



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL CITOCROMO P450
(CYP) POR COMPONENTES DEL JUGO DE TORONJA**

TESIS

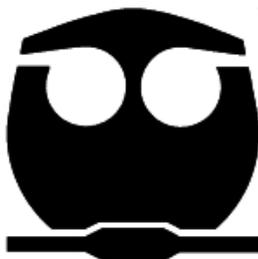
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

SITLALI DEL ROSARIO OLGUÍN REYES

MÉXICO, D. F

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Pedraza Chaverri José

Vocal: Dra. Ibarra Rubio María Elena

Secretario: Dr. Espinosa Aguirre Jesús Javier

1er. Suplente: Profra. Bravo Gómez María Elena

2º. Suplente: Profra. Maldonado Jiménez Perla Deyanira

Sitio en donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNAM

Asesor: Dr. Espinosa Aguirre Jesús Javier

Sustentante: Olguín Reyes Sitlali del Rosario

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. CITOCROMO P450 (CYP)	4
2.1.1 MECANISMO CATALÍTICO DEL CYP	6
2.1.2 INHIBICIÓN DEL CICLO CATALÍTICO	7
2.2 CYP3A4	8
2.3 CYP1A1	9
2.4 CYP1A2	10
2.5 CYP2B6	11
2.6 JUGO DE TORONJA Y SU INTERACCIÓN CON CYP	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS GENERALES	15
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	16
6. MATERIALES Y METODOLOGÍA	16
6.1. INDUCCIÓN DEL CYP1A y CYP2B	16
6.2. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MICROSOMAL	16
6.3. DETERMINACIÓN INMUNOESPECÍFICA DEL CYP1A y CYP2B	17

6.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	17
6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
7. RESULTADOS	
7.1. INMUNODETECCIÓN	20
7.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE Nar SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CYP	22
7.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE BG SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CYP	25
7.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE 6, 7- DIHIDROXIBERGAMOTINA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CYP	28
7.5 CONCENTRACIÓN IHBITORIA 50 (CI ₅₀) DE Nar, BG Y DHB SOBRE CYP	31
8. DISCUSIÓN	33
9. CONCLUSIONES	35
10. PERSPECTIVAS	35
11. APÉNDICE	36
12. RESULTADOS	39

DEDICATORIAS

El presente trabajo se lo dedico con gran amor:

A la persona que sobre todo y pese a mis defectos me ama, mi Padre. Quién con sus sabios consejos me ha guiado en mi corta existencia. Por que la lejanía nos hace estar más juntos y apreciar mucho más aquella palabra y el beso que con tanto cariño nos da por las mañanas. Lo amo papi.

Por supuesto también se lo dedico a usted, la mujer con corazón y alma más fuertes que conozco, y a la vez los más sensibles. Por proteger, cuidar y procurarme siempre, por ser mi mejor amiga, la que verdaderamente me conoce y a la que desafortunadamente, en muchos casos, no puedo mentir. A usted mami, le dedico este trabajo que por su esfuerzo también es suyo.

¡A ustedes monstruos, mis hermanos!, a quienes amo aunque en momentos quiera matar y lo sé, ustedes también a mi.

A ti Doni, la flor de nuestra familia, por ser como eres. Por que has sabido ser la mejor hermana mayor, por aguantarme y sufrir por mi carácter y mi forma de ser. Te quiero.

A ti Ñahñu, por ser el rebelde de la familia, el que nos hace sufrir, por el que hemos llorado incontables veces y por el cual hemos crecido como familia. Por tus buenos consejos y las buenas charlas que como hermanos hemos tenido. Por que eres el mejor hermano que tengo, bueno el único, al cual amo y aprecio tanto.

A ti pequeña no tan pequeña, Nantzi. Por ser la niña alegre, carismática y amigable de la familia. Por quien he tenido que ser hermana mayor, algo que te aseguro no me gusta y por supuesto sé no me resulta mucho, ja. Te quiero y pese a todo espero comprendas ciertas actitudes mías.

A ti Juanita, mi segunda madre, mi hermana, mi prima y amiga, por cuidarnos con amor y procurarnos siempre. Por estar a nuestro lado, apoyarnos incondicionalmente y por esas ricas comidas que nos has preparado incontables ocasiones. Te amo mucho prima y también a tus pequeños.

Por supuesto, esta tesis también está dedicada a la tías que nos apoyado de mil formas.

