astrocytes by inflammatory factors and ischemic injury. *Mol Pharmacol* **50**, 1065-1072.
- Upadhyay, S. C., Tirumalai, P. S., Boyd, M. R., Mori, T. and Ravindranath, V. (2000) Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Arch Biochem Biophys* **373**, 23-34.
- Vance, J. E. (2012) Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech* **5**, 746-755.
- Večeřa, R., Zachařová, A., Orolin, J., Strojil, J., Skottová, N. and Anzenbacher, P. (2011) Fenofibrate-induced decrease of expression of CYP2C11 and CYP2C6 in rat. *Biopharm Drug Dispos* **32**, 482-487.
- Wang, L., Luo, G., Zhang, L. F. and Geng, H. X. (2018) Neuroprotective effects of epoxyeicosatrienoic acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **138**, 9-14.
- Watts, P. M., Riedl, A. G., Douek, D. C., Edwards, R. J., Boobis, A. R., Jenner, P. and Marsden, C. D. (1998) Co-localization of P450 enzymes in the rat substantia nigra with tyrosine hydroxylase. *Neuroscience* **86**, 511-519.
- Wright, K. and Morgan, E. T. (1990) Transcriptional and post-transcriptional suppression of P450IIC11 and P450IIC12 by inflammation. *FEBS Lett* **271**, 59-61.
- Wu, H. F., Yen, H. J., Huang, C. C., Lee, Y. C., Wu, S. Z., Lee, T. S. and Lin, H. C. (2015) Soluble epoxide hydrolase inhibitor enhances synaptic neurotransmission and plasticity in mouse prefrontal cortex. *J Biomed Sci* **22**, 94.
- Wu, J. Y., Yue, J. and Feng, Y. Q. (2011) Determination of brain cytochrome P450 2E1 activity in rat with the probe of chlorzoxazone by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **879**, 260-266.
- Wu, S., Chen, W., Murphy, E. et al. (1997) Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes. *J Biol Chem* **272**, 12551-12559.
- Zeldin, D. C. (2001) Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* **276**, 36059-36062.
- Zhang, W., Koerner, I. P., Noppens, R. et al. (2007) Soluble epoxide hydrolase: a novel therapeutic target in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 1931-1940.
- Zordoky, B. N. and El-Kadi, A. O. (2009) Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes. *Curr Drug Metab* **10**, 164-178.

## 16. ANEXOS

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

Navarro-Mabarak, C., Mitre-Aguilar, I. B., Camacho-Carranza, R., Arias, C., Zentella-Dehesa, A. and Espinosa-Aguirre, J. J. (2019) Role of NF- $\kappa$ B in cytochrome P450 epoxygenases down-regulation during an inflammatory process in astrocytes. *Neurochem Int* **129**, 104499.



## Cytochrome P450 in the central nervous system as a therapeutic target in neurodegenerative diseases

Cynthia Navarro-Mabarak, Rafael Camacho-Carranza & Jesús Javier Espinosa-Aguirre

To cite this article: Cynthia Navarro-Mabarak, Rafael Camacho-Carranza & Jesús Javier Espinosa-Aguirre (2018): Cytochrome P450 in the central nervous system as a therapeutic target in neurodegenerative diseases, Drug Metabolism Reviews, DOI: [10.1080/03602532.2018.1439502](https://doi.org/10.1080/03602532.2018.1439502)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03602532.2018.1439502>



Published online: 16 Feb 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

## Cytochrome P450 in the central nervous system as a therapeutic target in neurodegenerative diseases

Cynthia Navarro-Mabarak, Rafael Camacho-Carranza and Jesús Javier Espinosa-Aguirre

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

### ABSTRACT

Cytochromes P450 (CYPs) constitute a family of enzymes that can be found in the endoplasmic reticulum (ER), mitochondria or the cell surface of the cells. CYPs are characterized by carrying out the oxidation of organic compounds and they are mainly recognized as mediators of the biotransformation of xenobiotics to polar hydrophilic metabolites that can be eliminated from the organism. However, these enzymes play a key role in many other physiological processes, being involved in diverse indispensable metabolic pathways since they metabolize many endogenous substrates. Various CYP isoforms are expressed in the brain, and it is believed that this could be in part due to the particular function of brain CYPs. In the brain, CYPs are involved in the cholesterol turnover, the biosynthesis of dopamine, serotonin, morphine, hormones, and protective lipid mediators (epoxyeicosatrienoic acids), in addition to their already recognized role in xenobiotics detoxification and psychotropic drug metabolism. Increasing evidence suggests that this group of enzymes is fundamental for the normal functioning and maintenance of brain homeostasis. This review is focused on highlighting the importance of CYP-mediated endogenous metabolism in the central nervous system (CNS) and its relationship with recent findings regarding CYP involvement in neurodegenerative diseases. Some therapeutic approaches focused on CYP regulation are also discussed.

### ARTICLE HISTORY

Received 6 February 2018  
Accepted 7 February 2018

### KEYWORDS

Cytochrome P450;  
arachidonic acid;  
cholesterol; 24-  
hydroxycholesterol;  
Alzheimer's disease;  
Parkinson's disease

### Cytochrome P450 in the brain

In 1977, Sasame and coworkers described the levels of cytochrome P450 activity in rat brain for the first time. They found that the CYP content detected was approximately 3% of that found in the liver, and that the corresponding activity was 30 times lower (Sasame et al. 1977). Since then, various reports have described CYP expression patterns and activity within the brain. CYP expression in the brain is heterogeneous, and some CYPs are expressed in a greater proportion in the brain than in the liver. For example, CYP46A1 (cholesterol elimination) and CYP2D6 (dopamine and serotonin synthesis) are mainly expressed in the brain, possibly, due to its physiological importance (Komori 1993; Lund et al. 2003; Pikuleva 2006; Bromek et al. 2010). CYPs are found in both neurons and glial cells, both in the cell bodies and throughout the cell processes. Some isoforms, such as CYP1A1, 2B, 2E1, and 3A, are predominantly found in neurons, whereas others, like CYP2D6, are found in both neurons and glial cells (Dutheil et al. 2009; Miksys and Tyndale 2013). Brain CYPs are

inducible by specific stimuli, and, under certain induction conditions, CYP levels in specific neurons may be comparable to, or even higher than, the levels present in hepatocytes (Ferguson and Tyndale 2011). Some of the endogenous substrates of CYPs in the brain include fatty acids, cholesterol, hormones, and precursors of neurotransmitters.

### Endogenous substrates of cytochrome P450 in the brain

#### Arachidonic acid

Arachidonic acid (AA) is a 20-carbon polyunsaturated fatty acid (PUFA) derived from linoleic acid (LA). AA is the most abundant omega-6 PUFA in the brain, and is predominantly esterified to choline glycerophospholipids in the plasma membrane of cells (10,000:1 esterified/unesterified) (Bazinet and Layé 2014). AA is released by activation of phospholipase A2 (PLA2), which hydrolyzes the ester bond of phospholipids at the sn-2 position. Then, AA can be metabolized by



cyclooxygenases (COX), lipoxygenases (LOX), or CYP epoxygenases. COX enzymes catalyze the conversion of AA to prostaglandins (PGs) and thromboxanes; LOX enzymes generate leukotrienes (LTs) and lipoxins (LXs); and CYPs can produce epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) through epoxygenase and hydroxylase enzymes, respectively. CYP epoxygenases add an oxygen atom to one of the double bonds of AA, resulting in the formation of four EET regioisomers that are named according to the number of the oxidized double bond: 5,6-; 8,9-; 11,12-; and 14,15-EET (Table 1; Figure 1). The EETs can be further hydrolyzed by soluble epoxide hydrolase (sEH) into less active metabolites, the dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs) (Stables and Gilroy 2011). The CYP2C and 2J subfamilies are the CYP enzymes with the greatest epoxygenase activity, although other CYP isoforms, including CYP1A, 2B, and 2E, also mediate reactions of epoxidation (Shahabi et al. 2014). CYP hydroxylases add a hydroxyl group to AA, resulting in the formation of 5-, 8-, 9-, 11-, 12-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, and 20-HETE. The CYP4A and 4F subfamilies are the main CYP enzymes with hydroxylase activity (Figure 1). COX, LOX, and CYP enzymes are involved in the initiation, maintenance, and modulation of inflammatory processes, as well as in synaptic activity, apoptosis, and aging (Phillis et al. 2006). PGs, LTs, and 20-HETE amplify acute inflammation, whereas LX and EETs have anti-inflammatory effects (Node et al. 1999). CYP epoxygenases and hydroxylases have been found in diverse brain regions (Table 1).

### **Cholesterol**

Cholesterol is a steroid alcohol derived from acetyl coenzyme A. It is an essential structural component of the plasma membrane of cells and is considered the main molecule responsible for membrane fluidity. In the CNS, cholesterol is required for brain growth, myelination of axons, and the formation of lipid rafts. It is also required for the synthesis of vitamin D, bile acids, and steroid hormones (Anchisi et al. 2012). Approximately 25% of the cholesterol in the body is located in the brain. Brain cholesterol metabolism is different from that in the periphery, mainly because it is segregated by the presence of the blood-brain barrier (BBB). Almost all CNS cholesterol is synthesized *de novo* by glial cells, particularly by astrocytes, since cholesterol cannot freely diffuse across the BBB (Nieweg et al. 2009). The main pathway for turnover of brain cholesterol is achieved through its hydroxylation by CYP46A1 with the concomitant production of 24(R) and 24(S)-hydroxycholesterol (Figure 2) (Lund et al. 2003).

Hydroxylation of cholesterol increases its solubility and decreases its passive permeability coefficient with a net effect of increase in the passive diffusion of the molecule across the BBB (Dietschy and Turley 2004; Anchisi et al. 2012). Mouse CYP46A1 is expressed in multiple types of neurons of diverse brain regions (Table 1). Disturbances in cholesterol homeostasis have been implicated in the etiology of several neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease (Vance 2012; Boussicault et al. 2016).

CYP enzymes have a crucial role in cholesterol homeostasis, both in the synthesis and in the elimination process; CYP51 participates in cholesterol biosynthesis through a sterol 14 $\alpha$ -demethylation in three consecutive oxidation steps. CYP51 is ubiquitously expressed, even in brain microsomes (Aoyama et al. 1996). The rate-limiting step in steroid hormone synthesis in the brain is the conversion of cholesterol to pregnenolone by CYP11A1 (also referred as P450 side-chain cleavage enzyme). Cholesterol is the only established physiological substrate of CYP11A1, which performs three reactions to yield pregnenolone (Pikuleva 2006). The following steps in steroid hormone biosynthesis involve the sequential actions of steroidogenic enzymes, including those of some other CYPs such as CYP17A1 (androstenedione formation) and CYP19A1 (formation of estrogens) (Figure 2). Androstenedione is reduced to testosterone by the 17-ketoreductase (17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase), or is aromatized to estrone by CYP19A1. Testosterone or estrone can be subsequently converted to estradiol (17 $\beta$ -estradiol) by testosterone reduction (17-ketoreductase) or estrone aromatization (CYP19A1) (Figure 2). Steroid hormones, as well as the CYP enzymes involved in their synthesis and clearance, have an important role in neuroprotection [Reviewed in Liu et al. (2004)]. Estradiol has been characterized as neuroprotective against some neurodegenerative disorders (Brann et al. 2007). Additionally, it has recently been described that brain-derived estradiol takes neuroprotective and anti-inflammatory actions after global cerebral ischemia (Zhang et al. 2014).

### **Monoaminergic neurotransmitters**

Catecholamines are a group of compounds that are each structurally made up of a catechol group and an amine. Catecholamines act as hormones in the periphery, and as neurotransmitters in the CNS. The predominant catecholamines in the brain are dopamine, norepinephrine, and epinephrine. Catecholamines are derived mainly from L-tyrosine. Tyrosine hydroxylase

mediates the oxidation of L-tyrosine to L-DOPA, which is the rate-limiting step in catecholamine biosynthesis. DOPA decarboxylase catalyzes the removal of the carboxyl group from DOPA to form dopamine. Dopamine is oxidized by dopamine  $\beta$ -hydroxylase to form norepinephrine. Finally, a methyl group is transferred to norepinephrine by phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) to form epinephrine. Hiroi and coworkers described an alternative dopamine biosynthetic pathway mediated by human CYP2D6 that involves the hydroxylation of tyramine (Figure 3) (Hiroi et al. 1998). CYP2D-mediated synthesis of dopamine from tyramine in the brain has been shown *in vitro* and *in vivo* (Bromek et al. 2010, 2011). In rats, only three of the six isoforms of CYP2D enzymes are capable of forming dopamine from tyramine (CYP2D2, 2D4, and 2D18), and these are less efficient than human CYP2D6. Therefore, it has been assumed that CYP2D-mediated dopamine biosynthesis is greater in humans (Bromek et al. 2010). Human CYP2D6 is expressed in neuronal and glial cells of diverse brain regions (Table 1).

5-Hydroxytryptamine (5-HT), also known as serotonin, is a monoaminergic neurotransmitter derived from the amino acid L-tryptophan, which is obtained principally from the diet and is transported from blood into the brain by neutral amino acid carriers. Tryptophan is converted to 5-hydroxytryptophan (5-HTP) by tryptophan hydroxylase. 5-HTP is then converted to 5-HT by the aromatic amino acid decarboxylase. 5-HT is released from neurons with cell bodies in the medium-sized raphe nuclei in the midbrain, and is involved in several physiological and behavioral processes that include food intake, circadian rhythms, and personality. 5-HT has been involved in the pathophysiology of several psychiatric disorders (depression, anxiety, schizophrenia, and obsessive-compulsive disorder) and in the mechanism of action of some psychotropic drugs (serotonin reuptake inhibitors). Yu and coworkers described an alternative CYP2D6-mediated 5-HT biosynthetic pathway that involves the O-demethylation of 5-methoxytryptamine (5-MT) to 5-HT (Figure 3) (Yu, Idle, Byrd, et al. 2003; Yu, Idle, Herraiz, et al. 2003). 5-MT is derived mainly from the deacetylation of melatonin (MEL), the O-methylation of 5-HT, or the decarboxylation of 5-methoxytryptophan (Hardeland 2010). 5-MT, 5-HT, and MEL share an indole nucleus derived exclusively from tryptophan, so it may be recycled efficiently in its biosynthetic pathways (Figure 3). CYP2D-mediated formation of 5-HT from 5-MT contributes to this cycle (Yu, Idle, Byrd et al. 2003). It has also been suggested that the CYP2D-mediated pathway takes place to preserve the biological activities of serotonin and other

indoleamines, delaying their elimination and keeping them in a dynamic cycle (Haduch et al. 2015). O-demethylation of 5-MT to 5-HT has been described *in vitro* for human and rat cDNA-expressed CYP2D isoforms in liver/brain microsomes (Yu, Idle, Byrd et al. 2003; Haduch et al. 2013) and *in vivo* in *Cyp2d6*-transgenic mice and rat brain microdialysis models (Cheng et al. 2013; Haduch et al. 2015). Additionally, the *in vivo* CYP2D-mediated synthesis of serotonin in the brain can be supported by the intraperitoneal administration of melatonin to rats, which demonstrates an efficient serotonin–melatonin–serotonin cycle (Figure 3) (Haduch et al. 2016).

Outstanding findings have also described the participation of CYP2D6 and CYP3A4 in the biosynthesis of morphine in liver and brain (Grobe et al. 2009; Kramlinger et al. 2015). CYP2D6 catalyzes three reactions in the biosynthesis of morphine, it catalyzes the 3-O-demethylation of codeine to morphine, the 3-O-demethylation of thebaine to oripavine, and the phenol coupling of (R)-reticuline to salutaridine (Figure 3) (Dayer et al. 1988; Mikus et al. 1991; Grobe et al. 2009).

The gene encoding CYP2D6 is highly polymorphic, leading to great interindividual variability in the enzyme activity (Briefly described in (Ferguson and Tyndale 2011)). CYPs may have important endogenous neurologic functions, as individuals with *CYP2D6* poor metabolizer genotype and phenotype have different personality traits than *CYP2D6* normal metabolizers (Miksys and Tyndale 2013). Behavioral characteristics like anxiety and impulsivity have been related to *CYP2D6* polymorphisms and their relationship with serotonin/dopamine balance (Peñas-Lledó et al. 2009), drug–drug interaction, efficacy, and adverse effects in psychotic disorders treatments.

## Cytochromes P450 and CNS inflammation

Inflammation is a nonspecific biological response initiated after any kind of corporal injury, through physical damage, or infection by microorganisms. Inflammation occurs mainly to remove harmful stimuli (pathogens, damaged, and dead cells) and to start the healing process and tissue repair. In the CNS, diverse harmful processes such as traumatic brain injury, neurodegenerative disorders (AD, PD, amyotrophic lateral sclerosis), and neuropsychiatric disorders (depression and schizophrenia) have been related to inflammation. Neuroinflammation incorporates a wide spectrum of complex cellular responses that include activation of microglia and astrocytes; the elaboration of cytokines and chemokines; complement proteins; acute phase

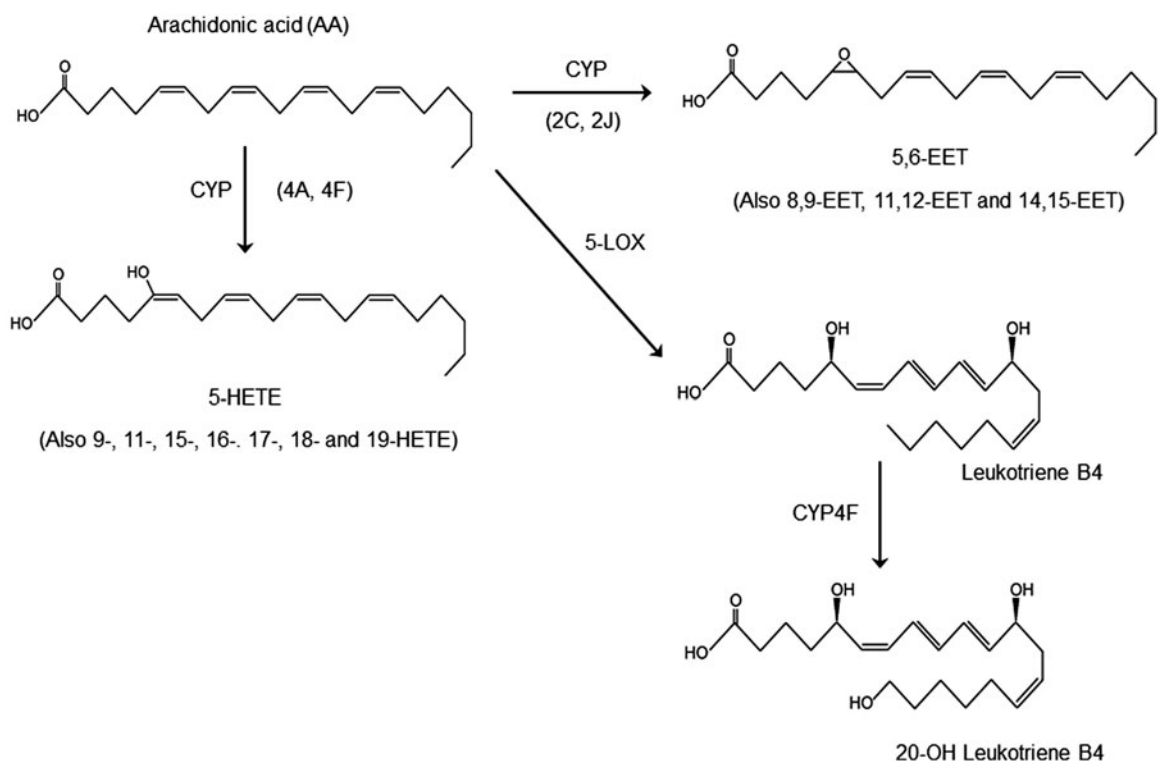


Figure 1. CYP-mediated arachidonic acid metabolism.