A la tía Rosa, por ser la matriarca de la familia Reyes y permitir con su siempre entusiasmo la unión de nuestra familia. Por su cariño, amistad, preocupación, apoyo y por supuesto, por los paseos que gracias a usted hemos realizado.

A la familia Reyes, por darme ese carácter alegre que tengo. ¡Los quiero!

A la familia Olgúin, por heredarme su orgullo y carácter obstinado, que en muchas ocasiones me han ayudado. ¡Los quiero a todos!

También dedico este trabajo a aquellos con quienes he compartido muchas risas, comidas, buenos chismes y algo que por supuesto no puede faltar, amistad.

A ti Rosy y a tu familia, por ser como una segunda familia desde que llegamos aquí, por apreciarnos, por querernos y por ser una gran amiga. Por estar siempre conmigo.

A la pequeña Tigger y a ti Patito, por ser mis amigas de ayer, hoy y siempre. Porque a pesar del tiempo y la divergencia de nuestros caminos aún tenemos pista de nosotras. Porque cada vez que nos vemos la alegría no cabe en mí. Porque las quiero.

A ti Chrissi, por ser mi amigo, por escucharme, por preocuparte por mí, porque pese a la distancia siempre estas conmigo en los momentos más importantes de mi vida. TE QUIERO.

A ti Euxodio, por ser mi amigo, por hacerme sufrir las veces que jugamos fucho, por escucharme, por ser una parte muy importante en este proceso.

A ustedes Cyn, Ismael, Lalo, Mariana y Mobarak, a los cuales no puedo mencionar por separado ya que tienen el mismo valor para mí. Por las incontables gorditas, papas y aguas que conmigo han compartido. Por sus múltiples consejos y por toda la ayuda que me han brindado. Por que no concibo mi paso por la universidad sin ustedes. Por tanto, tanto y tanto, que el espacio en estas hojas no sería suficiente para decirles el porque les dedico este trabajo. Mucho, es la mejor palabra que puede describir cuánto los amo ya que no tiene fin.

AGRADECIMIENTOS

Es tanto y a tantos a quienes les tengo que agradecer que éste trabajo y el proceso de licenciatura hayan culminado.

En primer lugar le agradezco a Dios por permitir que todas las personas a quienes a continuación mencionaré hayan sido partícipes de este proceso.

Gracias al amor que une a mis padres, por que sin él no hubiera sido posible mi existencia. Gracias a mis padres por todo su esmero y dedicación en mi educación.

Gracias a Roha, Oscarin, Selene, Mónica, Gaby, Haiddé, Natita, Marisol, Rbkiux, Laurita y todos aquellos que no sólo fueron compañeros de clases sino buenos amigos. Gracias por ser parte de esta etapa tan importante en mi vida.

Le agradezco tanto a usted Dr. J Javier Espinosa Aguirre, porque sin su apoyo y sus consejos esta tesis no estuviera terminada. Gracias por aceptar ser mi guía en este proceso de tesis y en el camino que ahora comienzo. Es usted una gran persona en todo el sentido de la palabra, mi más sincero respeto y admiración.

Definitivamente gracias Mariana, por ser una pieza muy importante durante este proceso de tesis. Gracias por tu ayuda, consejos, amistad y compañía.

Gracias a la compañera del escritorio de enfrente, Anita, por compartir conmigo buenas conversaciones, por tus consejos y apoyo en la redacción de esta tesis.

Gracias a ti Sandy, por ser una maestra para mí, por ayudarme a entender y aprender las técnicas necesarias para la realización de este trabajo. Gracias por ser la mamá de los pollitos (as) del laboratorio. Gracias por ser tan linda y amable.

Gracias al Dr. Rafael Camacho Carranza, por sus críticas y consejos para la presentación de este trabajo. Gracias por compartir con nosotras unas buenas charlas culturales.

También mis más sinceros agradecimientos al grupo del laboratorio C206 del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su apoyo y sus consejos así como la amistad que me han brindado.

Gracias a la Universidad Autónoma de México y a la Facultad de Química por albergarme durante mi preparatoria y carrera universitaria. Gracias por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y más que eso, darme amigos, risas, llantos y dicha.

Un especial agradecimiento al Instituto de Investigaciones Biomédicas por permitir que con el uso de sus instalaciones haya logrado finalizar esta tesis y aún ahora continúe brindándome sus instalaciones para continuar con mi desarrollo profesional.

En definitiva mi paso por esta máxima casa de estudios también estuvo definido por los tres programas que con su apoyo económico hicieron posible una estancia menos complicada.

Le agradezco al programa de becas PRONABES por haberme apoyado durante dos años de mi carrera universitaria.

Le agradezco al Programa Universitario México Nación Multicultural por su apoyo económico así como el reconocimiento que siempre nos dieron como estudiantes pertenecientes a una etnia.

Le agradezco al programa PAPIIT por brindarnos apoyo económico en parte del proceso de realización de esta tesis bajo el proyecto titulado,

1. RESUMEN

El jugo de toronja es ingerido de manera cotidiana por el ser humano y debido a sus conocidos efectos antioxidantes así como alto contenido en fibra y en vitamina C, es recomendado en regímenes dietéticos. Sin embargo, por accidente, en 1989, al realizar un estudio del efecto del etanol sobre Citocromo P450 3A4 (CYP3A4), utilizando al jugo de toronja para enmascarar el sabor del etanol, se descubre que éste tiene efecto inhibitorio sobre CYP3A4.

El CYP3A4 es una isoenzima que forma parte de una superfamilia enzimática conocida como Citocromo P450 (CYP), y que participa en el metabolismo de aproximadamente el 50% de los fármacos conocidos. Al ser inhibido el CYP3A4, estos fármacos son metabolizados ineficientemente con lo cual se incrementa su biodisponibilidad, así como sus efectos secundarios y tóxicos.

Resultados de investigaciones recientes demuestran que la ingesta del jugo de toronja también afecta el metabolismo de compuestos metabolizados por las subfamilias CYP1A y CYP2B. Estas subfamilias se encuentran relacionadas con la activación de compuestos pro-carcinógenos por lo cual surge el interés de evaluar la actividad inhibitoria que algunos componentes del jugo de toronja pudieran tener sobre ellas y así determinar los efectos de las alteraciones del metabolismo de otros xenobióticos.

Entre los compuestos que constituyen al jugo de toronja encontramos a los de tipo furanocumarina (bergamotina (BG), 6,7-dihidroxibergamotina (DHB), y flavonoide (naringina (Nar) y quercetina), entre otros. Dentro de los anteriores resaltan Nar, BG y DHB ya que en estudios previos se ha determinado que la Nar es uno de los componentes mayoritarios del jugo de toronja (174-1472 μM) con actividad inhibitoria sobre el CYP3A4 *in vivo*, aunque no se ha definido si lo hace *in vitro*. La BG y la DHB también inhiben a CYP3A4 pero se encuentran en el jugo de toronja a una concentración menor a Nar (1.0-36.6 μM y 0.22-52.5 μM , respectivamente).

Tomando en cuenta que el jugo de toronja posee actividad inhibitoria sobre enzimas de CYP, se decidió explorar el potencial inhibitorio que sus componentes Nar, BG y DHB tienen sobre isoenzimas importantes como son CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2.

Planteamos que el jugo de toronja posee compuestos que inhiben la actividad de las subfamilias 1A y 2B, del CYP y comprobamos lo anterior con la realización de ensayos de

inhibición de estas enzimas por los compuestos BG, DHB y Nar, mediante la metodología que se menciona a continuación.

Se realizó la obtención de microsomas hepáticos de ratas sometidas a un tratamiento con β -naftoflavona (β -NF) y fenobarbital (FB) para inducir la producción de CYP total, así como de una rata testigo la cual se trató con aceite de maíz. Se comprobó la inducción mediante la técnica de Western Blot con anticuerpos inmunoespecíficos para determinar la presencia de CYP1A y CYP2B en las muestras de microsomas hepáticos de ratas inducidas y testigo. Posteriormente se realizaron ensayos de actividad enzimática para CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 en ausencia y presencia de varias concentraciones de BG, DHB y Nar con la finalidad de observar el posible efecto inhibitorio en función de la concentración.

La BG y la DHB presentan actividad inhibitoria sobre los CYP's estudiados en el siguiente orden: CYP1A1 > CYP2B2 > CYP1A2 > CYP2B1, resultando que DHB es menos potente que BG. Adicionalmente, se observó que la Nar no tiene efecto inhibitorio sobre las isoenzimas trabajadas.

Estos resultados nos permiten sugerir que BG y DHB poseen actividad antigenotóxica ya que presentan la capacidad de inhibir a enzimas involucradas en la activación de compuestos mutagénicos y carcinogénicos.