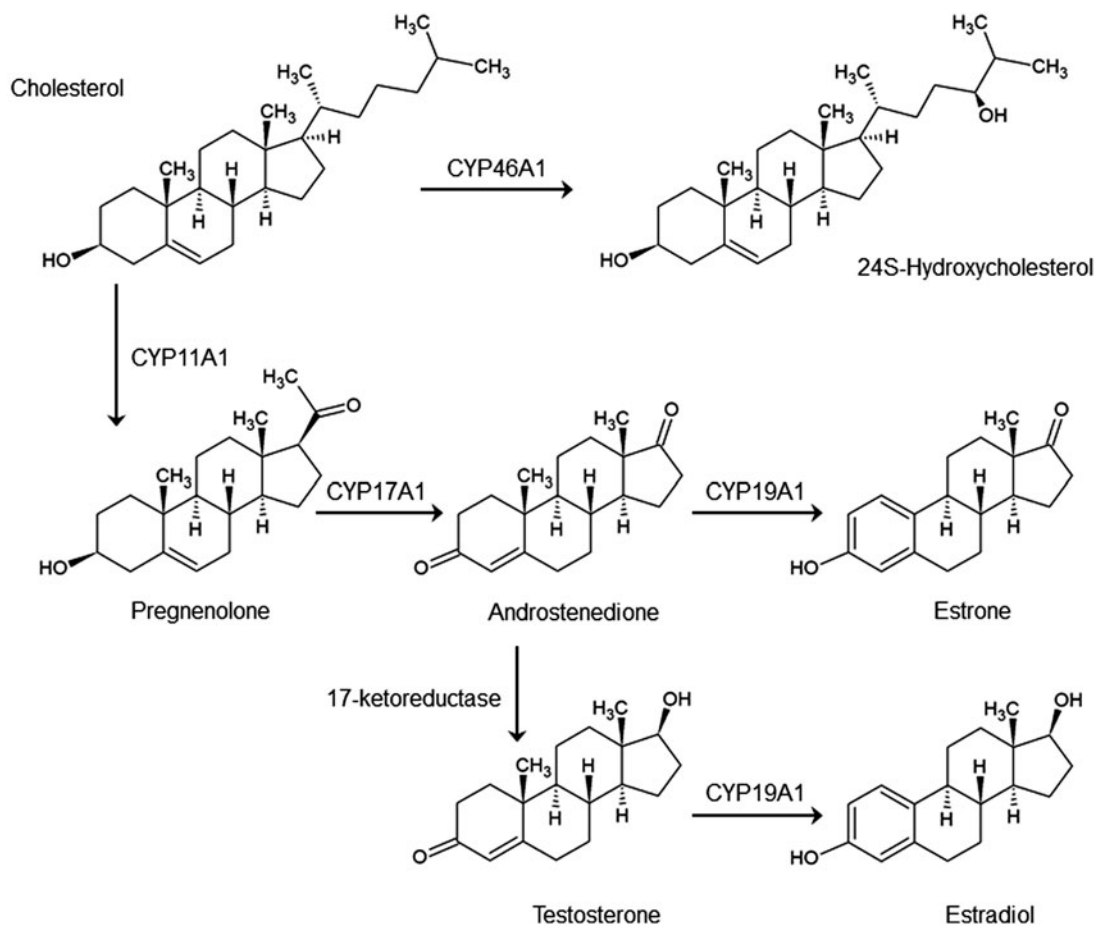
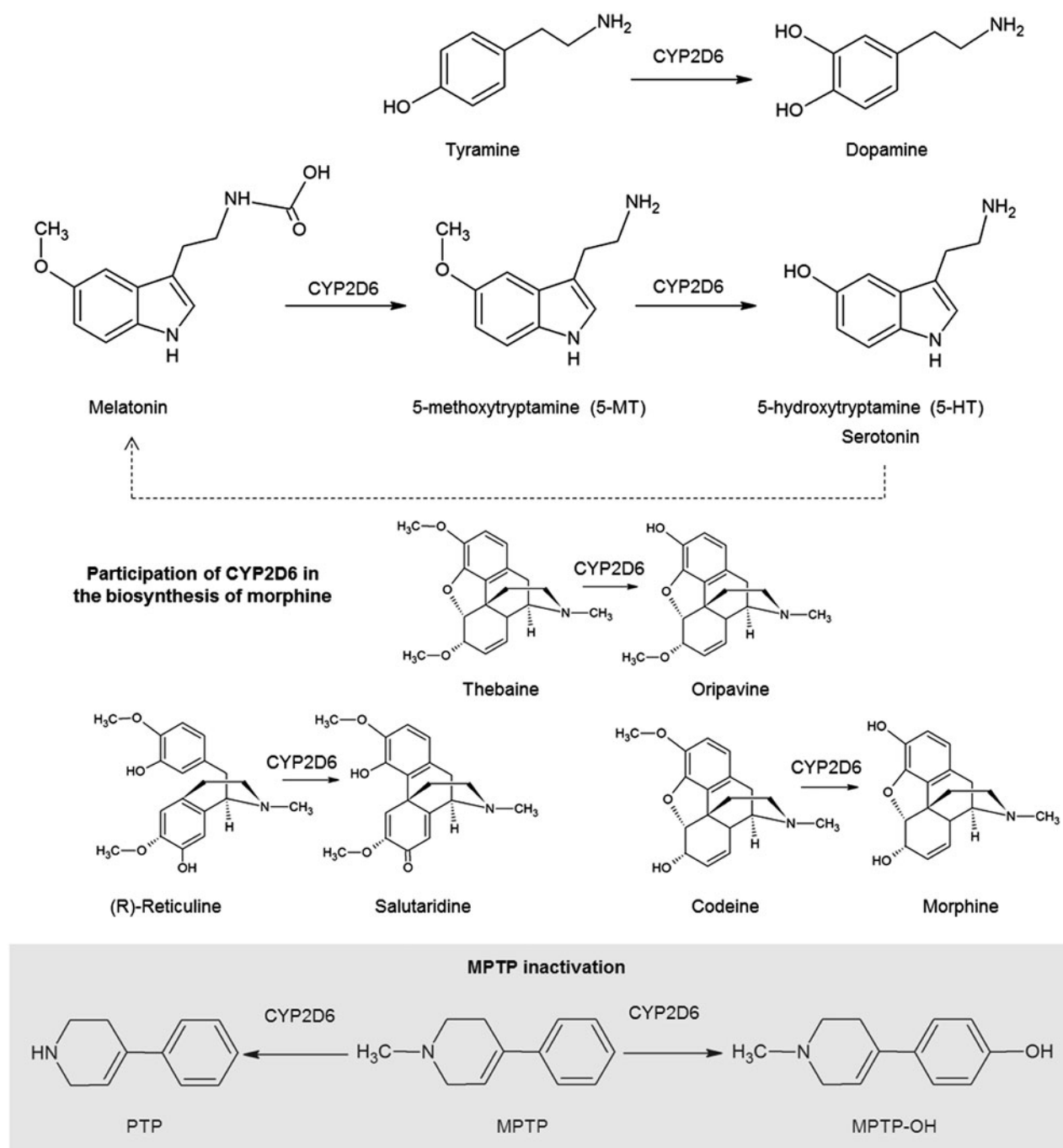


Figure 2. CYP-mediated cholesterol metabolism.



**Figure 3.** CYP2D6-mediated endogenous metabolism and MPTP detoxification.

proteins; oxidative injury; and related molecular processes. It is known that the persistence of an inflammatory stimulus or the lack of resolution in sustained inflammation may result in neurodegeneration (Qin et al. 2007). Therefore, finding mechanisms that counteract inflammation in the CNS is paramount.

The potent anti-inflammatory activity of CYP-derived EETs has been described, which is mainly mediated by the inhibition of NF- $\kappa$ B transcription factor pathway, either through inhibition of IKK complex activity or by

activating the nuclear receptors PPAR- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  (Node et al. 1999; Deng et al. 2010). PPAR- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  elicit various anti-inflammatory effects upon activation, including inhibition of NF- $\kappa$ B activation, chemokine and cellular adhesion molecule (CAM) expression, vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and leukocyte-endothelial adhesion (Deng et al. 2010). EETs might therefore lead to the down-regulation of various pro-inflammatory signaling pathways controlled by NF- $\kappa$ B. It has also been described that EETs down-regulate the

**Table 1.** Main CYPs involved in neurodegenerative diseases, its brain localization and the metabolism that may be involved in the etiology/improvement of the diseases.

| CYP     | Localization  | References   | Substrate                | Product  | Possible target of | References  |
|---------|---|--|--------------------------|--|--------------------|---|
| CYP46A1 | Human and mouse: Multiple types of neurons in the H, CX, and CB                                 | (Lund et al. 2003; Ramirez et al. 2008; Duthell et al. 2009)   | Cholesterol              | 24(S)-hydroxycholesterol   | AD<br>PD<br>HD     | (Lund et al. 2003; Borroni et al. 2004; Duthell et al. 2009; Hudry et al. 2010; Vance 2012; Mast et al. 2014; Burlot et al. 2015; Djeltili et al. 2015; Boussicault et al. 2016; Mast, Saadane et al. 2017) |
| CYP2D6  | Human: Multiple types of neurons in the CX, CN, P, GP, H, M, and SN; astrocytes in the CX and H | (McFadyen et al. 1998; Siegle et al. 2001; Chinta et al. 2002; Miksys et al. 2002; Duthell et al. 2009)      | Tyramine<br>5-MT<br>MPTP | Dopamine<br>5-HT (Serotonin)<br>MPTP-OH<br>PTP<br>MPDP <sup>+</sup><br>MPP <sup>+</sup>                    | AD<br>PD           | (Yu, Idle, Byrd, et al. 2003; Yu, Idle, Herraiz, et al. 2003; Herraiz et al. 2006; Elbaz et al. 2007; Bromek et al. 2011; Mann et al. 2012; Ur Rasheed et al. 2017)   |
| CYP2E1  | Human and rat: Multiple types of neurons in the CX, H, CB, DG, ST, T, and SN                    | (Farin and Omiecinski 1993; Watts et al. 1998; Upadhyaya et al. 2000; Howard et al. 2003; Wu JY et al. 2011) | AA<br>Ethanol<br>MPTP    | 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET; and 14,15-EET<br>Acetaldehyde<br>PTP<br>MPDP <sup>+</sup><br>MPP <sup>+</sup> | PD                 | (Vaglini et al. 2004; Zimatkin et al. 2006; Viaggi et al. 2009; Vaglini et al. 2013)  |
| CYP2J2  | Human: Multiple types of neurons in H and CB; astrocytes in the CX, H and CB                    | (Duthell et al. 2009)  | AA                       | 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET; and 14,15-EET   | AD<br>PD<br>NI     | (Zhang W et al. 2007; Koerner et al. 2008; Sarkar et al. 2014; Lakkappa et al. 2016; Huang et al. 2018; Wagner et al. 2017)   |
| CYP2C11 | Rat: astrocytes in the CX and TG sensory neurons  | (Liu and Alkayed 2005; Ruparel et al. 2012; Carver et al. 2014)  |                          | 5-, 9-, 11-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, and 20-HETE  |                    |   |
| CYP4F   | Neurons in the CX, T, H, and CB; microglia in the CX  | (Sehgal et al. 2011)   | LTB4                     | 20-OH LTB4   | NI                 | (Sehgal et al. 2011)  |

CYP: Cytochrome P450; H: hippocampus; CX: cortex; CB: cerebellum; CN: caudate nucleus; P: putamen; GP: globus pallidus; M: medulla; SN: substantia nigra; DG: dentate gyrus; ST: striatum; T: thalamus; AD: Alzheimer's disease; PD: Parkinson's disease; 5-MT: 5-methoxytryptamine; 5-HT: 5-hydroxytryptamine; MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MPTP-OH: 4-(4-hydroxyphenyl)-1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; PTP: 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MPDP<sup>+</sup>: 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium; MPP<sup>+</sup>: 1-methyl-4-phenylpyridinium; TG: trigeminal ganglia; AA: arachidonic acid; EET: epoxyeicosatrienoic acid; NI: neuroinflammation.



activities of COX-2 and LOX-5 and their corresponding metabolites, leading to a decreased inflammatory response (Shahabi et al. 2014). In the CNS, EET-mediated regulation of neuroinflammation has been described in hemorrhagic and ischemic cerebrovascular events (Zhang et al. 2007; Koerner et al. 2008). Also, sEH inhibition has been involved in 17 $\beta$ -estradiol-mediated neuroprotection during ischemic brain injury (Koerner et al. 2008). Moreover, endothelial overexpression of CYP2J2 has been demonstrated to be neuroprotective against global cerebral ischemic injury. This protection has been linked to the increased generation of EETs, activation of the PI3K/AKT pathway, increased levels of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xl, attenuation of the pro-apoptotic proteins Bax and caspase-3, increased cerebral blood flow (CBF) and cerebral microvascular density, and suppression of reactive oxygen species (ROS) production (Li et al. 2012).

Additionally, Leukotriene B4 (LTB4) is very important to the regulation of inflammatory reactions, as it initiates and amplifies the production of cytokines and chemokines. Resolution of inflammation should therefore involve methods that inactivate leukotrienes and thereby reduce the inflammatory response (Sehgal et al. 2011). LTB4 is inactivated through a  $\omega$ -hydroxylation, producing 20-hydroxy LTB4, a reaction predominantly catalyzed by CYP4F enzymes (Figure 1).

### Cytochromes P450 and Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is a progressive form of dementia, considered the most prevalent neurodegenerative disease in the world. It is characterized by progressive deficits in memory and cognitive and behavioral impairments that ultimately lead to dementia. Dysfunction and death of regional specific neurons with higher cognitive functions in the hippocampus and neocortex distinguish AD from other neurodegenerative diseases. Two main pathological features also characterize AD: depositions of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) protein fibrils, which form extracellular senile plaques, and aggregates of hyperphosphorylated tau protein within neurons. Soluble A $\beta$  has been suggested, in great extent, as one major responsible of the pathogenesis of AD, mainly by causing mitochondrial dysfunction (Casley et al. 2002; Eckert et al. 2008; Eckert et al. 2011). The CYP-derived EETs have demonstrated to be protective and even improve mitochondrial dynamics (Sarkar et al. 2014). It has also been proved that A $\beta$  affects epoxygenase activity in cultured astrocytes, resulting in a decrease of more than 70% in the production of 11,12-EET and 14,15-EET (Sarkar et al. 2011). The inhibition of sEH has proven to be useful in increasing EETs

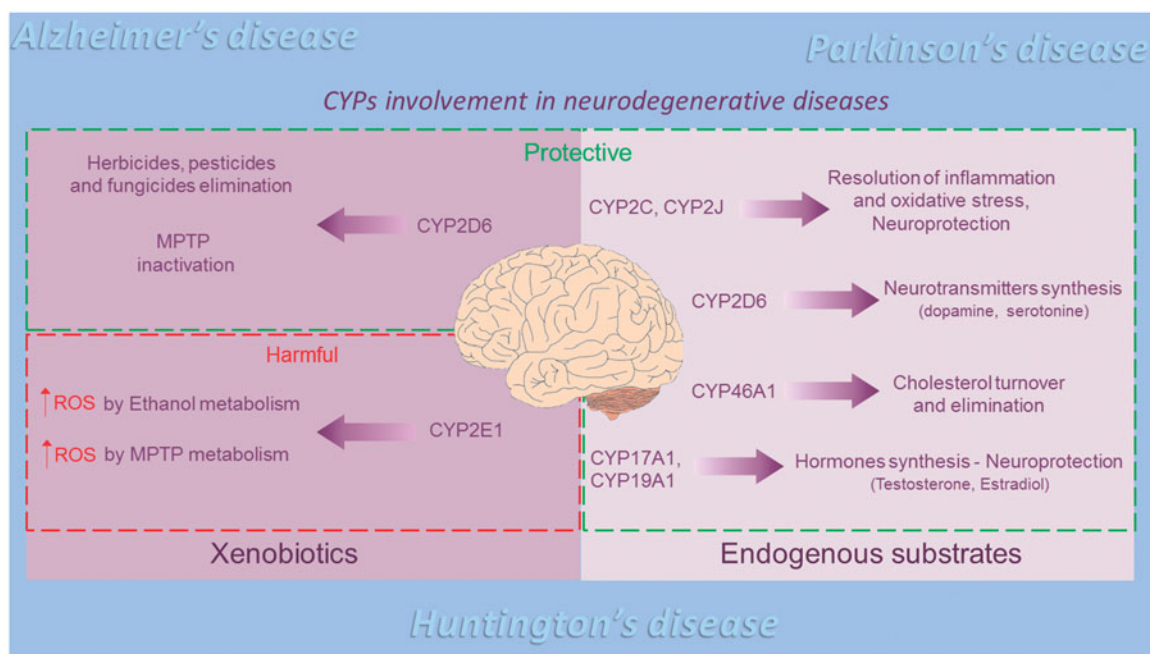
levels in several animal models and is now proposed as a therapeutic target in neurodegenerative diseases (Wagner et al. 2017).

Another CYP-related feature has been observed in AD, the disturbances in cholesterol homeostasis. Levels of brain cholesterol completely depend on its local synthesis and efflux. CYP46A1-mediated 24S-hydroxycholesterol production is the main cholesterol elimination pathway in the brain, and it has been reported that CYP46 and ApoE polymorphisms synergically increase the risk of developing AD, and influence the rate of cognitive decline (Borroni et al. 2004). Additionally, in AD patients' plasma, cholesterol levels are increased and 24S-hydroxycholesterol levels are decreased (Kölsch et al. 2004). Furthermore, a cholesterol overload has been described in the cortex and senile plaques of AD patients (Mori et al. 2001; Lazar et al. 2013) and in tangle-bearing neurons (Distl et al. 2001). Finally, the main genetic risk factor for sporadic AD is the presence of ApoE  $\epsilon$ 4 allele (Bertram and Tanzi 2012), which is the major apolipoprotein found in the brain; responsible for carrying cholesterol and other lipids in the blood, supporting the importance of cholesterol homeostasis in the pathogenesis of AD.

In an effort to address the importance of CYP46A1 to AD, Djelti and coworkers used an amyloid precursor protein (APP) transgenic mice (transgenic model for  $\beta$ -amyloid pathology) and inhibited *Cyp46a1* expression in the hippocampus through the RNA interference methodology. In normal mice, *Cyp46a1* inhibition caused a 2- to 2.5-fold cholesterol content increase in hippocampal neurons and a 1.3-fold increase in hippocampal-isolated lipid rafts. In addition, 24S-hydroxycholesterol content was decreased by approximately 50% in the hippocampus (Djelti et al. 2015). Also, *Cyp46a1* downregulation and the consequent accumulation of cholesterol led to hippocampal neuronal death by apoptosis, which promoted cognitive deficits and hippocampal atrophy. Cholesterol accumulation also enhanced recruitment of APP to the lipid rafts and triggered the production of amyloid- $\beta$  peptides. The observed effects were substantially higher in the APP transgenic mice model (Djelti et al. 2015). Altogether, these results highlight the potential therapeutic value of CYP46A1 for AD.

### CYP46A1 modulation as Alzheimer's disease therapeutic target

Increasing evidence suggests that CYP46A1 modulation could play a determinant role in AD improvement. Overexpression of CYP46A1 in mice models of AD has demonstrated the amelioration of cognitive impairments and histopathological aggregates in A $\beta$



**Figure 4.** CYPs protective and harmful role in neurodegenerative diseases.

pathology, as well as memory improvements in Tau pathology (Hudry et al. 2010; Burlot et al. 2015). When CYP46A1 protein levels were increased in APP transgenic mice, A $\beta$  production was decreased by lowering the recruitment and cleavage of amyloid precursor protein (APP). It bears consideration that, even when CYP46A1 levels in the brain were increased, cholesterol and cholesteryl ester levels remained unchanged. Additionally, preexisting A $\beta$  plaques significantly decreased in the hippocampus and cortex of *Cyp46a1*-overexpressed animals (Hudry et al. 2010). In the THY-Tau22 mouse model of AD (transgenic model for Tau aggregation), CYP46A1 and 24S-hydroxycholesterol levels in the hippocampus were lower in THY-Tau22 than in control mice. When *Cyp46a1* was overexpressed in the hippocampus of THY-Tau22 mice, CYP46A1 content, and 24S-hydroxycholesterol content were normalized, improving memory abilities, neuronal morphology, neuronal function, and the synaptic defects that characterize this model (Burlot et al. 2015).

Moreover, the induction of CYP46A1 activity has been recently tried with endogenous substrates and pharmacological agents (Table 2). L-Glutamate was the most effective endogenous CYP46A1 inducer, as it increased 3-fold the enzyme activity *in vitro* (Mast, Anderson et al. 2017). The antiretroviral medication Efavirenz (EFV) was the most effective synthetic CYP46A1 inducer. When it was tested in mice, EFV increased the cerebral cholesterol turnover, measured as cholesterol precursors and its hydroxylation products, at doses a hundred times lower than the prescribed for

HIV patients (Mast et al. 2014). EFV's therapeutic potential in AD was further demonstrated in 5XFAD mice (AD model of rapid amyloidogenesis), as a low dose of EFV improved cholesterol turnover and decreased amyloid burden, microglia activation, and APP levels (Mast, Saadane et al. 2017). Remarkably, EFV treatment increased the survival of male 5XFAD mice (given that females in all groups died less) at five and nine months of age. This is a very important fact, as it reflects the final effect of a CYP46A1-directed pharmacological treatment in the survival of an AD animal model for the first time.

### Cytochromes P450 and Parkinson's disease

Parkinson disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after AD. PD is characterized by motor features known as "parkinsonism," which includes the triad of tremor, slowness of movement and muscular rigidity. The motor manifestations of PD are attributed to the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, resulting in secondary dysfunction of the basal ganglia, which are involved in the initiation and execution of movements. The subcellular hallmarks of PD are the intraneuronal inclusions of various structures consisting mostly of fibrillar  $\alpha$ -synuclein (Lewy bodies and Lewy neuritis) (Baltazar et al. 2014). The etiology of PD, as with many other neurodegenerative diseases, is considered multifactorial and consists of an interaction between environmental factors and genetic predisposition (Di Monte

**Table 2.** CYPs modulation by natural/synthetic agents in the brain.

| CYP          | Action needed in neurodegenerative diseases treatment | Natural/synthetic modulators  | References  |
|--------------|---|---|---|
| CYP46A1      | Induction   | L-Glu, L-Asp, GABA, Ach, NMDA/<br>Efavirenz, acetaminophen, mirtazapine,<br>galantamine | (Mast et al. 2014; Mast, Anderson, et al. 2017; Mast, Saadane, et al. 2017)                             |
| CYP2D6       | Induction   | Testosterone/<br>nicotine<br>ethanol  | (Baum and Strobel 1997; Miksys and Tyndale 2006; Mann et al. 2008; Yue et al. 2008; Miller et al. 2014) |
| CYP2J, CYP2C | CYP induction/<br>sEH inhibition                      | /TPPU, PTUPB  | (Chen Y et al. 2017; Huang et al. 2018; Wagner et al. 2017; Lakkappa et al. 2018)                       |
| CYP2E1       | Inhibition  | Vitamin E/<br>DAS, DATS, DDC, PIC   | (Brady et al. 1991; Galal et al. 2014; Valencia-Olvera et al. 2014; Wang et al. 2017)                   |

CYP: Cytochrome P450; L-Glu: L-glutamate; L-Asp: L-aspartate; GABA:  $\gamma$ -aminobutyric acid; Ach: acetylcholine; NMDA: N-methyl-D-aspartate; sEH: soluble epoxide hydrolase, TPPU: N-[1-(1-oxopropyl)-4-piperidinyl]-N0-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-urea, PTUPB: 4-(5-phenyl-3-3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-ureido-propyl-pyrazol-1-yl) benzenesulfonamide; DAS: diallyl sulfide; DATS: diallyl trisulfide; DDC: diethyldithiocarbamate; PIC: phenylethylisothiocyanate.

2003; Elbaz et al. 2007). Familial forms of PD have been described, involving mutations, duplications, and triplcations in the  $\alpha$ -Syn gene (*SNCA*) and mutations in the leucine-rich repeat kinase 2 gene (*LRRK2*) (Trinh and Farrer 2013). However, mitochondrial dysfunction, neuroinflammation, and environmental factors are increasingly appreciated as key determinants of dopaminergic neuronal susceptibility in PD, with oxidative stress being the thought underlying mechanism that leads to cellular dysfunction and cell death (Blesa et al. 2015; Ryan et al. 2015). A great advance in the search for the etiology of PD has been made since MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) was discovered as a potent neurotoxicant able to reproduce the main neurochemical and anatomical pathology of PD (Langston et al. 1983; Halliday et al. 2014). Due to the structural similarity between MPTP and some pesticides and herbicides like paraquat, several epidemiological studies have been performed and it has been possible to establish a positive association between pesticides, herbicides and fungicides exposure to PD development (Semchuk et al. 1992; Tanner et al. 2011; Freire and Koifman 2012). Moreover, increasing attention has been paid to the role of CYPs in PD, as the major players in the metabolism of toxicants in the brain.

### Harmful CYPs in Parkinson's disease

To determine if CYP enzymes were present in PD-susceptible brain regions, Watts and coworkers searched for various CYPs proteins in the rat substantia nigra, also they searched for the co-localization of CYPs with tyrosine hydroxylase-positive (TH+) neurons and astrocytes. Only CYP2E1 and CYP2C13/2C6 proteins were found in (TH+) neurons of the substantia nigra with no presence in glial cells (Watts et al. 1998). Since then, several research works have been focused in determine the role of CYP2E1

in PD pathophysiology. Within these works, it has been found an association between C/G polymorphism at intron 7 of *CYP2E1* (rs2070676) and PD in Swedish population (Shahabi et al. 2009). However, it has not been found an association between alleles or rs2864987 polymorphism and PD in Taiwanese or Japanese population, respectively (Wu et al. 2002; Kiyohara et al. 2011). Although *CYP2E1* polymorphisms have not yet a clear association with PD, recent findings have reported that brains of PD patients present a decreased methylation of *CYP2E1* with a resultant increase in *CYP2E1* expression (mRNA levels), suggesting that *CYP2E1* epigenetic regulation may play a relevant role in PD susceptibility (Kaut et al. 2012).

Additionally, CYP2E1 has been related to MPTP toxicity in mice because it increases the free radical production inside the dopaminergic neurons (Vaglini et al. 2013). CYP2E1's harmful role in MPTP-induced toxicity was demonstrated in *Cyp2e1* (−/−) mice that showed reduced sensitivity to MPTP compared to controls (Viaggi et al. 2009). However, nowadays CYP2E1 role in MPTP toxicity is unclear and opposite results have been reported in this regard, in which CYP2E1 inhibition by diethyldithiocarbamate (DDC), diallyl sulfide (DAS) and phenylethylisothiocyanate (PIC) led to the loss of dopaminergic neurons (Vaglini et al. 2004), but this effect was absent in *Cyp2e1* (−/−) mice (Vaglini et al. 2004; Pardini et al. 2008; Viaggi et al. 2009). Apparently, CYP2E1 metabolize MPTP to both harmful (MPDP<sup>+</sup>, MPP<sup>+</sup>) and inactive metabolites (PTP) (Vaglini et al. 2004), but the net effect is more harmful to the cells than beneficial, probably because CYP2E1-mediated metabolism has an inherent ROS production in addition to the production of MPTP-derived harmful metabolites. Although there are several CYP2E1 known inhibitors that can act in the brain (Table 2), it is difficult to reach a complete inhibition of the enzyme and it has been



difficult to determine a beneficial effect of these pharmacological approaches.

### Protective CYPs in Parkinson's disease

It is well known that CYP2D6 is involved in the metabolism of pesticides and that genetic polymorphisms in *CYP2D6* with a concomitant poor/absent activity of the enzyme are associated with an increased risk to develop PD (Elbaz et al. 2007; Ur Rasheed et al. 2017). CYP2D6 could also participate in the detoxification of MPTP and its neuroactive compounds, as it metabolically inactivates MPTP (Figure 3) and its toxic metabolite 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) (Herraiz et al. 2006; Mann and Tyndale 2010). CYP2D6 protein expression in the human brain increases with age and it has been described that individuals with PD have approximately 40% lower CYP2D6 protein levels in several brain regions compared to healthy control individuals (Siegle et al. 2001; Mann et al. 2012). This could be relevant not only because the detoxifying activity of the enzyme, but for its endogenous role in the synthesis of dopamine (Table 1, Figure 4). In this way, CYP2D6 could be a valuable therapeutic target in PD. There have been described some CYP2D6 inducers in the brain that could be considered for future pharmacological approaches or for the search of new structurally related molecules (Table 2).

Additionally, CYP epoxigenases have emerged as possible therapeutic targets in PD, mainly because they produce EETs, neuroprotective agents that counteract many of the etiological characteristics of the disease (Lakkappa et al. 2016). Experimentally, it has been demonstrated that the genetic or pharmacologic inhibition of sEH attenuates MPTP-induced neurotoxicity in mice (Huang et al. 2018). The sEH inhibition was positively reflected in striatal dopamine content, TH levels, and TH-positive neurons after MPTP treatment. Moreover, sEH inhibition was shown to be effective in attenuating MPTP-induced oxidative stress, apoptosis,  $\alpha$ -synuclein aggregation, and ER stress (Huang et al. 2018). It has also been demonstrated that a sEH/COX-2 inhibitor (PTUPB) was neuroprotective in a Rotenone-mediated *Drosophila* model of PD, by restoring in a dose-dependent manner the dopamine levels in the flies' head (Lakkappa et al. 2018). Nowadays there are several compounds identified as sEH inhibitors (Table 2), and some of them even have been tested in clinical trials for hypertension and type 2 diabetes in healthy individuals without related adverse events (Chen et al. 2012).

### Concluding remarks

Cytochrome P450 enzymes play a central role in CNS physiology as they are involved in the metabolic pathways of important intermediates such as cholesterol, neurosteroids, neurotransmitters, and lipid mediators, which are responsible for neurochemical brain homeostasis. Describing the role of these enzymes in the normal physiology of the CNS has enabled the emergence of new studies that have described how changes in normal CYP functioning may relate to or influence the development of certain pathologies, including some neurodegenerative diseases such as AD and PD. CYP enzymes are susceptible to induction or inhibition, and may be a good choice as therapeutic targets in the CNS.

### Disclosure statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Funding

Cynthia Navarro-Mabarak was supported by a CONACYT PhD fellowship No. [356644] to study in the program: Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### References

- Anchisi L, Dessì S, Pani A, Mandas A. 2012. Cholesterol homeostasis: a key to prevent or slow down neurodegeneration. *Front Physiol.* 3:486.
- Aoyama Y, Horiuchi T, Yoshida Y. 1996. Lanosterol 14-demethylase activity expressed in rat brain microsomes. *J Biochem.* 120:982–986.
- Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, de Lourdes Bastos M, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F. 2014. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases – a mechanistic approach. *Toxicol Lett.* 230:85–103.
- Baum LO, Strobel HW. 1997. Regulation of expression of cytochrome P-450 2D mRNA in rat brain with steroid hormones. *Brain Res.* 765:67–73.
- Bazinet RP, Layé S. 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci.* 15:771–785.
- Bertram L, Tanzi RE. 2012. The genetics of Alzheimer's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 107:79–100.
- Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. 2015. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 9:91.
- Borroni B, Archetti S, Agosti C, Akkawi N, Brambilla C, Caimi L, Caltagirone C, Di Luca M, Padovani A. 2004. Intronic CYP46 polymorphism along with ApoE genotype in sporadic Alzheimer disease: from risk factors to disease modulators. *Neurobiol Aging.* 25:747–751.

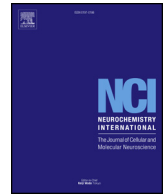
- Boussicault L, Alves S, Lamazière A, Planques A, Heck N, Moumné L, Despres G, Bolte S, Hu A, Pagès C, et al. 2016. CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain*. 139:953–970.
- Brady JF, Ishizaki H, Fukuto JM, Lin MC, Fadel A, Gapac JM, Yang CS. 1991. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem Res Toxicol*. 4:642–647.
- Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. 2007. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*. 72:381–405.
- Bromek E, Haduch A, Daniel WA. 2010. The ability of cytochrome P450 2D isoforms to synthesize dopamine in the brain: an in vitro study. *Eur J Pharmacol*. 626:171–178.
- Bromek E, Haduch A, Gołmbiowska K, Daniel WA. 2011. Cytochrome P450 mediates dopamine formation in the brain in vivo. *J Neurochem*. 118:806–815.
- Burlot MA, Braudeau J, Michaelsen-Preusse K, Potier B, Ayciriex S, Varin J, Gautier B, Djelti F, Audrain M, Dauphinot L, et al. 2015. Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology. *Hum Mol Genet*. 24:5965–5976.
- Carver KA, Lourim D, Tryba AK, Harder DR. 2014. Rhythmic expression of cytochrome P450 epoxigenases CYP4x1 and CYP2c11 in the rat brain and vasculature. *Am J Physiol Cell Physiol*. 307:C989–C998.
- Casley CS, Land JM, Sharpe MA, Clark JB, Duchon MR, Canevari L. 2002. Beta-amyloid fragment 25-35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons. *Neurobiol Dis*. 10:258–267.
- Chen D, Whitcomb R, MacIntyre E, Tran V, Do ZN, Sabry J, Patel DV, Anandan SK, Gless R, Webb HK. 2012. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of AR9281, an inhibitor of soluble epoxide hydrolase, in single- and multiple-dose studies in healthy human subjects. *J Clin Pharmacol*. 52:319–328.
- Chen Y, Tian H, Yao E, Tian Y, Zhang H, Xu L, Yu Z, Fang Y, Wang W, Du P, et al. 2017. Soluble epoxide hydrolase inhibition promotes white matter integrity and long-term functional recovery after chronic hypoperfusion in mice. *Sci Rep*. 7:7758.
- Cheng J, Zhen Y, Miksys S, Beyoğlu D, Krausz KW, Tyndale RF, Yu A, Idle JR, Gonzalez FJ. 2013. Potential role of CYP2D6 in the central nervous system. *Xenobiotica*. 43:973–984.
- Chinta SJ, Pai HV, Upadhyaya SC, Boyd MR, Ravindranath V. 2002. Constitutive expression and localization of the major drug metabolizing enzyme, cytochrome P4502D in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 103:49–61.
- Dayer P, Desmeules J, Leemann T, Striberni R. 1988. Bioactivation of the narcotic drug codeine in human liver is mediated by the polymorphic monooxygenase catalyzing debrisoquine 4-hydroxylation (cytochrome P-450 db1/bufl). *Biochem Biophys Res Commun*. 152:411–416.
- Deng Y, Theken KN, Lee CR. 2010. Cytochrome P450 epoxigenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation. *J Mol Cell Cardiol*. 48:331–341.
- Di Monte DA. 2003. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins?. *Lancet Neurol*. 2:531–538.
- Dietschy JM, Turley SD. 2004. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res*. 45:1375–1397.
- Distl R, Meske V, Ohm TG. 2001. Tangle-bearing neurons contain more free cholesterol than adjacent tangle-free neurons. *Acta Neuropathol*. 101:547–554.
- Djelti F, Braudeau J, Hudry E, Dhenain M, Varin J, Bièche I, Marquer C, Chali F, Ayciriex S, Auzeil N, et al. 2015. CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain*. 138:2383–2398.
- Dutheil F, Dauchy S, Diry M, Sazdovitch V, Cloarec O, Mellottée L, Bièche I, Ingelman-Sundberg M, Flinois JP, de Waziers I, et al. 2009. Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function. *Drug Metab Dispos*. 37:1528–1538.
- Eckert A, Hauptmann S, Scherping I, Rhein V, Müller-Spahn F, Götz J, Müller WE. 2008. Soluble beta-amyloid leads to mitochondrial defects in amyloid precursor protein and tau transgenic mice. *Neurodegener Dis*. 5:157–159.
- Eckert A, Schmitt K, Götz J. 2011. Mitochondrial dysfunction - the beginning of the end in Alzheimer's disease? Separate and synergistic modes of tau and amyloid- $\beta$  toxicity. *Alzheimers Res Ther*. 3:15.
- Elbaz A, Dufouil C, Alperovitch A. 2007. Interaction between genes and environment in neurodegenerative diseases. *Crit Rev Biol*. 330:318–328.
- Farin FM, Omiecinski CJ. 1993. Regiospecific expression of cytochrome P-450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue. *J Toxicol Environ Health*. 40:317–335.
- Ferguson CS, Tyndale RF. 2011. Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends Pharmacol Sci*. 32:708–714.
- Freire C, Koifman S. 2012. Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology*. 33:947–971.
- Galal MK, Khalaf AA, Ogaly HA, Ibrahim MA. 2014. Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. *BMC Complement Altern Med*. 14:458.
- Grobe N, Zhang B, Fisinger U, Kutchan TM, Zenk MH, Guengerich FP. 2009. Mammalian cytochrome P450 enzymes catalyze the phenol-coupling step in endogenous morphine biosynthesis. *J Biol Chem*. 284:24425–24431.
- Haduch A, Bromek E, Kot M, Kamińska K, Gołmbiowska K, Daniel WA. 2015. The cytochrome P450 2D-mediated formation of serotonin from 5-methoxytryptamine in the brain in vivo: a microdialysis study. *J Neurochem*. 133:83–92.
- Haduch A, Bromek E, Sadakierska-Chudy A, Wójcikowski J, Daniel WA. 2013. The catalytic competence of cytochrome P450 in the synthesis of serotonin from 5-methoxytryptamine in the brain: an in vitro study. *Pharmacol Res*. 67:53–59.
- Haduch A, Bromek E, Wójcikowski J, Gołmbiowska K, Daniel WA. 2016. Melatonin supports CYP2D-mediated serotonin synthesis in the brain. *Drug Metab Dispos*. 44:445–452.