2. INTRODUCCIÓN

Diariamente las personas nos exponemos a distintos compuestos químicos ajenos a nuestro organismo y que son producidos por el hombre o de origen natural, que están presentes en el ambiente, en los alimentos o en lugares de trabajo. A éstos compuestos se les denomina xenobióticos, palabra que denota aquellas sustancias extrañas al organismo humano que no son utilizables para la producción de energía, construcción de nuevos tejidos, o como mensajeros o cofactores. A muchos de estos compuestos el organismo los reconoce como potencialmente perjudiciales y su primera línea de defensa es eliminarlos. Sin embargo, estos agentes químicos suelen ser lipofílicos y el organismo no los puede eliminar fácilmente, así que lleva a cabo un proceso de transformación en el que los metaboliza y transforma en compuestos hidrofílicos facilitando su excreción. Para ello, posee un sistema enzimático eficiente que disminuye la concentración de los compuestos originales y por lo tanto la exposición a ellos y el riesgo de su acumulación.

El proceso de transformación de los compuestos lipofílicos a polares ocurre en dos distintas fases metabólicas. Durante la fase I, llamada de funcionalización, se realizan una serie de reacciones químicas que comprenden: la hidroxilación aromática, epoxidación, hidroxilación alifática, reacciones de dealquilación, oxidación de nitrógeno y sulfuro, deaminación oxidativa, dehalogenación oxidativa, nitrorreducción, azorreducción, dehalogenación reductiva e hidrólisis (1).

Dentro de las enzimas responsables de estas reacciones están la aldehído deshidrogenasa, azo y nitro-reductasa, alcohol deshidrogenasa, epóxido hidrolasa, monoamino oxidasa, flavin monooxidasa, esterasa no específica y el citocromo P450 (CYP). Este último generalmente realiza la incorporación de un átomo de oxígeno al xenobiótico, generando grupos funcionales como $-OH$. Los metabolitos resultantes no solo son más polares que el compuesto original, sino que son capaces de participar en la fase II del metabolismo, la conjugación, en donde se les agregan sustratos endógenos como ácido glucurónico, aminoácidos y sulfato; una vez conjugados, se forman moléculas altamente hidrofílicas, asegurando su eliminación. Algunas veces está implicada una tercera fase, en la que se lleva a cabo el metabolismo de una gran parte de productos de la fase II, las reacciones de esta fase son catalizadas por las enzimas que participan en las otras dos. Los xenobióticos no necesariamente tienen que pasar por fase I, después a fase II y a fase III para lograr su fácil excreción, esta es una división del metabolismo de xenobióticos hecha para hacer más sencillo su entendimiento. (Fig. 1)

La mayoría de los sistemas enzimáticos que contribuyen al metabolismo de xenobióticos, en ambas fase I y II, están localizados en el retículo endoplásmico y la fracción citosólica de las células. En mamíferos, se encuentran en varios tejidos, particularmente en el hígado.

Fases del metabolismo de xenobióticos

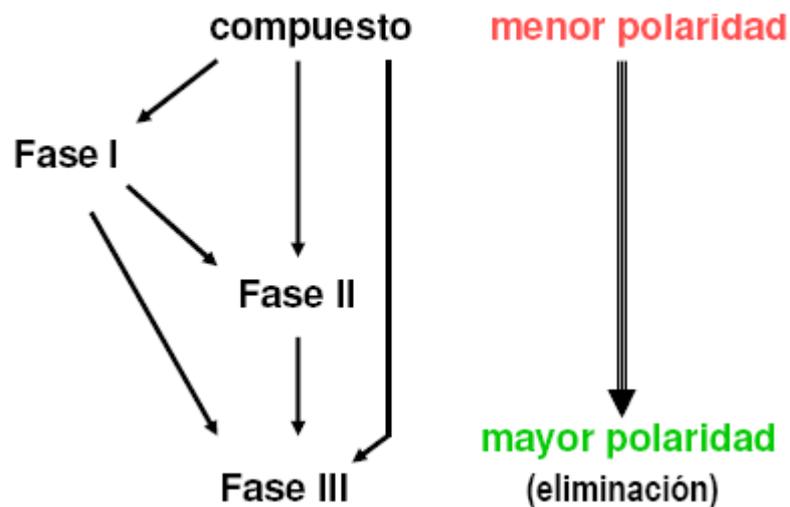


Fig 1 Metabolismo de xenobióticos. Adaptada de Hodgson E. (2)

2.1 CITOCROMO P450 (CYP)

En 1958, por primera vez se detectó espectrofotométricamente al CYP por Klingenberg et al., y con este descubrimiento se abrió una gran ventana en el estudio sobre la naturaleza de las enzimas que se encuentran involucradas en la oxidación de fármacos, alcoholes, procarcinógenos, antioxidantes, solventes orgánicos, anestésicos, pinturas, colorantes, saborizantes, esteroides, pesticidas, hidrocarburos y productos naturales (3, 4)