- Halliday GM, Leverenz JB, Schneider JS, Adler CH. 2014. The neurobiological basis of cognitive impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 29:634–650.
- Hardeland R. 2010. Melatonin metabolism in the central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 8:168–181.
- Herraiz T, Guillén H, Arán VJ, Idle JR, Gonzalez FJ. 2006. Comparative aromatic hydroxylation and N-demethylation of MPTP neurotoxin and its analogs, N-methylated beta-carboline and isoquinoline alkaloids, by human cytochrome P450 2D6. *Toxicol Appl Pharmacol.* 216:387–398.
- Hiroi T, Imaoka S, Funae Y. 1998. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun.* 249:838–843.
- Howard LA, Miksys S, Hoffmann E, Mash D, Tyndale RF. 2003. Brain CYP2E1 is induced by nicotine and ethanol in rat and is higher in smokers and alcoholics. *Br J Pharmacol.* 138:1376–1386.
- Huang HJ, Wang YT, Lin HC, Lee YH, Lin AM. 2018. Soluble epoxide hydrolase inhibition attenuates MPTP-induced neurotoxicity in the nigrostriatal dopaminergic system: involvement of  $\alpha$ -synuclein aggregation and ER stress. *Mol Neurobiol.* 55:138–144.
- Hudry E, Van Dam D, Kulik W, De Deyn PP, Stet FS, Ahouansou O, Benraiss A, Delacourte A, Bougnères P, Aubourg P, et al. 2010. Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Mol Ther.* 18:44–53.
- Kaut O, Schmitt I, Wüllner U. 2012. Genome-scale methylation analysis of Parkinson's disease patients' brains reveals DNA hypomethylation and increased mRNA expression of cytochrome P450 2E1. *Neurogenetics.* 13:87–91.
- Kiyohara C, Miyake Y, Koyanagi M, Fujimoto T, Shirasawa S, Tanaka K, Fukushima W, Sasaki S, Tsuboi Y, Yamada T, et al. 2011. APOE and CYP2E1 polymorphisms, alcohol consumption, and Parkinson's disease in a Japanese population. *J Neural Transm (Vienna).* 118:1335–1344.
- Koerner IP, Zhang W, Cheng J, Parker S, Hurn PD, Alkayed NJ. 2008. Soluble epoxide hydrolase: regulation by estrogen and role in the inflammatory response to cerebral ischemia. *Front Biosci.* 13:2833–2841.
- Komori M. 1993. A novel P450 expressed at the high level in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 196:721–728.
- Kramlinger VM, Alvarado Rojas M, Kanamori T, Guengerich FP. 2015. Cytochrome P450 3A enzymes catalyze the O6-demethylation of thebaine, a key step in endogenous mammalian morphine biosynthesis. *J Biol Chem.* 290:20200–20210.
- Kölsch H, Heun R, Kerksiek A, Bergmann KV, Maier W, Lütjohann D. 2004. Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients. *Neurosci Lett.* 368:303–308.
- Lakkappa N, Krishnamurthy PT, Hammock BD, Velmurugan D, Bharath MM. 2016. Possible role of Epoxyeicosatrienoic acid in prevention of oxidative stress mediated neuroinflammation in Parkinson disorders. *Med Hypotheses.* 93:161–165.
- Lakkappa N, Krishnamurthy PT, Yamjala K, Hwang SH, Hammock BD, Babu B. 2018. Evaluation of antiparkinson activity of PTUPB by measuring dopamine and its metabolites in *Drosophila melanogaster*: LC-MS/MS method development. *J Pharm Biomed Anal.* 149:457–464.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 219:979–980.
- Lazar AN, Bich C, Panchal M, Desbenoit N, Petit VW, Touboul D, Dauphinot L, Marquer C, Laprévotte O, Brunelle A, et al. 2013. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) imaging reveals cholesterol overload in the cerebral cortex of Alzheimer disease patients. *Acta Neuropathol.* 125:133–144.
- Li R, Xu X, Chen C, Yu X, Edin ML, Degraff LM, Lee CR, Zeldin DC, Wang DW. 2012. Cytochrome P450 2J2 is protective against global cerebral ischemia in transgenic mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 99:68–78.
- Liu M, Alkayed NJ. 2005. Hypoxic preconditioning and tolerance via hypoxia inducible factor (HIF) 1 $\alpha$ -linked induction of P450 2C11 epoxide hydrolase in astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25:939–948.
- Liu M, Hurn PD, Alkayed NJ. 2004. Cytochrome P450 in neurological disease. *Curr Drug Metab.* 5:225–234.
- Lund EG, Xie C, Kotti T, Turley SD, Dietschy JM, Russell DW. 2003. Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J Biol Chem.* 278:22980–22988.
- Mann A, Miksys S, Lee A, Mash DC, Tyndale RF. 2008. Induction of the drug metabolizing enzyme CYP2D in monkey brain by chronic nicotine treatment. *Neuropharmacology.* 55:1147–1155.
- Mann A, Miksys SL, Gaedigk A, Kish SJ, Mash DC, Tyndale RF. 2012. The neuroprotective enzyme CYP2D6 increases in the brain with age and is lower in Parkinson's disease patients. *Neurobiol Aging.* 33:2160–2171.
- Mann A, Tyndale RF. 2010. Cytochrome P450 2D6 enzyme neuroprotects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in SH-SY5Y neuronal cells. *Eur J Neurosci.* 31:1185–1193.
- Mast N, Anderson KW, Johnson KM, Phan TTN, Guengerich FP, Pikuleva IA. 2017. In vitro cytochrome P450 46A1 (CYP46A1) activation by neuroactive compounds. *J Biol Chem.* 292:12934–12946.
- Mast N, Li Y, Linger M, Clark M, Wiseman J, Pikuleva IA. 2014. Pharmacologic stimulation of cytochrome P450 46A1 and cerebral cholesterol turnover in mice. *J Biol Chem.* 289:3529–3538.
- Mast N, Saadane A, Valencia-Olvera A, Constans J, Maxfield E, Arakawa H, Li Y, Landreth G, Pikuleva IA. 2017. Cholesterol-metabolizing enzyme cytochrome P450 46A1 as a pharmacologic target for Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 123:465–476.
- McFadyen C, Melvin WT, Murray GI. 1998. Regional distribution of individual forms of cytochrome P450 mRNA in normal adult human brain. *Biochem Pharmacol.* 55:825–830.
- Miksys S, Rao Y, Hoffmann E, Mash DC, Tyndale RF. 2002. Regional and cellular expression of CYP2D6 in human brain: higher levels in alcoholics. *J Neurochem.* 82:1376–1387.
- Miksys S, Tyndale RF. 2006. Nicotine induces brain CYP enzymes: relevance to Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 70:177–180.
- Miksys S, Tyndale RF. 2013. Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *J Psychiatry Neurosci.* 38:152–163.

- Mikus G, Somogyi AA, Bochner F, Eichelbaum M. 1991. Thebaine O-demethylation to oripavine: genetic differences between two rat strains. *Xenobiotica*. 21:1501–1509.
- Miller RT, Miksys S, Hoffmann E, Tyndale RF. 2014. Ethanol self-administration and nicotine treatment increase brain levels of CYP2D in African green monkeys. *Br J Pharmacol*. 171:3077–3088.
- Mori T, Paris D, Town T, Rojiani AM, Sparks DL, Delledonne A, Crawford F, Abdullah LI, Humphrey JA, Dickson DW, et al. 2001. Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 60:778–785.
- Nieweg K, Schaller H, Pfrieger FW. 2009. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem*. 109:125–134.
- Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, Liao JK. 1999. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*. 285:1276–1279.
- Pardini C, Vaglini F, Viaggi C, Caramelli A, Corsini GU. 2008. Role of CYP2E1 in the mouse model of MPTP toxicity. *Parkinsonism Relat Disord*. 14 Suppl 2:S119–S123.
- Peñas-Lledó EM, Dorado P, Pacheco R, González I, LLerena A. 2009. Relation between CYP2D6 genotype, personality, neurocognition and overall psychopathology in healthy volunteers. *Pharmacogenomics*. 10:1111–1120.
- Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. 2006. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev*. 52:201–243.
- Pikuleva IA. 2006. Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol Ther*. 112:761–773.
- Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 55:453–462.
- Ramirez DM, Andersson S, Russell DW. 2008. Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 507:1676–1693.
- Ruparel S, Henry MA, Akopian A, Patil M, Zeldin DC, Roman L, Hargreaves KM. 2012. Plasticity of cytochrome P450 isozyme expression in rat trigeminal ganglia neurons during inflammation. *Pain*. 153:2031–2039.
- Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. 2015. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci*. 40:200–210.
- Sarkar P, Narayanan J, Harder DR. 2011. Differential effect of amyloid  $\beta$  on the cytochrome P450 epoxygenase activity in rat brain. *Neuroscience*. 194:241–249.
- Sarkar P, Zaja I, Bienengraeber M, Rarick KR, Terashvili M, Canfield S, Falck JR, Harder DR. 2014. Epoxyeicosatrienoic acids pretreatment improves amyloid  $\beta$ -induced mitochondrial dysfunction in cultured rat hippocampal astrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 306:H475–H484.
- Sasame HA, Ames MM, Nelson SD. 1977. Cytochrome P-450 and NADPH cytochrome c reductase in rat brain: formation of catechols and reactive catechol metabolites. *Biochem Biophys Res Commun*. 78:919–926.
- Sehgal N, Agarwal V, Valli RK, Joshi SD, Antonovic L, Strobel HW, Ravindranath V. 2011. Cytochrome P4504f, a potential therapeutic target limiting neuroinflammation. *Biochem Pharmacol*. 82:53–64.
- Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. 1992. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology*. 42:1328–1335.
- Shahabi HN, Westberg L, Melke J, Håkansson A, Belin AC, Sydow O, Olson L, Holmberg B, Nissbrandt H. 2009. Cytochrome P450 2E1 gene polymorphisms/haplotypes and Parkinson's disease in a Swedish population. *J Neural Transm (Vienna)*. 116:567–573.
- Shahabi P, Siest G, Visvikis-Siest S. 2014. Influence of inflammation on cardiovascular protective effects of cytochrome P450 epoxygenase-derived epoxyeicosatrienoic acids. *Drug Metab Rev*. 46:33–56.
- Siegle I, Fritz P, Eckhardt K, Zanger UM, Eichelbaum M. 2001. Cellular localization and regional distribution of CYP2D6 mRNA and protein expression in human brain. *Pharmacogenetics*. 11:237–245.
- Stables MJ, Gilroy DW. 2011. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res*. 50:35–51.
- Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, et al. 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*. 119:866–872.
- Trinh J, Farrer M. 2013. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*. 9:445–454.
- Upadhyay SC, Tirumalai PS, Boyd MR, Mori T, Ravindranath V. 2000. Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Arch Biochem Biophys*. 373:23–34.
- Ur Rasheed MS, Mishra AK, Singh MP. 2017. Cytochrome P450 2D6 and Parkinson's disease: polymorphism, metabolic role, risk and protection. *Neurochem Res*. 42:3353–3361.
- Vaglini F, Pardini C, Viaggi C, Bartoli C, Dinucci D, Corsini GU. 2004. Involvement of cytochrome P450 2E1 in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 91:285–298.
- Vaglini F, Viaggi C, Piro V, Pardini C, Gerace C, Scarselli M, Corsini GU. 2013. Acetaldehyde and parkinsonism: role of CYP450 2E1. *Front Behav Neurosci*. 7:71
- Valencia-Olvera AC, Morán J, Camacho-Carranza R, Prospéro-García O, Espinosa-Aguirre JJ. 2014. CYP2E1 induction leads to oxidative stress and cytotoxicity in glutathione-depleted cerebellar granule neurons. *Toxicol In Vitro*. 28:1206–1214.
- Vance JE. 2012. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech*. 5:746–755.
- Viaggi C, Vaglini F, Pardini C, Caramelli A, Corsini GU. 2009. MPTP-induced model of Parkinson's disease in cytochrome P450 2E1 knockout mice. *Neuropharmacology*. 56:1075–1081.
- Wagner KM, McReynolds CB, Schmidt WK, Hammock BD. 2017. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for pain, inflammatory and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther*. 180:62–76.
- Wang S, Li M, Wang X, Li X, Yin H, Jiang L, Han W, Irving G, Zeng T, Xie K. 2017. Diallyl trisulfide attenuated n-hexane



- induced neurotoxicity in rats by modulating P450 enzymes. *Chem Biol Interact.* 265:1–7.
- Watts PM, Riedl AG, Douek DC, Edwards RJ, Boobis AR, Jenner P, Marsden CD. 1998. Co-localization of P450 enzymes in the rat substantia nigra with tyrosine hydroxylase. *Neuroscience.* 86:511–519.
- Wu JY, Yue J, Feng YQ. 2011. Determination of brain cytochrome P450 2E1 activity in rat with the probe of chlorzoxazone by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 879:260–266.
- Wu RM, Cheng CW, Chen KH, Shan DE, Kuo JW, Ho YF, Chern HD. 2002. Genetic polymorphism of the CYP2E1 gene and susceptibility to Parkinson's disease in Taiwanese. *J Neural Transm (Vienna).* 109:1403–1414.
- Yu AM, Idle JR, Byrd LG, Krausz KW, Küpfer A, Gonzalez FJ. 2003. Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6. *Pharmacogenetics.* 13:173–181.
- Yu AM, Idle JR, Herraiz T, Küpfer A, Gonzalez FJ. 2003. Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamine O-demethylase. *Pharmacogenetics.* 13:307–319.
- Yue J, Miksys S, Hoffmann E, Tyndale RF. 2008. Chronic nicotine treatment induces rat CYP2D in the brain but not in the liver: an investigation of induction and time course. *J Psychiatry Neurosci.* 33:54–63.
- Zhang QG, Wang R, Tang H, Dong Y, Chan A, Sareddy GR, Vadlamudi RK, Brann DW. 2014. Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus. *Mol Cell Endocrinol.* 389:84–91.
- Zhang W, Koerner IP, Noppens R, Grafe M, Tsai HJ, Morisseau C, Luria A, Hammock BD, Falck JR, Alkayed NJ. 2007. Soluble epoxide hydrolase: a novel therapeutic target in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27:1931–1940.
- Zimatkin SM, Pronko SP, Vasiliou V, Gonzalez FJ, Deitrich RA. 2006. Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcohol Clin Exp Res.* 30:1500–1505.



## Role of NF- $\kappa$ B in cytochrome P450 epoxygenases down-regulation during an inflammatory process in astrocytes

Cynthia Navarro-Mabarak<sup>a</sup>, Irma Beatriz Mitre-Aguilar<sup>b</sup>, Rafael Camacho-Carranza<sup>a,c</sup>,  
Clorinda Arias<sup>a</sup>, Alejandro Zentella-Dehesa<sup>a,b</sup>, Jesús Javier Espinosa-Aguirre<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Av. Vasco de Quiroga N° 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Tlalpan, CP.14080, Ciudad de México, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Cytochrome P450  
NF- $\kappa$ B  
Epoxygenase  
Inflammation  
Astrocytes

### ABSTRACT

Cytochrome P450 (CYP) epoxygenases and their metabolic products, epoxyeicosatrienoic acids (EETs), have been proposed as important therapeutic targets in the brain. However, CYP expression can be modified by the presence of diverse pro-inflammatory cytokines and the subsequent activation of the NF- $\kappa$ B pathway. It has been indicated that CYP epoxygenases are down-regulated by inflammation in the heart, kidney and liver. However, up to this point, there has been no evidence regarding regulation of CYP epoxygenases during inflammation in the brain. Therefore, in order to explore the effects of inflammation and NF- $\kappa$ B activation in CYP2J3 and CYP2C11 regulation, rat primary astrocytes cultures were treated with LPS with and without IMD-0354 (selective NF- $\kappa$ B inhibitor). *Cyp2j3* and *Cyp2c11* mRNA expression was determined by qRT-PCR; protein expression was determined by immunofluorescence and by Western Blot and total epoxygenase activity was determined by the quantification of EETs by ELISA. NF- $\kappa$ B binding sites in *Cyp2j3* and *Cyp2c11* promoter regions were bioinformatically predicted and Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) were performed to determine if each hypothetic response element was able to bind NF- $\kappa$ B complexes. Results shown that LPS treatment is able to down-regulate astrocyte CYP2J3 and CYP2C11 mRNA, protein and activity. Additionally, we have identified NF- $\kappa$ B as the transcription factor involved in this regulation.

### 1. Introduction

Cytochrome P450 (CYP) is a group of related enzymes highly conserved in nature. In humans, 57 CYP genes have been found, and research on the endogenous role of these enzymes continues. CYP enzymes metabolize approximately 75% of known drugs and promote their elimination from the body. However, CYP enzymes can metabolize a wide variety of endogenous substrates (cholesterol, hormones, fatty acids) (Dutheil et al. 2008) and they are involved in several important metabolic pathways, even in the brain, where they have been proposed as a therapeutic target for neurodegenerative diseases (Navarro-Mabarak et al. 2018).

CYP epoxygenases mediate the oxidation of the arachidonic acid (AA) to epoxyeicosatrienoic acids (EETs). The CYP2C and 2J sub-families are the CYP enzymes with the highest epoxygenase activity,

although other CYP isoforms, including CYP1A, 2B, and 2E, also mediate epoxidation reactions, albeit to a lesser extent (Capdevila and Falck, 2000). CYP epoxygenases add one oxygen atom to one of the four AA double bonds, resulting in the formation of four regioisomeric acids that are named according to the number corresponding to the carbons involved in the epoxide (5,6-, 8,9-, 11,12-, and 14,15-EET). The EETs can be subsequently hydrolyzed by the soluble epoxide hydrolase enzyme (sEH) into metabolites with lower biological activity, the dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs) (Stables and Gilroy, 2011; Morisseau and Hammock, 2013). In the central nervous system (CNS), the expression of CYP epoxygenases and sEH has been characterized in the brain and its associated vasculature (Carver et al. 2014; Dutheil et al. 2009), as well as in specific cell types such as astrocytes (Liu and Alkayed, 2005; Rawal et al. 2009) and neurons (Ruparel et al. 2012). EETs display diverse biological properties, including cell proliferation,

\* Corresponding author. Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Avenida Universidad 3000, Ciudad de México, C.P. 04510, Mexico.

E-mail address: [jjea@biomedicas.unam.mx](mailto:jjea@biomedicas.unam.mx) (J.J. Espinosa-Aguirre).

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104499>

Received 3 April 2019; Received in revised form 9 June 2019; Accepted 1 July 2019

Available online 02 July 2019

0197-0186/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

migration, angiogenesis, and vasodilation in vascular endothelial tissue (where they have mostly been studied) (Spector and Norris, 2007). It has also been reported that EETs have potent anti-inflammatory activity, mediated primarily by inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway, either through inhibition of IKK (I $\kappa$ B kinase) complex activity or by the activation of nuclear receptors PPAR- $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ ) and PPAR- $\gamma$  (Fang et al. 2005, 2006; Node et al. 1999). In addition, EETs inhibit the transcription of cyclooxygenase-2 (COX-2), a feature that has been shown to have synergistic anti-inflammatory properties when combined with other known anti-inflammatory agents (Inceoglu et al. 2008; Schmelzer et al. 2006; Liu et al. 2010). In the brain, it has been demonstrated that the EETs can improve the neuroinflammation generated in models that simulate both hemorrhagic and ischemic cerebrovascular events (Koerner et al. 2008; Zhang et al. 2007) or traumatic brain injury (Hung et al., 2017). The sEH inhibition or the CYP epoxygenases overexpression (and the subsequent increase in EETs levels), has demonstrated to be neuroprotective, as it increases cell viability, reduces neuronal apoptosis and enhances neurite outgrowth, synaptic neurotransmission and plasticity (Li et al. 2018; Wang et al. 2018; Wu et al. 2015). Therefore, CYP epoxygenases and sEH have acquired increasing attention as therapeutic targets for neurodegenerative diseases (Navarro-Mabarak et al. 2018), where EETs have demonstrated to counteract many of the etiological characteristics of Parkinson's (Lakkappa et al. 2016, 2018, 2019) and Alzheimer's disease (Sarkar et al. 2014).

However, although EETs are now considered important modulators of inflammation, it has been reported that CYP expression, protein levels, and activity all change with alterations in the levels of pro-inflammatory cytokines (Abdel-Razzak et al. 1993; Nicholson & Renton 2001, 2002; Aitken and Morgan, 2007). It is well known that pro-inflammatory cytokines activate the NF- $\kappa$ B pathway (Baldwin, 1996; Minogue et al. 2012; Schütze et al. 1995), and it has been demonstrated that cytokine-dependent CYP regulation is due to NF- $\kappa$ B activation (Morgan, 2001; Ke et al. 2001; Gu et al. 2006; Iber et al. 2000; Bell and Strobel, 2012). The NF- $\kappa$ B transcription factor can regulate CYP enzymes at different levels by binding directly to response elements in the promoter region of their genes, through mutual repression of some nuclear receptors involved in CYP regulation, and by affecting CYP protein stability (Zordoky and El-Kadi, 2009). Anwar and colleagues have reported that the CYP epoxygenases 2C11 and 2J3 are down-regulated in the heart, kidney, and liver during a systemic inflammatory process in rat (Anwar-mohamed et al. 2010). However, the response of CYPs to inflammation depends on the evaluated organ or cell type. For example, CYP2E1 expression and protein levels are decreased in the heart and liver during a systemic inflammatory process (Anwar-mohamed et al. 2010). But, in the brain, CYP2E1 is induced *in vivo* during an inflammatory ischemic injury and *in vitro* by LPS or IL-1 $\beta$  administration to astrocytes (Tindberg et al. 1996; Kelicen and Tindberg, 2004). To date, there is no evidence that demonstrates the regulation of CYP epoxygenases during an inflammatory process in the brain. Therefore, due to the relevance that these enzymes have acquired in the brain, the aim of this work was to determine whether an inflammatory process and the activation of NF- $\kappa$ B pathway is able to modify CYP2J3 and CYP2C11 expression, protein levels and activity in astrocytes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Eagle's Basal Medium (BME), Glucose, Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* 0127: B8, IMD-0354 [N-(3,5-bis-trifluoromethylphenyl)-5-chloro-2-hydroxy-benzamide], and Poly (2'-deoxyinosinic-2'-deoxycytidylic acid) sodium salt (Poly dI dC) (SIGMA-Aldrich). Glutamine, Penicillin-Streptomycin, and Trypsin inhibitor (Gibco). Fetal Bovine Serum (FBS) (Byproducts). Chicken anti-gial fibrillary

acidic protein (GFAP) polyclonal antibody and donkey anti-chicken IgG biotin-SP-conjugated antibody (Merck Millipore). Mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) monoclonal antibody (GeneTex). Rat TNF- $\alpha$  ELISA kit (PIERCE). 11,12-EET/DHET ELISA kit and mouse monoclonal anti-CYP2C11 antibody (Detroit R&D). ECL prime Western Blotting detection reagent (General Electric-Amersham). Deoxyribonuclease I (DNase), Oligo (dT), Ribonuclease inhibitor (RNase OUT), Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) and goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen Life Technologies). TRIzol (Ambion Life Technologies). TaqMan Multiplex Master Mix (Applied Biosystems). NF- $\kappa$ B consensus Gel Shift Oligonucleotide, NF- $\kappa$ B consensus mutated Gel Shift Oligonucleotide, rabbit polyclonal anti-NF- $\kappa$ B p65 and mouse monoclonal anti-CYP2J2 antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Texas Red Avidin D (VECTOR Laboratories).

### 2.2. Primary astrocytes culture

The protocol for the use and handling of all the animals in this study was approved by the local Committee for Animal care (ID: 249) of the Biomedical Research Institute at the National Autonomous University of Mexico. The astrocytes were isolated from the cortex of 2-day-old male Wistar rats obtained from the Animal care unit, as described by Moran and Patel (1989) with some modifications (Moran and Patel, 1989). Each culture was derived from the cells pooled from four rat cortices. In brief, the cortices were isolated and the meninges and blood vessels were removed. The cortices were cut into small pieces and digested in 0.25 mg/ml trypsin at 37 °C for 8 min. Digestion was stopped with 1 mg/ml Trypsin inhibitor in the presence of 0.003% DNase at room temperature. The tissue was dissociated with a pipette and filtered in mesh. After centrifugation, the cells were diluted with fresh medium. Culture medium consisted of BME supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine, 750 mg glucose, 50 U/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml streptomycin. Astrocytes were grown in a humidified 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> tissue-culture incubator until they reached 90–95% confluency (at approximately 10 days of incubation), state where contact inhibition prevents further cell division (Lange et al. 2012). The culture medium was replaced with fresh medium every third day. To confirm the predominance of astrocytes in the culture, the percentage of GFAP-positive cells was determined by immunofluorescence. We found that astrocytes were > 99% of the cells present in the culture as no microglial cells were found by Iba-1 staining Supplementary Fig. 1).

### 2.3. Immunofluorescence

Astrocytes were grown on glass coverslips until they reached 90% confluency in 12-well plates. After treatment, the medium was removed and the cells were washed once with cold phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 1% paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffer (PB) for 10 min at 4 °C, and washed three times with 0.1 MPB/0.3% Triton X-100. The cells were permeabilized with the wash solution for 10 min at room temperature in agitation and then blocked with 0.1 MPB/0.3% Triton X-100/10% FBS for 2 h (at room temperature) or overnight (at 4 °C). Primary antibodies were prepared in the blocking solution (anti GFAP 1:1000; anti Iba-1 1:1000; anti CYP2C11 1:1000; anti CYP2J3 1:500) and the cells were incubated with them overnight at 4 °C in agitation. Then, the coverslips were washed three times with 0.1 MPB/0.3% Triton X-100 and incubated with the corresponding secondary antibody (1:2500). Coverslips were then analyzed with an Olympus Disk-Spinning Unit (DSU) IX2 microscope. Four different experiments were performed (n = 4) and the images were obtained.

### 2.4. Astrocytes treatment

The culture medium was replaced with fresh medium 18 h before

treatments. Cells were treated with 100 ng/ml LPS (mRNA, protein and EETs determination); 100, 200, 400, and 800 ng/ml LPS (immunofluorescence and protein determination) or 500 ng/ml LPS (EMSA). The concentrations used of LPS were within the lower range of the concentrations used in previous works (Tindberg et al. 1996; Nicholson and Renton, 1999, 2002; Kelicen and Tindberg, 2004). The NF- $\kappa$ B specific inhibitor IMD-0354 was concurrently added to a final concentration of 1 ng/ml when indicated. It has been demonstrated that IMD-0354 inhibits the phosphorylation of I $\kappa$ B and thus finally inhibits the phosphorylation of NF- $\kappa$ B and its translocation into the nucleus (Onai et al. 2004; Kanduri et al. 2011). Furthermore, NF- $\kappa$ B downstream regulated genes has been proved to be affected by IMD-0354 inhibition, like pro-inflammatory cytokines production (Sugita et al. 2009; Ogawa et al. 2011; Onai et al. 2004).

## 2.5. TNF- $\alpha$ quantification

TNF- $\alpha$  was determined from the supernatant of cultured astrocytes treated with 100 ng/ml LPS at 6, 12, and 24 h after treatment. The supernatant was recovered and centrifuged to remove any cell fraction. The quantification was performed by ELISA with a commercial kit. The procedure was performed according to the manufacturer's specifications. Concentrations were determined from four different cultures (n = 4). The absorbance was read at 450 nm. The concentrations were calculated from a standard curve.

## 2.6. RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was obtained from the culture plates using TRIzol reagent, in accordance with the manufacturer's instructions. The RNA was quantified spectrophotometrically at 260 nm. The purity of the samples was determined by the spectrophotometric ratio  $A_{260}/A_{280}$  (ratios > 1.85) and the integrity was confirmed by denaturing electrophoresis of the samples and by observation of them with ethidium bromide. Thereafter, cDNA was obtained from 1  $\mu$ g of total RNA by reverse transcription using the M-MLV RT, according to the manufacturer's specifications.

## 2.7. Quantification of mRNA expression by qRT-PCR

Quantitative analysis of CYP mRNA expression was performed by real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). Commercial TaqMan gene expression primers (Applied Biosystems) were used to detect *Cyp2j3* (Rn00598500), *Cyp2c11* (Rn01502203), and *GAPDH* (Rn99999916). *GAPDH* was selected as the housekeeping gene because its expression remained constant under our experimental conditions (Supplementary Fig. 2). RT-PCR was performed with a Corbett Rotor-Gene 6000 (QIAGEN). For the amplification, the reactions were incubated at 55 °C for 2 min, and then at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s plus 1 min at 60 °C. All reactions were performed in triplicate, with the cDNA obtained from four different experiments (n = 4). The expression levels were calculated by  $\Delta\Delta$ CT mathematical algorithm, using the Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7. The results are shown as the expression levels of *Cyp2j3* and *Cyp2c11* in relation to *GAPDH*  $\pm$  SD, taking as calibrator the control for each evaluated time.

## 2.8. Protein immunodetection by Western Blot

After 24 h of LPS and LPS + IMD-0354 treatments, the medium was removed and the cells were washed once (2 ml) and scraped for recovery with PBS 1X. The suspension was centrifuged and the pellet was disintegrated with extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) of the NP40 detergent and 0.5% (w/v) of sodium deoxycholate). The homogenate was then sonicated in 3 cycles of 10 s, 3 times, always in ice. The amount of total protein in the sample was quantified by the Bradford method. Sixty micrograms of total

protein were separated using 11% SDS-PAGE and were transferred to 0.45 mm nitrocellulose sheets. The nitrocellulose membranes were blocked for 2 h with 5% albumin in 0.3% TBS-Tween at room temperature. Thereafter the membranes were incubated with the corresponding primary antibodies (anti CYP2J2 1:500; anti CYP2C11 1:500; anti GAPDH 1:5000) overnight at 4 °C. The membranes were then washed three times with 0.3% TBS-Tween. The corresponding secondary antibody was incubated for 1 h at room temperature (1:5000) and the membranes were then washed two times with 0.3% TBS-Tween and one time with TBS. The chemiluminescence reaction was performed with ECL prime Western Blotting detection reagent and the resulting images were obtained with a Kodak GEL Logic 1500 imaging system. The relative quantification was carried out determining band intensities with ImageJ software. Protein levels were determined from three independent experiments (n = 3).

## 2.9. 11,12-EET + 11,12-DHET determination

To determine CYP epoxygenase activity, 11,12-EET and its hydrolyzed product, 11,12-DHET, were measured from the cultured astrocytes using a commercial ELISA kit according to the manufacturer's specifications. Briefly, after 24 h of treatment, the medium was removed and the cells were washed once with PBS/0.1 mM TPP (triphenylphosphine). Cells were scraped, recovered, and sonicated in this buffer. Once sonicated, the homogenates were acidified with acetic acid to a pH of 3–4. Then, three extractions with ethyl acetate were performed on the acid homogenates, thereby recovering the organic phase each time, each of which were stored together. The pooled ethyl acetate extraction was evaporated until it was fully dried up under nitrogen gas, and the dried residue was then dissolved in 20  $\mu$ l of ethanol. In order to change EETs to DHETs, an acidic hydrolysis was performed by adding 20  $\mu$ l of acetic acid during 18 h at room temperature. After the reaction, 60  $\mu$ l of water was added and the samples were extracted three times with equal volume of ethyl acetate. The pooled ethyl acetate extract was evaporated until it was fully dried up under nitrogen gas, and the dried residue was then dissolved in 30  $\mu$ l of ethanol. To prepare a stock solution, each sample was diluted with 90  $\mu$ l of TBS 10X to obtain a final volume of 120  $\mu$ l. To perform the ELISA, each sample was diluted 20X. Total epoxygenase activity from three independent experiments was measured (n = 3).

## 2.10. Nuclear cell extracts

Nuclear extracts were obtained as originally described (Dignam et al. 1983) with some modifications (López-Bojórquez et al. 2004; Blancas-Flores et al. 2012). After treatment, astrocytes were washed twice with cold PBS, scraped, and centrifuged at 850  $\times$ g for 5 min to obtain a pellet. The cell pellet was frozen in a dry ice/acetone bath for 3 min. After freezing, the cells were broken by allowing them to thaw in hypotonic buffer (10 mM Hepes, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 7.9) for 10 min at 4 °C. Nuclei and cytoplasm were separated by centrifugation at 1,160  $\times$ g. The nuclear fraction was resuspended in hypertonic buffer (20 mM Hepes, 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% v/v glycerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9), and maintained in vortex agitation for 30 min at 4 °C. The suspension was centrifuged at 18,600  $\times$ g for 20 min at 4 °C. The supernatants were collected and the protein content in them was determined by the Bradford assay. Supernatant aliquots were stored at -70 °C until they were used.

## 2.11. Database sequence analysis

A search for putative NF- $\kappa$ B binding sites within the *Cyp2j3* and *Cyp2c11* promoter region was conducted. The search was carried out with AliBaba 2.1 free software (BIOBASE) using 4500 base pair upstream of ATG start site.



**Table 1**  
Single stranded sense and antisense oligonucleotides used for EMSA assay.

| Identifier            | 5' Sense sequence 3'  | 5' Antisense sequence 3'        |
|-----------------------|---|---------------------------------|
| 2C11 1                | AGTCACAGGGAATTTCCAGGC   | GCCTGGGAAATTCCTGTGACT           |
| 2C11 2                | AGTTGAGGGGAGACTCCAGGC   | GCCTGGGAGTCTCCCTCAACT           |
| 2C11 3                | AGTTGAGTGGAAATCCCTCAGGC   | GCCTGAGGGATTCCACTCAACT          |
| 2C11 4                | AGTTGAGCGGAAATCCAGGC  | GCCTGGGAAATTTCCGCTCAACT         |
| 2J3 1                 | AGTTAGAGGGACTTCTCAGGC   | GCCTGAGGAAGTCCCTCTAACT          |
| 2J3 2                 | AGTTGAGAGAAATTTCCAGGC   | GCCTGGGAAATTTCTCTCAACT          |
| 2J3 3                 | AGTTGAGGGAAATCCAAACAGGC   | GCCTGTTGGATTCCCTCAACT           |
| 2J3 4                 | AGTTGAGAGGAGTCTCCAGGC   | GCCTGGGAGACTCTCTCAACT           |
| Consensus             | AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC   | Supplied as double-stranded DNA |
| Consensus mut<br>sox2 | AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC<br>AACTGCACATGGGTGTGTGCAAACCGT (Martínez-Ramírez et al. 2017) | Supplied as double-stranded DNA |

### 2.12. Oligonucleotide labeling with $\gamma^{32}$ P-ATP

Single stranded oligonucleotides were constructed with 22 bases containing the predicted NF- $\kappa$ B binding sequences (Invitrogen Life Technologies) (Table 1; Fig. 5). Single stranded sense and antisense oligonucleotides were aligned at 65 °C and were kept at room temperature overnight (approx. 16 h). Twenty nanograms (20 ng) of the double stranded oligonucleotides were labeled with  $\gamma^{32}$ P-ATP. The labeling reaction was carried by a T4 polynucleotide kinase (Thermo Scientific) in the presence of the 10x reaction buffer A, incubating at 37 °C for 30 min and stopping the reaction by heating it at 65 °C for 15 min followed by the addition of 30  $\mu$ l of TBE 1X. The labeled oligonucleotides were stored properly at -70 °C until they were used.