De las enzimas de fase I, el CYP es una superfamilia de enzimas que se encuentra involucrada en el metabolismo de fármacos, metabolizando a más del 80% de aquellos procesados en fase I, contribuyendo más que cualquier grupo de enzimas en este proceso (5). Adicionalmente, ahora se sabe que CYP juega un papel importante en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos fisiológicamente importantes en mamíferos como vitaminas, esteroides, prostanoides y otros eicosanoides, ácidos grasos y alcaloides.

Por lo anterior, el estudio de CYP ha sido relevante para la investigación en áreas como endocrinología, anestesiología, nutrición, patología, farmacología, carcinogénesis y

toxicología. En las últimas tres, su estudio es importante debido a las oxidaciones de pro-tóxicos a formas reactivas eletrofilicas que causan daño biológico. (5)

Actualmente, en el humano, el sistema de CYP consiste en cerca de 57 isoformas que tienen diferencias de especificidad catalítica y de tejido en el cual se expresan (6). Estas enzimas están agrupadas en familias y subfamilias de acuerdo a su homología en la secuencia de aminoácidos; el sistema de nomenclatura utilizado fue adaptado del propuesto inicialmente por Daniel W. Nebert (7), en el cual los CYP's con 40% o más de identidad en secuencia de aminoácidos son incluidos en la misma familia designadas con un número arábigo, y aquellas con más del 55% de identidad son incluidas en la misma subfamilia, designadas con una letra capital. A los genes individuales se les asigna arbitrariamente un número (8). Las principales familias involucradas en el metabolismo de xenobióticos son CYP1, CYP2 y CYP3 (6).

Los CYPs, en mamíferos, se encuentran en retículo endoplásmico, asociados con la flavoproteína NADPH-P450 reductasa, aunque algunos también se encuentran en mitocondria y membrana plasmática, teniendo generalmente una función de oxidasa (5).

Los CYP's oxidantes de xenobióticos están principalmente en el hígado, y algunos de ellos son expresados exclusivamente en este órgano. Otros son expresados tanto en el hígado como en una gran variedad de tejidos extrahepáticos, algunas veces con mecanismos de regulación diferentes (5).

De los principales CYPs que participan en la oxidación de fármacos encontramos a: CYP3A4, CYP2D6, y CYP2C9 que contribuyen con el 75%; con el 25% restante de fármacos participan las isoformas CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C19 y CYP2E1, fig. 1. (2, 6)

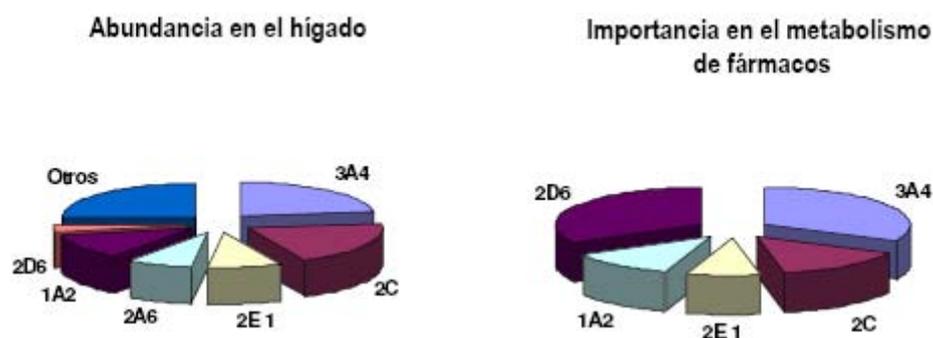
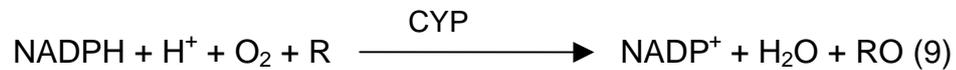


Fig 2. Participación de CYP en el metabolismo de compuestos Adaptado de Hodgson (2)

2.1.1 MECANISMO CATALÍTICO DE CYP

Los CYPs, como ya se mencionó, son hemoproteínas con función de oxidasa y cuya reacción se puede generalizar en la siguiente expresión:



En donde R representa al sustrato y RO el metabolito oxidado. La reactividad del CYP es atribuida al hierro presente en el complejo protoporfirina IX, el cual está unido a la proteína por medio de un puente de hidrógeno de las dos cadenas de propionato y una cisteína tiolada coordinada al hierro, siendo ésta última responsable de la característica de absorción máxima del complejo Fe (II)-CO a 450 nm y factor crítico para la catálisis ya que al ser reemplazada por histidina da por resultado una proteína inactiva, fig 3. (10)

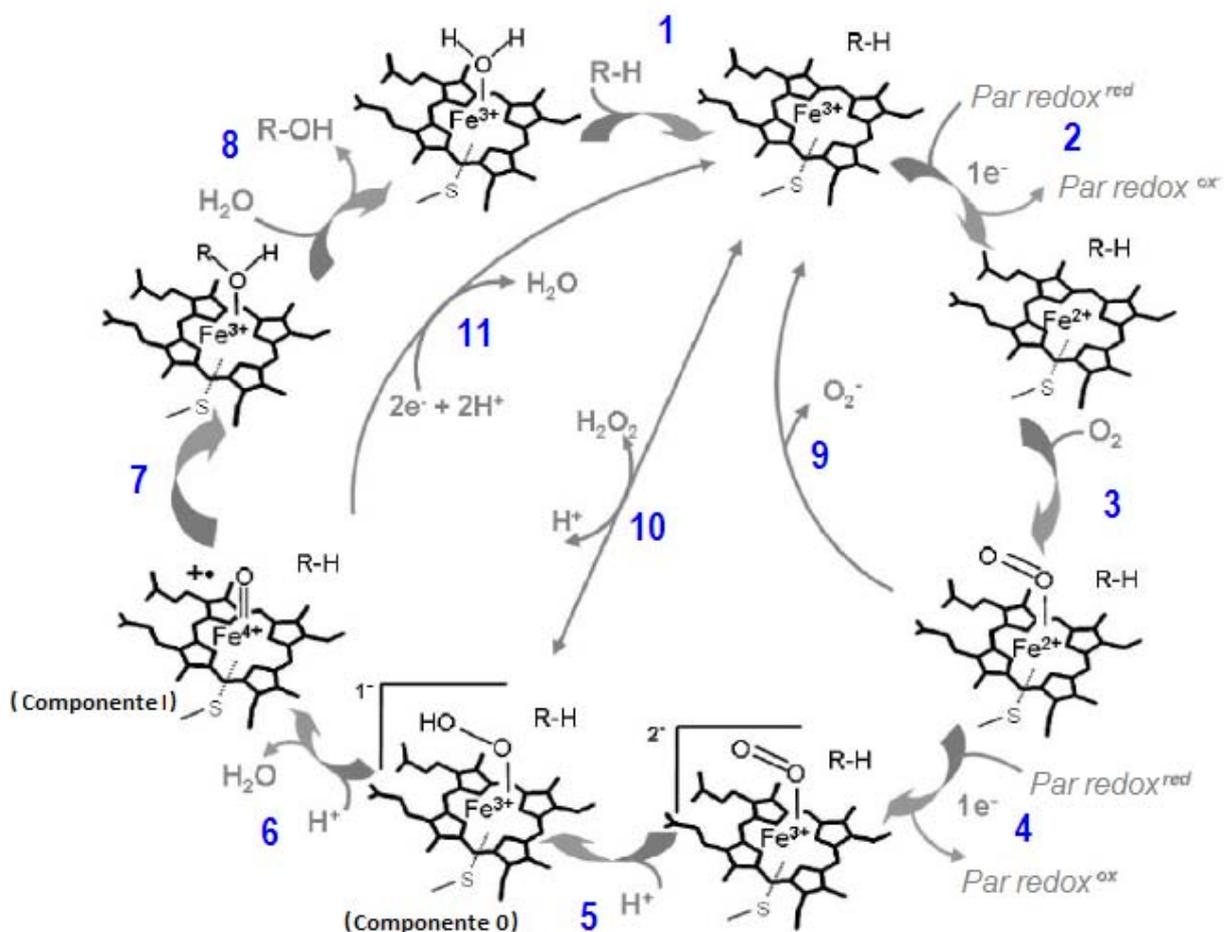


Fig 3. Ciclo catalítico de Citocromo P450. Adaptado de Munro A. (11)

En la figura 3, se muestran las fases intermediarias del ciclo catalítico de CYP que conducen a la hidroxilación del sustrato (R-H). También están representados los diferentes estados de oxidación del hierro en el grupo hemo del CYP. El ligando hemo proximal (cisteína tiolada, indicada con un átomo de azufre, S, ligado al hierro) y el ligando distal (una molécula de agua), están también indicados.