### 2.13. Electrophoretic mobility shift assay

To perform the Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs), 20  $\mu$ g of the nuclear protein from astrocytes stimulated with 500 ng of LPS for 60 min were incubated with 2  $\mu$ l (1 ng) of the corresponding  $\gamma^{32}$ P-labeled oligonucleotide (Table 1). The binding reactions were carried out by incubating on ice for 60 min in the reaction buffer (20 mM HEPES, 50 mM KCl, 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1  $\mu$ g/ml BSA, 1 mg/ml poli-di-dC). The reaction mixture was loaded onto a 6.5% non-denaturing polyacrylamide gel and resolved at 80 V for 1 h and then at 120 V for 50 min. Electrophoresis was carried out in TBE 1X buffer. The gel was dried and the DNA-protein complexes were visualized by exposing the gel to a Storage Phosphor Screen. The screen was read in a Typhoon 9400 *Phosphorimager* and analyzed with ImageQuant software (Molecular Dynamics, San Francisco, CA). NF- $\kappa$ B identity in the DNA-protein complexes was corroborated by supershift assays with a NF- $\kappa$ B anti-p65 antibody. An antibody anti-cIAP1 (cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1), kindly provided by Dr. Alejandro Zentella-Dehesa was used as negative control in the supershift assay. NF- $\kappa$ B consensus commercial oligonucleotide was used as positive binding control. NF- $\kappa$ B consensus mutated commercial oligonucleotide was used as negative binding control. Also competition assays were performed using unlabeled (cold) specific and non-specific oligonucleotides. A putative sox2 binding sequence oligonucleotide (SOX2 (S3)) (Martínez-Ramírez et al. 2017), kindly provided by Dr. Marcela Lizano, was used as negative binding control in the competition assays (Table 1). Four different experiments (n = 4) with the nuclear extracts obtained from four different primary cultures were performed and the images from the EMSAs were obtained to validate reproducibility.

### 2.14. Statistical analysis

Data were analyzed using ANOVA, and Fisher's LSD procedure was used for multiple comparisons. Homogeneity of variance was analyzed using Levene's test. When heterogeneity of variance was detected, Welch's ANOVA was used. Block design was used when necessary. The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . To perform the

statistical analysis, we used SAS 9.0 software.

## 3. Results

### 3.1. LPS treatment induced the production of TNF- $\alpha$ in astrocytes

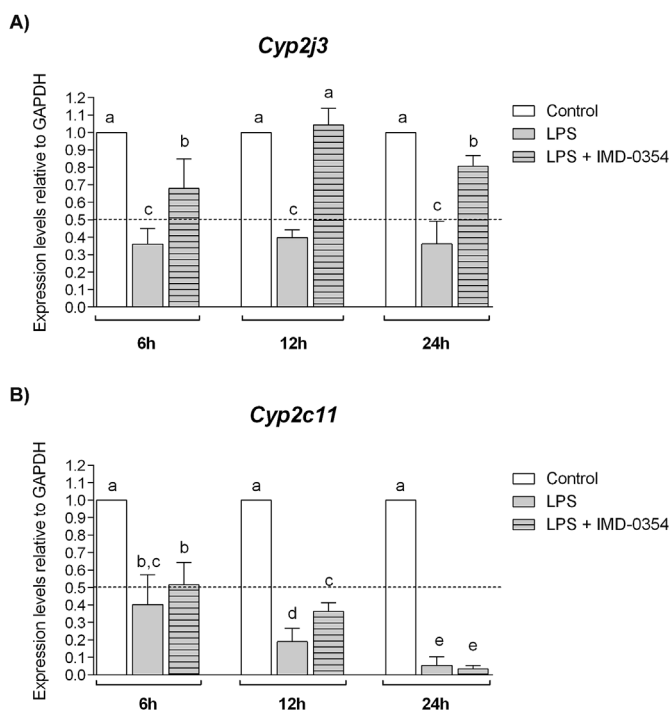
It has been established that stimulation of astrocytes with LPS leads to the production of pro-inflammatory cytokines (Minogue et al. 2012). To corroborate that 100 ng/ml of LPS lead to an inflammatory response in our model, the production of TNF- $\alpha$  was measured from the control supernatants and stimulated cultures using a specific rat TNF- $\alpha$  ELISA kit. We found that stimulated astrocytes produced approximately 25 times more TNF- $\alpha$  than controls ( $p < 0.05$ ; Table 2), reaching a production of approximately 3 ng/ml, as has been seen in previous reports (Minogue et al. 2012).

### 3.2. LPS-induced inflammation caused a decrease in *Cyp2j3* and *Cyp2c11* mRNA expression, and this effect was prevented when NF- $\kappa$ B activity was inhibited

Primary astrocyte cultures were stimulated or not with 100 ng/ml LPS, or 100 ng/ml LPS + 1 ng/ml IMD-0354, and CYP epoxygenase mRNA expression was evaluated at different time points. LPS treatment significantly decreased *Cyp2j3* and *Cyp2c11* expression by more than 50% compared to controls at all evaluated time points ( $p < 0.05$ ; Fig. 1). It is worth noting that LPS treatment decreased *Cyp2c11* expression in a time-dependent manner, reaching a decrease of up to 90% at 24 h (Fig. 1B). LPS treatment triggered the production of pro-inflammatory cytokines like TNF- $\alpha$ , which in turn led to the activation of NF- $\kappa$ B pathway (Minogue et al. 2012). To investigate the role of NF- $\kappa$ B in CYP epoxygenases regulation, astrocytes were co-treated with LPS and IMD-0354. *Cyp2j3* down-regulation was almost completely prevented by the addition of IMD-0354, and reached the control levels at 12 h of treatment ( $p < 0.05$ ; Fig. 1A). On the other hand, *Cyp2c11* down-regulation was only partially prevented by NF- $\kappa$ B inhibition at 6 and 12 h, but it could not be prevented at 24 h of treatment ( $p < 0.05$ ; Fig. 1B).

**Table 2**  
TNF- $\alpha$  production by astrocytes after LPS treatment. TNF- $\alpha$  levels were measured from recovered supernatants using a specific rat TNF- $\alpha$  ELISA kit.\* ( $p < 0.05$ ).

| Treatment     | Time of exposition | [TNF- $\alpha$ ] Mean (pg/ml) | SD   |
|---------------|--------------------|-------------------------------|------|
| Control       | 6 h                | 90                            | 40   |
| 100 ng/ml LPS |                    | 2154*                         | 832  |
| Control       | 12 h               | 135                           | 85   |
| 100 ng/ml LPS |                    | 3131*                         | 1680 |
| Control       | 24 h               | 109                           | 35   |
| 100 ng/ml LPS |                    | 3156*                         | 1557 |



**Fig. 1.** *Cyp2j3* and *Cyp2c11* relative gene expression levels. Astrocytes primary cultures were stimulated or not with LPS and LPS + IMD-0354 (selective NF- $\kappa$ B inhibitor). *Cyp2j3* (A) and *Cyp2c11* (B) relative expression levels were determined by qRT-PCR. Expression levels are shown relative to *GAPDH*  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). Data were analyzed for multiple comparisons using ANOVA, and Fisher's LSD procedure. The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Means with the same letter are not significantly different; means with different letter are significantly different between each other.

### 3.3. CYP2J3 and CYP2C11 protein levels are down-regulated in a LPS-dose-dependent manner

In order to determine whether LPS-mediated *Cyp2j3* and *Cyp2c11* down-regulation could translate into a decrease in CYP epoxygenase protein levels, astrocytes were treated with increasing concentrations of LPS (from 100 to 800 ng/ml) for 24 h. The CYP protein levels were determined by immunofluorescence and by Western Blot. Immunofluorescence images showed that CYP2J3 and CYP2C11 are localized predominantly around the astrocyte nucleus, in accordance to the characteristic localization of CYPs in the endoplasmic reticulum. It could also be observed that CYP2J3 (Fig. 2A) and CYP2C11 (Fig. 3A) signal decreased in an apparent dose-response manner. However, to confirm quantitatively this effect, CYP protein levels were determined by Western Blot (Figs. 2B and 3B). CYP2J3 and CYP2C11 protein levels were significantly decreased from 100 ng/ml onwards of LPS treatment ( $p < 0.05$ ; Figs. 2C and 3C), but only CYP2C11 followed a significant dose-response effect ( $p < 0.05$ ; Fig. 3C). Also, it was found that CYP2C11 protein levels decreased to a greater extent (reaching a maximum decrease of 78%, with a stimulation of 800 ng of LPS) than CYP2J3 protein levels (reaching a maximum decrease of 50% with a stimulation of 800 ng of LPS). These results are in accordance with the effect of LPS observed in the transcription of *Cyp2j3* and *Cyp2c11*, in which *Cyp2c11* mRNA levels were decreased into a greater extent.

### 3.4. Inhibition of NF- $\kappa$ B pathway partially prevented CYP2J3 and CYP2C11 protein levels down-regulation

The CYP2J3 and CYP2C11 protein levels were significantly decreased by LPS treatment (100 ng/ml, 24 h), and this effect was

partially prevented when 1 ng/ml of IMD-0354 was added concurrently ( $p < 0.05$ ; Fig. 4A and B). These results agree with those obtained at the transcription level, mainly for CYP2J3 (Fig. 4A), given that its transcripts almost reached control levels at 6 and 24 h, and reached control levels at 12 h of IMD-0354 concurrent treatment (Fig. 1A). CYP2C11 protein levels down-regulation was also partially prevented when NF- $\kappa$ B pathway was blocked (Fig. 4B), like its mRNA levels at 6 and 12 h of treatment (Fig. 1B).

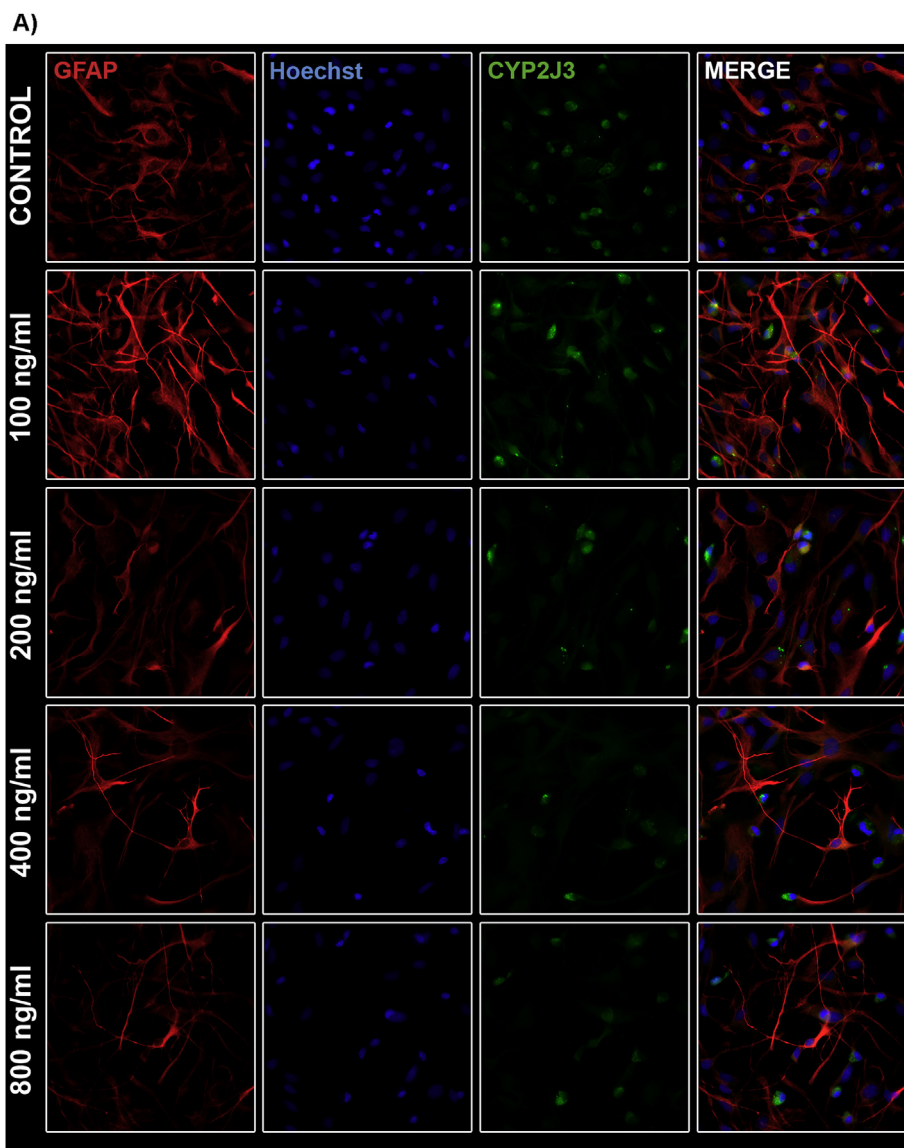
### 3.5. Total epoxygenase activity is decreased after LPS treatment, and this effect was prevented when NF- $\kappa$ B activity was inhibited

NF- $\kappa$ B not only can regulate CYP enzymes at the transcriptional or protein level, but can also interfere ultimately with the activity of the enzyme (Zordoky and El-Kadi, 2009). To investigate whether LPS-induced inflammation could affect total epoxygenase activity, as well as the role of NF- $\kappa$ B in this regulation, astrocytes were treated with 100 ng/ml LPS or LPS + 1 ng/ml IMD-0354 for 24 h, and 11,12-EET + 11,12-DHET was measured from the cultured astrocytes. It was chosen to measure both metabolites due to the fast conversion of EETs to DHETs by sEH. The 11,12-EET has been previously identified as the EET with the greatest anti-inflammatory activity (Node et al. 1999); therefore, it was chosen as the representative epoxide to be quantified. Total epoxygenase activity was significantly decreased after LPS treatment, measured as 11,12-EET + 11,12-DHET levels ( $p < 0.05$ ; Fig. 5). The inhibition of NF- $\kappa$ B activity could completely prevent this effect, as EETs reached control levels when IMD-0354 was concurrently added ( $p < 0.05$ ; Fig. 5), demonstrating that LPS-induced inflammation affects EETs production in astrocytes by the activation of NF- $\kappa$ B pathway.

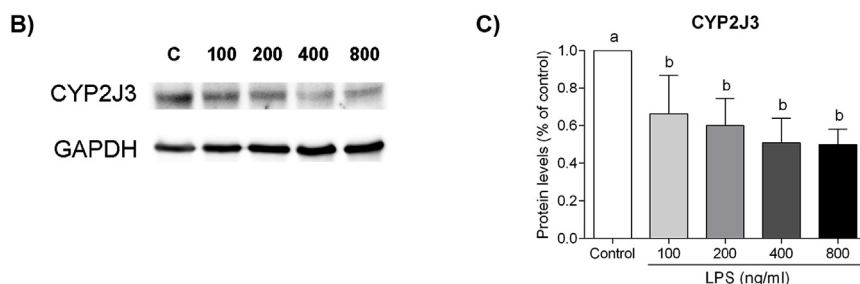
### 3.6. NF- $\kappa$ B is able to bind specifically, but with different affinities, to all the response elements found in the promoter region of *Cyp2j3* and *Cyp2c11*

Four putative NF- $\kappa$ B binding sites were found within *Cyp2j3* and *Cyp2c11* promoter regions using the AliBaba 2.1 software (Table 1; Fig. 6). EMSAs were performed to determine whether NF- $\kappa$ B complexes were able to recognize and bind to the four putative response elements (Fig. 7). Nuclear proteins from astrocytes stimulated with or without LPS were used to perform the binding reactions. Two major DNA-protein complexes were identified when the binding reactions were performed with the consensus sequence, but only the heaviest complex was increased with LPS treatment. Additionally, only the heaviest complex disappeared when the mutated consensus sequence was used in the binding reactions (Fig. 7). Therefore, the heaviest complex was chosen as the complex of interest. NF- $\kappa$ B was able to bind to the four putative response elements of each of the *Cyp2j3* and *Cyp2c11* genes, but with different affinities. CYP2J3 1, CYP2J3 2, CYP2C11 1 and CYP2C11 4 were the sequences with the greatest binding affinity, observed as a thicker and more intense band (Fig. 7). CYP2C11 1 sequence even showed more affinity than the commercial consensus sequence (Fig. 7B, lane 5). In order to determine the identity of NF- $\kappa$ B in the DNA-protein complexes, supershift assays were performed using 300, 600, or 1200 ng of NF- $\kappa$ B anti-p65 antibody. Only the sequences with the greatest binding affinities were tested in the supershift assays (CYP2J3 1, CYP2J3 2, CYP2C11 1 and CYP2C11 4) (Supplementary Fig. 3). The addition of the anti-p65 antibody resulted in a subtle supershift of the bands and a reduction in the DNA-protein complexes, observed as thinner and less intense bands (Supplementary Fig. 3 and Fig. 8, lane 9), demonstrating the identity of NF- $\kappa$ B. To further demonstrate the identity of NF- $\kappa$ B, an antibody against a protein different from NF- $\kappa$ B (anti-cIAP1) was used as negative control (Fig. 8, lane 10), and it was not observed a supershifted band, neither a reduction in the DNA-protein complex.

Additionally, in order to evaluate whether the putative binding sites were able to compete with the consensus commercial sequence to generate the DNA-protein complexes, 100-fold (100X) of cold CYP2C11



**Fig. 2. Effect of LPS treatment in CYP2J3 protein levels in astrocytes.** Astrocytes were treated with increasing concentrations of LPS (from 100 to 800 ng/ml) for 24 h. The CYP protein levels were determined by immunofluorescence (A) and by Western Blot (B). Relative quantification of CYP2J3 protein levels was carried out determining band intensities with ImageJ software (C). CYP protein levels were normalized to GAPDH protein levels and the results are shown as the percentage of control (% of control). Three independent experiments were carried out ( $n = 3$ ). The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Means with the same letter are not significantly different; means with different letter are significantly different between each other.

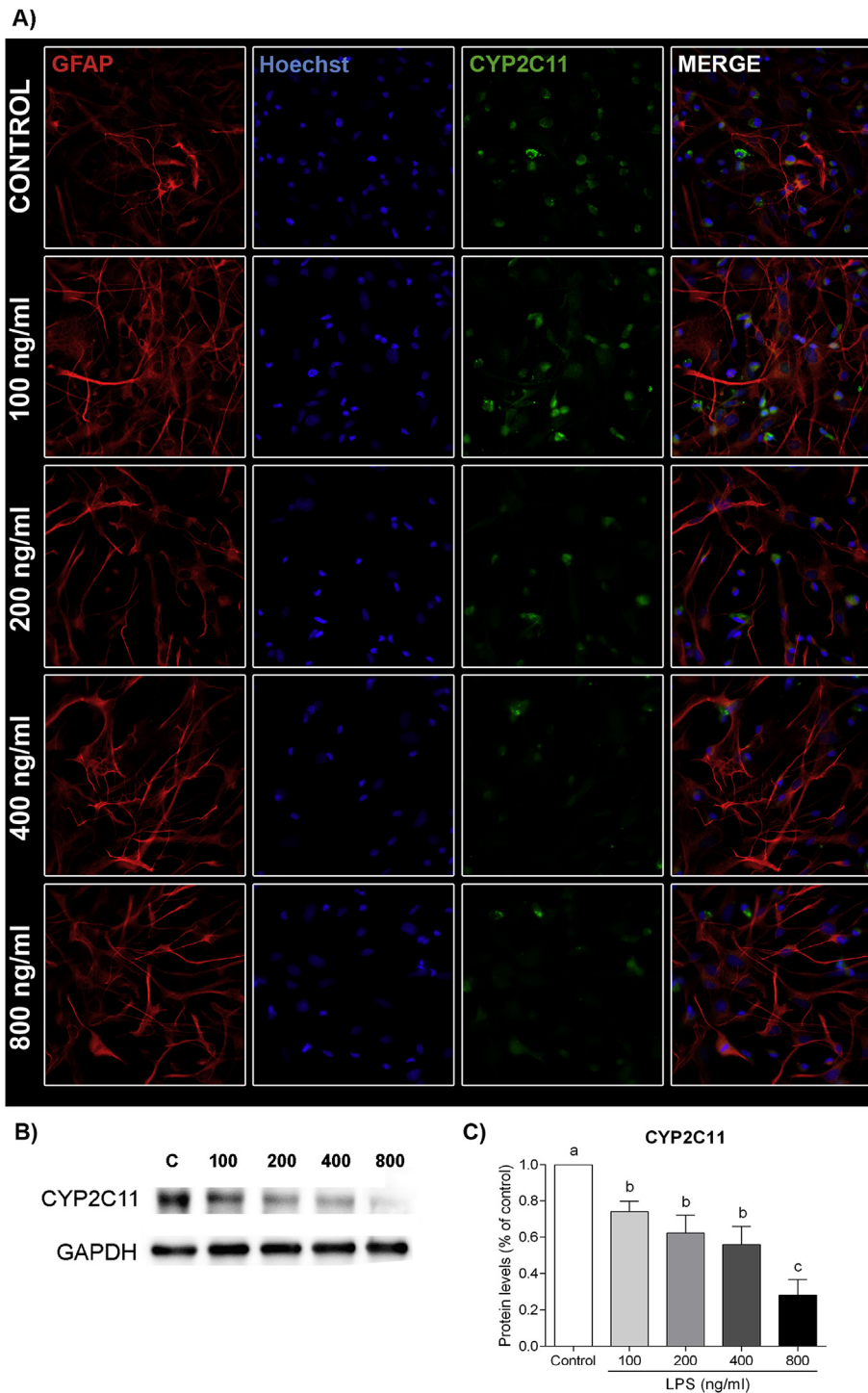


1, CYP2C11 4, CYP2J3 1, and CYP2J3 4 oligonucleotides were added to the binding reactions (Fig. 8). The NF- $\kappa$ B consensus commercial labeled oligonucleotide was completely competed by CYP2C11 1 and CYP2C11 4 sequences, as the DNA-protein complexes were almost totally formed by the cold oligonucleotides, observed as no bands (Fig. 8, lanes 4 and 5). Instead, CYP2J3 1 and CYP2J3 2 sequences competed differentially with the consensus sequence, depending on their affinity. CYP2J3 2 showed a greater affinity for NF- $\kappa$ B (Fig. 7B, lane 6); therefore, its cold oligonucleotide competed more and the band disappeared more (Fig. 8, lane 7). CYP2J3 1 also competed with the consensus sequence, but to a lesser extent; therefore, the band of the complexes formed by the consensus oligonucleotide disappeared less (Fig. 8, lane 6).

#### 4. Discussion

In this study, we demonstrate that inflammation is capable of down-regulate the expression, protein levels and activity of CYP epoxygenases in astrocytes and that NF- $\kappa$ B has an important role in this regulation. It has been previously reported that systemic inflammation is able to down-regulate CYP epoxygenases in heart, liver and kidney (Anwar-mohamed et al. 2010). However, in the brain, there is no evidence regarding the regulation of CYP2C and 2J subfamilies (the enzymes with the highest epoxygenase activity). In this work, we studied the regulation of CYP2J3 and CYP2C11 during an inflammatory process in astrocytes. To accomplish this, primary cultures of rat astrocytes were



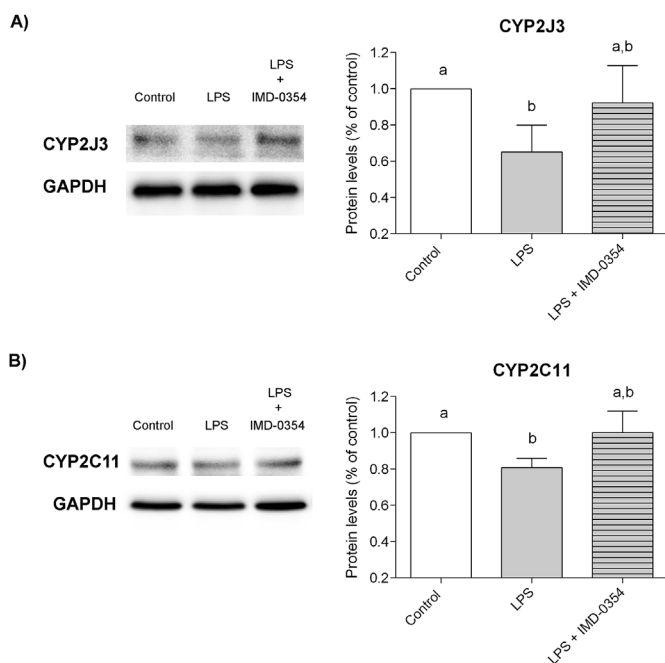


**Fig. 3. Effect of LPS treatment in CYP2C11 protein levels in astrocytes.** Astrocytes were treated with increasing concentrations of LPS (from 100 to 800 ng/ml) for 24 h. The CYP protein levels were determined by immunofluorescence (A) and by Western Blot (B). Relative quantification of CYP2C11 protein levels was carried out determining band intensities with ImageJ software (C). CYP protein levels were normalized to GAPDH protein levels and the results are shown as the percentage of control (% of control). Three independent experiments were carried out ( $n = 3$ ). The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Means with the same letter are not significantly different; means with different letter are significantly different between each other.

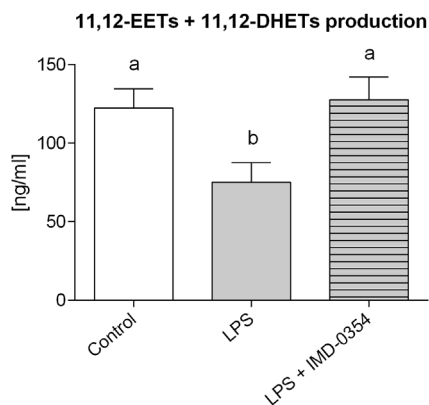
stimulated with LPS. The resulting inflammation was able to down-regulate *Cyp2j3* and *Cyp2c11* expression by more than 50% (Fig. 1). *Cyp2c11* was more susceptible to down-regulation, depending on the exposure time, as has been previously observed in other tissues during systemic inflammation (Anwar-mohamed et al. 2010). Otherwise, *Cyp2j3* exhibited an initial decrease in its mRNA levels, which was maintained regardless of the exposure time. It has been previously reported that *Cyp2j3* expression is regulated differentially by inflammation in the heart, kidney, and liver, and is down-regulated in a time-dependent manner only in the liver (Anwar-mohamed et al. 2010).

It had already been reported that *Cyp2c11* is down-regulated in liver or primary rat hepatocytes during inflammation (Wright and Morgan,

1990), mainly as a result of the presence of pro-inflammatory cytokines like IL-1, IL-6, or TNF- $\alpha$  (Chen et al. 1995; Sewer and Morgan, 1997). Cytokine-dependent down-regulation was then attributed to the activation of NF- $\kappa$ B and its binding to a response element within the transcription start site of *Cyp2c11* (Iber et al. 2000). We searched for NF- $\kappa$ B response elements within 4500 base pairs upstream of the ATG start site of *Cyp2c11* and *Cyp2j3* (Fig. 6). Four different putative binding sites were found for each gene, and it was demonstrated that NF- $\kappa$ B is able to bind specifically to them (Fig. 7). This is the first time that the presence of NF- $\kappa$ B specific binding sites is reported within the promoter of *Cyp2j3*, although other mechanisms of transcriptional regulation have already been described (Murray, 2016). However, the most



**Fig. 4.** Effect of NF- $\kappa$ B selective inhibitor (IMD-0354) in CYP2J3 and CYP2C11 protein levels down-regulation. Astrocytes were treated with LPS or LPS + IMD-0354 for 24 h. The CYP2J3 (A) and CYP2C11 (B) protein levels were determined by Western Blot. CYP protein levels were normalized to GAPDH protein levels and the results are shown as the percentage of control (% of control). Three independent experiments were carried out ( $n = 3$ ). The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Means with the same letter are not significantly different; means with different letter are significantly different between each other.



**Fig. 5.** Total epoxygenase activity determined as the production of 11,12-EET + 11,12-DHET. 11,12-EET and its hydrolyzed product, 11,12-DHET, were measured from the cultured astrocytes stimulated or not with LPS and LPS + IMD-0354 (selective NF- $\kappa$ B inhibitor) using a commercial ELISA kit. Total epoxygenase activity from three independent experiments was measured ( $n = 3$ ). The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Means with the same letter are not significantly different; means with different letter are significantly different between each other.

compelling evidence of transcriptional regulation of CYP epoxygenases by NF- $\kappa$ B is the fact that, when the NF- $\kappa$ B pathway was blocked with IMD-0354, the effect of inflammation on *Cyp2j3* and *Cyp2c11* mRNA levels was diminished, and was observed as significantly increased mRNA levels for both genes (Fig. 1A and B). It is noteworthy that *Cyp2j3* expression reached control levels (at 12 h) when NF- $\kappa$ B was inhibited, demonstrating that, at least during inflammatory processes, NF- $\kappa$ B is a major player in *Cyp2j3* regulation. Otherwise, even when we found that the *Cyp2c11* promoter region contains at least two NF- $\kappa$ B

response elements that bind NF- $\kappa$ B complexes with great affinity (Fig. 7B), the inhibition of NF- $\kappa$ B only partially prevented *Cyp2c11* down-regulation, suggesting that there are additional regulatory mechanisms involved in *Cyp2c11* regulation during inflammation. It had been reported that *Cyp2c11* can be down-regulated by PPAR- $\alpha$  agonists, demonstrating the involvement of PPAR- $\alpha$  in *Cyp2c11* regulation (Corton et al. 1998; Shaban et al. 2005; Večeřa et al. 2011). Additionally, it has also been demonstrated that *Cyp2c11* can be down-regulated via AhR transcription factor and that it could exist a synergistic inhibitory effect with PPAR- $\alpha$  (Shaban et al. 2005).

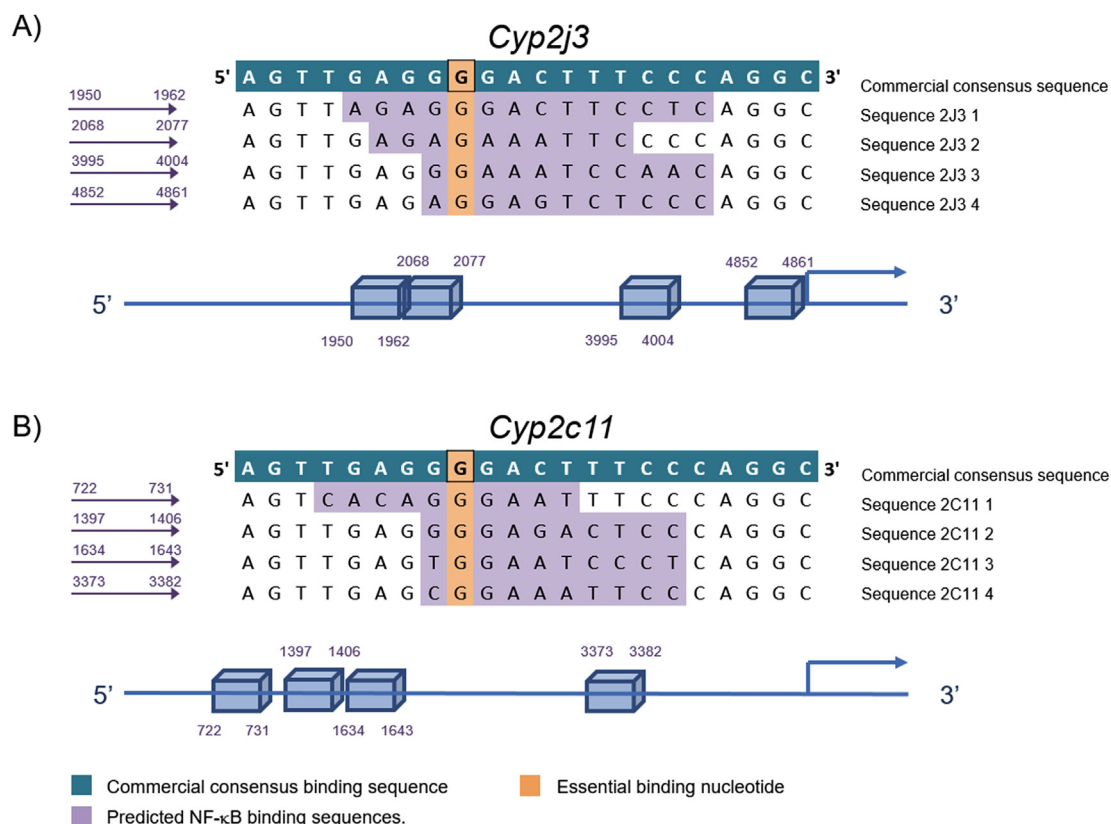
In addition, CYP2J3 and CYP2C11 protein levels were also decreased by LPS-induced inflammation and this effect was partially prevented when NF- $\kappa$ B pathway was blocked. CYP2C11 protein levels decreased in a LPS dose-response manner (Fig. 3), while CYP2J3 protein levels decreased significantly, but only showed a dose-response tendency (Fig. 2). These results are in accordance with what we observed transcriptionally at 24 h, given that *Cyp2j3* mRNA initially decreased by approximately 60%, but did not decrease further over time (Fig. 1A). When IMD-0354 was concurrently added to LPS, both CYP2J3 and CYP2C11 protein levels were increased ( $p < 0.05$ ; Fig. 4), demonstrating the involvement of NF- $\kappa$ B in this regulation. CYP2J3 is apparently regulated by inflammation only to a certain extent, but this extent is almost completely dependent on NF- $\kappa$ B activity, as it can be seen transcriptionally and in its protein levels. Instead, CYP2C11 is regulated greatly by inflammation, but there may be other pathways involved in addition to the NF- $\kappa$ B pathway, like the nuclear receptor PPAR- $\alpha$  (Shaban et al. 2005; Corton et al. 1998) or the transcription factor AhR (Shaban et al. 2005).

We also found that total EET production was significantly decreased by LPS-induced inflammation, and that it reached control levels when NF- $\kappa$ B was inhibited (Fig. 4). This is in accordance with the fact that CYP2C and CYP2J subfamilies are the major contributors to EET production (Capdevila and Falck, 2000). Therefore, a decrease in CYP2C11 and CYP2J3 levels may be greatly reflected in total EET levels. These results confirm that inflammation down-regulates epoxygenases' activity via NF- $\kappa$ B activation in astrocytes. The significant changes that we found in the levels of these metabolites is a solid evidence of a biological response to these processes, even though 11,12-EET + 11,12-DHET determination by ELISA includes the basal amount of DHETs produced by sEH.

It is now well known that CYP enzymes are regulated during inflammation (Zordoky and El-Kadi, 2009; Morgan, 2001; Aitken et al. 2006). However, the significance that this regulation could have in physiological processes that involve CYP-mediated endogenous metabolism has been much overlooked. CYP epoxygenases and EETs have been proposed as important anti-inflammatory therapeutic targets (Liu et al. 2010; Oni-Orisan et al. 2013; Schmelzer et al. 2005). At the same time, it has been demonstrated that systemic inflammation could regulate CYP epoxygenase levels and EET production (Anwar-mohamed et al. 2010). Therefore, it has been proposed that there is a cycle between inflammation and CYP epoxygenase expression/EET production, which promotes the increase of the inflammatory cascade, and that, if it somehow fails, it could promote chronic inflammatory processes (Shahabi et al. 2014). Hence, it is important to study the regulation of CYP epoxygenases in the central nervous system, where chronic inflammatory processes have been related to the etiology of various neurodegenerative diseases (Pimplikar, 2014; Qin et al. 2007; Hong et al. 2016).