En el primer paso **(1)**, la unión del sustrato conduce al desplazamiento del ligando distal. Esto tiene como efecto, un cambio en el equilibrio del estado espín del hierro del hemo férrico de bajo espín a alto espín lo cual conduce a un potencial de hierro más positivo favoreciendo así la transferencia de electrones del par redox (cofactor), para reducir el hierro hemo a estado ferroso **(2)**. El hemo ferroso une a un oxígeno para formar el intermediario oxo-ferroso (el cual es isoelectrónico con la forma superoxi-férrico) **(3)**. Se desprende el segundo electrón del par redox reduciendo el hierro al estado peroxi-férrico **(4)**. La protonación produce la forma hidroperoxo-férrico (también conocido como compuesto 0) **(5)**. Otra protonación conduce a la escisión del enlace dioxígeno y la producción de una molécula de agua **(6)**. El intermediario remanente sobre el hemo es una especie oxo-ferril (compuesto I) con un radical de porfirina catiónica **(7)**. Probablemente este sea el sustrato oxidante relevante en muchas de las reacciones de CYP. El componente I ataca al sustrato cercano y efectúa su hidroxilación. La salida del producto (R-OH) permite que el agua se vuelva a unir al hierro férrico y completar así el ciclo **(8)**. La especie oxi-ferroso puede no seguir con el ciclo y reformar al CYP-férrico con la producción de peróxido **(9)**. El componente 0 puede no seguir el ciclo y producir peróxido de hidrógeno **(10)**. El componente I puede no seguir con el ciclo y producir agua **(11)**. La ineficacia de las especies para continuar con el ciclo puede ocurrir si, por ejemplo, 1) hay desprendimiento inoportuno de electrones o protones; 2) el sustrato es inapropiado o 3) si se unen al sitio activo sustratos resistentes al ataque oxidativo (11).

2.1.2 INHIBICIÓN DEL CICLO CATALÍTICO

La inhibición del CYP es realizada por dos tipos principales de inhibidores, aquellos que se unen de forma reversible a la enzima y los que lo hacen de forma irreversible. Los inhibidores reversibles interfieren en el ciclo catalítico a través de su unión al hierro del grupo hemo en su forma férrica o ferrosa, o por su coordinación al grupo hemo y unión a la región lipofílica del sitio activo. Este tipo de inhibición es la causa más común del establecimiento de interacciones fármaco-fármaco y su efecto deja de hacerse presente

una vez que el organismo ha eliminado al agente inhibidor. Un ejemplo de este tipo de inhibidores es la cimetidina, la cual presenta la característica de tener afinidad por el hierro del grupo hemo y por la región lipofílica del sitio activo provocando una inhibición fuerte pero reversible (6).

Por su parte, varios de los inhibidores irreversibles, llevan a cabo su acción una vez que han sido metabolizados por uno de los CYP y los metabolitos producidos son los que se unen de forma irreversible a la enzima causando su inhibición, este tipo de inhibición es conocida como inactivación basada en el mecanismo catalítico de la enzima. Existe una gran variedad de agentes que inhiben a CYP mediante este mecanismo, como compuestos sulfurados, halogenados, acetilenos, olefinas y aminas, entre muchos otros; un ejemplo de ellos es el sacobarbital, un barbitúrico usado en el tratamiento a corto plazo del insomnio, el cual inhibe al CYP1B1 causando la pérdida parcial de su grupo prostético a través de la N-alquilación de alguna de sus porfirinas (6).

2.2 CYP3A4

En el ser humano el CYP3A4 se expresa mayoritariamente en el hígado e intestino delgado constituyendo cerca del 25-30% del total de CYP en el hígado siendo la isoforma de CYP más abundante en éste órgano, aunque en el intestino delgado su expresión es mayor y también se expresa en otros tejidos extrahepáticos incluyendo pulmón, estómago y colon e inclusive hay reportes de su expresión en la periferia de los glóbulos rojos, sin embargo esto ocurre bajo condiciones particulares (12).

El CYP3A4 favorece reacciones atípicas de algunos fármacos como la desaturación, división oxidativa de un ácido carboxílico éster y oxidación de un nitrilo a una amida, teniendo como una de sus reacciones clásicas la 6 β -hidroxilación de testosterona. De entre sus sustratos encontramos a dihidropiridinas, esteroides, quinidina, 17 α -etilestriol, y el carcinógeno aflatoxina B₁, extendiéndose la lista rápidamente en los últimos años (13).