## 5. Conclusions

LPS-induced inflammation in astrocytes is able to down-regulate CYP2J3 and CYP2C11 mRNA expression, protein levels and total epoxygenase activity. This effect may be due in part to the production of pro-inflammatory cytokines and the subsequent activation of the NF- $\kappa$ B pathway, since its inhibition by IMD-0354 prevented the observed

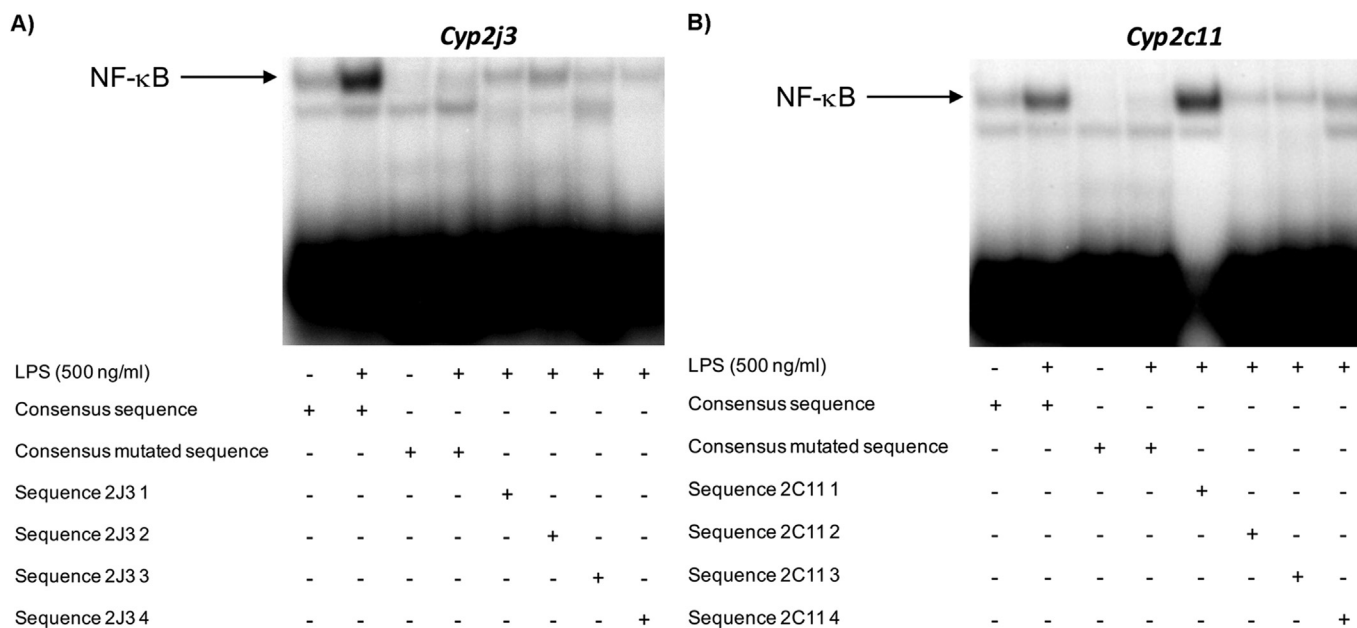


**Fig. 6. Putative NF-κB binding site predictions.** A search for putative NF-κB binding sites within the *Cyp2j3* (A) and *Cyp2c11* (B) promoter region was conducted. The search was carried out with AliBaba 2.1 free software (BIOBASE) using 4500 base pair upstream of ATG start site. Four putative NF-κB binding sites were found for each gene. Single stranded oligonucleotides were constructed with 22 bases containing the predicted NF-κB binding sequences and they were tested by EMSAs.

effects. Additionally, NF-κB is able to bind specifically to at least two response elements in the promoter region of *Cyp2j3* and *Cyp2c11*, thus indicating that this could be the mechanism by which NF-κB carries out the regulation of these genes.

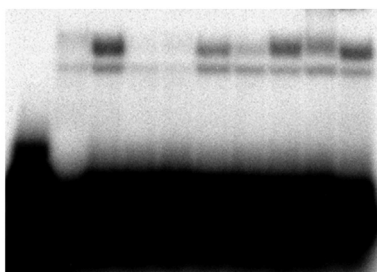
**Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.



**Fig. 7. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs).** EMSAs were performed to determine whether NF-κB complexes were able to recognize and bind to the four putative response elements found within *Cyp2j3* (A) and *Cyp2c11* (B) promoter region. 20 μg of the nuclear protein from astrocytes stimulated with 500 ng of LPS for 60 min were incubated with 2 μl of the corresponding <sup>γ</sup>32-P-labeled oligonucleotide in the binding reactions. NF-κB consensus commercial oligonucleotide was used as positive binding control. NF-κB consensus mutated commercial oligonucleotide was used as negative binding control.





|                             |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Protein (20 µg)             | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| LPS (500 ng/ml)             | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Consensus sequence          | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Cold sequence 2C11 1 (100X) | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cold sequence 2C11 4 (100X) | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cold sequence 2J3 1 (100X)  | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Cold sequence 2J3 2 (100X)  | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| Sequence sox2 (100X)        | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ab anti-p65 (600 ng)        | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Ab anti-cIAP1 (600 ng)      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |

**Fig. 8. Supershift and competition controls.** Supershift and competition assays were performed to specifically assert the DNA-protein interactions. NF-κB anti-p65 antibody was used to confirm NF-κB identity. As negative control anti-cIAP1 antibody was used. Also, competition assays were performed using cold specific and non-specific oligonucleotides. 100X of cold CYP2C11 1, CYP2C11 4, CYP2J3 1, and CYP2J3 4 oligonucleotides were used to compete with the NF-κB consensus commercial labeled oligonucleotide. As negative control, 100X of sox2 oligonucleotide was used.

## Acknowledgments

We would like to thank Sandra Luz Hernández Ojeda for her excellent technical assistance; Tzipe Govezensky for the support in the statistical analysis of this work; Jorge Omar García Rebollos for his technical assistance in the Animal care unit and Miguel Tapia Rodríguez for his technical assistance in the Microscopy unit. Cynthia Navarro-Mabarak was supported by a CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) PhD fellowship No. 356644 to study in the program: Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104499>.

## References

- Abdel-Razzak, Z., Loyer, P., Fautrel, A., Gautier, J.C., Corcos, L., Turlin, B., Beaune, P., Guillouzo, A., 1993. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol. Pharmacol.* 44, 707–715.
- Aitken, A.E., Morgan, E.T., 2007. Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1687–1693.
- Aitken, A.E., Richardson, T.A., Morgan, E.T., 2006. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46, 123–149.
- Anwar-mohamed, A., Zordoky, B.N., Aboutabl, M.E., El-Kadi, A.O., 2010. Alteration of cardiac cytochrome P450-mediated arachidonic acid metabolism in response to lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation. *Pharmacol. Res.* 61, 410–418.
- Baldwin, A.S., 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649–683.
- Bell, J.C., Strobel, H.W., 2012. Regulation of cytochrome P450 4F11 by nuclear transcription factor-κB. *Drug Metab. Dispos.* 40, 205–211.
- Blancas-Flores, G., Alarcón-Aguilar, F.J., García-Macedo, R., et al., 2012. Glycine suppresses TNF-α-induced activation of NF-κB in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 689, 270–277.

- Capdevila, J.H., Falck, J.R., 2000. Biochemical and molecular characteristics of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenase. *Prostag. Other Lipid Mediat.* 62, 271–292.
- Carver, K.A., Lourim, D., Tryba, A.K., Harder, D.R., 2014. Rhythmic expression of cytochrome P450 epoxygenases CYP4x1 and CYP2c11 in the rat brain and vasculature. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307, C989–C998.
- Chen, J.Q., Ström, A., Gustafsson, J.A., Morgan, E.T., 1995. Suppression of the constitutive expression of cytochrome P-450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: comparison with induction of acute-phase genes and demonstration that CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. *Mol. Pharmacol.* 47, 940–947.
- Corton, J.C., Fan, L.Q., Brown, S., Anderson, S.P., Bocos, C., Cattley, R.C., Mode, A., Gustafsson, J.A., 1998. Down-regulation of cytochrome P450 2C family members and positive acute-phase response gene expression by peroxisome proliferator chemicals. *Mol. Pharmacol.* 54, 463–473.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G., 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11, 1475–1489.
- Dutheil, F., Beaune, P., Lorient, M.A., 2008. Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie* 90, 426–436.
- Dutheil, F., Dauchy, S., Diry, M., et al., 2009. Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function. *Drug Metab. Dispos.* 37, 1528–1538.
- Fang, X., Hu, S., Watanabe, T., et al., 2005. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by substituted urea-derived soluble epoxide hydrolase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 260–270.
- Fang, X., Hu, S., Xu, B., et al., 2006. 14,15-Dihydroxyicosatrienoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-α. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H55–H63.
- Gu, X., Ke, S., Liu, D., Sheng, T., Thomas, P.E., Rabson, A.B., Gallo, M.A., Xie, W., Tian, Y., 2006. Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents. *J. Biol. Chem.* 281, 17882–17889.
- Hong, H., Kim, B.S., Im, H.I., 2016. Pathophysiological role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Int. Neurol.* 70, S2–S7.
- Hung, T.H., Shyue, S.K., Wu, C.H., Chen, C.C., et al., 2017. Deletion or inhibition of soluble epoxide hydrolase protects against brain damage and reduces microglia-mediated neuroinflammation in traumatic brain injury. *Oncotarget* 8 (61), 103236–103260. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21139>.
- Iber, H., Chen, Q., Cheng, P.Y., Morgan, E.T., 2000. Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukin-1 mediated by NF-kappaB binding at the transcription start site. *Arch. Biochem. Biophys.* 377, 187–194.
- Inceoglu, B., Jinks, S.L., Ulu, A., et al., 2008. Soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosatrienoic acids modulate two distinct analgesic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18901–18906.
- Kanduri, M., Tobin, G., Aleskog, A., Nilsson, K., Rosenquist, R., 2011. The novel NF-κB inhibitor IMD-0354 induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Canc. J.* 1, e12.
- Ke, S., Rabson, A.B., Germino, J.F., Gallo, M.A., Tian, Y., 2001. Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-α and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 276, 39638–39644.
- Kelicen, P., Tindberg, N., 2004. Lipopolysaccharide induces CYP2E1 in astrocytes through MAP kinase kinase-3 and C/EBPβ and -δ. *J. Biol. Chem.* 279, 15734–15742.
- Koerner, I.P., Zhang, W., Cheng, J., Parker, S., Hurn, P.D., Alkayed, N.J., 2008. Soluble epoxide hydrolase: regulation by estrogen and role in the inflammatory response to cerebral ischemia. *Front. Biosci.* 13, 2833–2841.
- Lakkappa, N., Krishnamurthy, P.T., Hammock, B.D., Velmurugan, D., Bharath, M.M., 2016. Possible role of Epoxyeicosatrienoic acid in prevention of oxidative stress mediated neuroinflammation in Parkinson disorders. *Med. Hypotheses* 93, 161–165.
- Lakkappa, N., Krishnamurthy, P.T., P, M.D., Hammock, B.D., Hwang, S.H., 2019. Soluble epoxide hydrolase inhibitor, APAU, protects dopaminergic neurons against rotenone induced neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 70, 135–145.
- Lakkappa, N., Krishnamurthy, P.T., Yamjala, K., Hwang, S.H., Hammock, B.D., Babu, B., 2018. Evaluation of antiparkinson activity of PTUPB by measuring dopamine and its metabolites in *Drosophila melanogaster*: LC-MS/MS method development. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149, 457–464.
- Lange, S.C., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., Norenberg, M.D., 2012. Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem. Res.* 37, 2569–2588.
- Li, Y., Wu, J., Yu, X., Na, S., Li, K., Yang, Z., Xie, X., Yang, J., Yue, J., 2018. The protective role of brain CYP2J in Parkinson's disease models. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 2917981.
- Liu, J.Y., Yang, J., Inceoglu, B., Qiu, H., Ulu, A., Hwang, S.H., Chiamvimonvat, N., Hammock, B.D., 2010. Inhibition of soluble epoxide hydrolase enhances the anti-inflammatory effects of aspirin and 5-lipoxygenase activation protein inhibitor in a murine model. *Biochem. Pharmacol.* 79, 880–887.
- Liu, M., Alkayed, N.J., 2005. Hypoxic preconditioning and tolerance via hypoxia inducible factor (HIF) 1α-linked induction of P450 2C11 epoxygenase in astrocytes. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 939–948.
- López-Bojórquez, L.N., Arechavala-Velasco, F., Vadillo-Ortega, F., Montes-Sánchez, D., Ventura-Gallegos, J.L., Zentella-Dehesa, A., 2004. NF-kappaB translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-α and IL-1β. *Inflamm. Res.* 53, 567–575.

- Martínez-Ramírez, I., Del-Castillo-Falconi, V., Mitre-Aguilar, I.B., et al., 2017. SOX2 as a new regulator of HPV16 transcription. *Viruses* 9.
- Minogue, A.M., Barrett, J.P., Lynch, M.A., 2012. LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1 $\beta$  in a JAK2-dependent manner. *J. Neuroinflammation* 9, 126.
- Moran, J., Patel, A.J., 1989. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res.* 486, 15–25.
- Morgan, E.T., 2001. Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab. Dispos.* 29, 207–212.
- Morrisseau, C., Hammock, B.D., 2013. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 37–58.
- Murray, M., 2016. CYP2J2 - regulation, function and polymorphism. *Drug Metab. Rev.* 48, 351–368.
- Navarro-Mabarak, C., Camacho-Carranza, R., Espinosa-Aguirre, J.J., 2018. Cytochrome P450 in the central nervous system as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Drug Metab. Rev.* 50, 95–108.
- Nicholson, T.E., Renton, K.W., 1999. Modulation of cytochrome P450 by inflammation in astrocytes. *Brain Res.* 827, 12–18.
- Nicholson, T.E., Renton, K.W., 2001. Role of cytokines in the lipopolysaccharide-evoked depression of cytochrome P450 in the brain and liver. *Biochem. Pharmacol.* 62, 1709–1717.
- Nicholson, T.E., Renton, K.W., 2002. The role of cytokines in the depression of CYP1A activity using cultured astrocytes as an in vitro model of inflammation in the central nervous system. *Drug Metab. Dispos.* 30, 42–46.
- Node, K., Huo, Y., Ruan, X., Yang, B., Spiecker, M., Ley, K., Zeldin, D.C., Liao, J.K., 1999. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* 285, 1276–1279.
- Ogawa, H., Azuma, M., Muto, S., et al., 2011. I $\kappa$ B kinase  $\beta$  inhibitor IMD-0354 suppresses airway remodelling in a Dermatophagoides pteronyssinus-sensitized mouse model of chronic asthma. *Clin. Exp. Allergy* 41, 104–115.
- Onai, Y., Suzuki, J., Kakuta, T., Maejima, Y., Haraguchi, G., Fukasawa, H., Muto, S., Itai, A., Isobe, M., 2004. Inhibition of I $\kappa$ B phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 63, 51–59.
- Oni-Orisan, A., Deng, Y., Schuck, R.N., et al., 2013. Dual modulation of cyclooxygenase and CYP epoxygenase metabolism and acute vascular inflammation in mice. *Prostag. Other Lipid Mediat.* 104–105, 67–73.
- Pimplikar, S.W., 2014. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to a therapeutic target. *J. Clin. Immunol.* 34 (Suppl. 1), S64–S69.
- Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.S., Knapp, D.J., Crews, F.T., 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55, 453–462.
- Rawal, S., Morrisseau, C., Hammock, B.D., Shivachar, A.C., 2009. Differential subcellular distribution and colocalization of the microsomal and soluble epoxide hydrolases in cultured neonatal rat brain cortical astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 87, 218–227.
- Ruparel, S., Henry, M.A., Akopian, A., Patil, M., Zeldin, D.C., Roman, L., Hargreaves, K.M., 2012. Plasticity of cytochrome P450 isozyme expression in rat trigeminal ganglia neurons during inflammation. *Pain* 153, 2031–2039.
- Sarkar, P., Zaja, I., Bienengraeber, M., Rarick, K.R., Terashvili, M., Canfield, S., Falck, J.R., Harder, D.R., 2014. Epoxyeicosatrienoic acids pretreatment improves amyloid  $\beta$ -induced mitochondrial dysfunction in cultured rat hippocampal astrocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 306, H475–H484.
- Schmelzer, K.R., Inceoglu, B., Kubala, L., Kim, I.H., Jinks, S.L., Eiserich, J.P., Hammock, B.D., 2006. Enhancement of antinociception by coadministration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13646–13651.
- Schmelzer, K.R., Kubala, L., Newman, J.W., Kim, I.H., Eiserich, J.P., Hammock, B.D., 2005. Soluble epoxide hydrolase is a therapeutic target for acute inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9772–9777.
- Schütze, S., Wiegmann, K., Machleidt, T., Krönke, M., 1995. TNF-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology* 193, 193–203.
- Sewer, M.B., Morgan, E.T., 1997. Nitric oxide-independent suppression of P450 2C11 expression by interleukin-1beta and endotoxin in primary rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 54, 729–737.
- Shaban, Z., Soliman, M., El-Shazly, S., et al., 2005. AhR and PPARalpha: antagonistic effects on CYP2B and CYP3A, and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica* 35, 51–68.
- Shahabi, P., Siest, G., Visvikis-siest, S., 2014. Influence of inflammation on cardiovascular protective effects of cytochrome P450 epoxygenase-derived epoxyeicosatrienoic acids. *Drug Metab. Rev.* 46, 33–56.
- Spector, A.A., Norris, A.W., 2007. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C996–C1012.
- Stables, M.J., Gilroy, D.W., 2011. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog. Lipid Res.* 50, 35–51.
- Sugita, A., Ogawa, H., Azuma, M., et al., 2009. Antiallergic and anti-inflammatory effects of a novel I kappaB kinase beta inhibitor, IMD-0354, in a mouse model of allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 148, 186–198.
- Tindberg, N., Baldwin, H.A., Cross, A.J., Ingelman-Sundberg, M., 1996. Induction of cytochrome P450 2E1 expression in rat and gerbil astrocytes by inflammatory factors and ischemic injury. *Mol. Pharmacol.* 50, 1065–1072.
- Večeřa, R., Zachařová, A., Orolin, J., Strojil, J., Skottová, N., Anzenbacher, P., 2011. Fenofibrate-induced decrease of expression of CYP2C11 and CYP2C6 in rat. *Biopharm Drug Dispos.* 32, 482–487.
- Wang, L., Luo, G., Zhang, L.F., Geng, H.X., 2018. Neuroprotective effects of epoxyeicosatrienoic acids. *Prostag. Other Lipid Mediat.* 138, 9–14.
- Wright, K., Morgan, E.T., 1990. Transcriptional and post-transcriptional suppression of P450IIC11 and P450IIC12 by inflammation. *FEBS Lett.* 271, 59–61.
- Wu, H.F., Yen, H.J., Huang, C.C., Lee, Y.C., Wu, S.Z., Lee, T.S., Lin, H.C., 2015. Soluble epoxide hydrolase inhibitor enhances synaptic neurotransmission and plasticity in mouse prefrontal cortex. *J. Biomed. Sci.* 22, 94.
- Zhang, W., Koerner, I.P., Noppens, R., et al., 2007. Soluble epoxide hydrolase: a novel therapeutic target in stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1931–1940.
- Zordoky, B.N., El-Kadi, A.O., 2009. Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes. *Curr. Drug Metabol.* 10, 164–178.