Su importancia en el uso clínico y en el desarrollo de fármacos está relacionada con la participación que tiene en la disposición de fármacos (6, 14), particularmente en la biodisponibilidad e interacciones fármaco-fármaco debidas a su inducción o inhibición, esto significa que un metabolismo acelerado del fármaco puede conducir a su baja biodisponibilidad así como una inhibición del metabolismo la puede aumentar, conduciendo

a la posibilidad de causar problemas clínicos severos cuando el fármaco posee un intervalo de dosis estrecho en el que lleva a cabo su acción de forma efectiva sin ser tóxico.

El CYP3A4 es responsable de aproximadamente el 50% del metabolismo de los fármacos conocidos siendo de especial importancia aquellos usados en la quimioterapia del cáncer, esteroides y otros compuestos químicos carcinógenos a los que puede activar como al tamoxifén, un antagonista del receptor de estrógenos, produciendo aductos en el DNA. Otro ejemplo de activación de carcinógenos es la aflatoxina B₁, la cual es hidroxilada para detoxificarla y en el proceso ocurre la formación del mutágeno 8,9-*exo*-epóxido que reacciona y así daña al DNA (6). El metabolismo de los anteriores compuestos puede afectar el riesgo de desarrollar cáncer o alterar la respuesta a quimioterapia.

2.3 CYP1A1

El CYP1A1 es una isoenzima de CYP que se expresa a niveles poco apreciables en el hígado fetal haciéndose evidente hasta que el hígado es adulto y, después del tratamiento con algunos compuestos inductores, también se ha detectado en tejidos extrahepáticos incluyendo páncreas, timo, próstata, intestino delgado, colon, útero y glándulas mamarias. Su expresión en hígado es clasificada como no constitutiva, ya que necesita de compuestos inductores.

Para el estudio de su actividad enzimática, la reacción clásica usada es el metabolismo de la 7-etoxiresorufina transformándose en resorufina, un compuesto fluorescente cuantificable (15).

Se ha reportado que compuestos como aminas aromáticas heterocíclicas y policíclicas son activadas por esta enzima además de que una dieta rica en lípidos, el estrés oxidante y los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzo (a) pireno, actúan como sustratos e inductores al mismo tiempo (16-19).

Poco se sabe del sitio activo de CYP1A1, los modelos recientes de sustratos e inhibidores sugieren que sus ligandos son moléculas planares. Su inhibición es realizada por algunos compuestos que también actúan sobre CYP1A2 y CYP1B1, entre los cuales frecuentemente se utiliza a la α -naftoflavona (α -NF), siendo más efectiva sobre CYP1A2. De entre sus inhibidores selectivos contamos con el 1-(1'-Propinil)pireno y el 2-(1-propinil)fenantreno (13).

El CYP1A1 parece no jugar un papel importante en el metabolismo de fármacos, ya que posiblemente debido a su localización y tasa de expresión no altera significativamente

la farmacocinética de medicamentos. Sin embargo, ciertos trabajos en modelos animales muestran el papel que juega en la carcinogénesis química pues algunos de sus inductores pueden ser pro-carcinógenos, como el benzo(a)pireno y varios compuestos presentes en el humo del tabaco, que al ser metabolizados por CYP1A1 se convierten en metabolitos cancerígenos que incrementan el riesgo de cáncer pulmonar.

2.4 CYP1A2

El CYP1A2 y CYP1A1 tienen el 70% de secuencia de aminoácidos idéntica y las dos se encuentran reguladas por el sistema receptor de hidrocarburos aromáticos (Ah). El CYP1A2 se expresa casi exclusivamente en hígado y lo hace de forma constitutiva siendo intensificada cuando el organismo se somete a tratamiento con moléculas como el 3-metilcolantreno y dioxinas. También se expresa en tejidos extrahepáticos como el colon (20, 21).

En humanos, esta enzima presenta gran polimorfismo genético lo cual hace complicado el seguimiento de su variación e inducción en base a su actividad enzimática. Algunos de sus inductores incluyen tabaco, alimentos quemados (por su contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos), vegetales crucíferos, ejercicio vigoroso y fármacos como el omeprazol (13).

La lista de sustratos de CYP1A2 es larga e incluye algunos carcinógenos como aminas aromáticas y heterocíclicas, hidrocarburos policíclicos y algunas *N*-nitrosaminas (13).

Se sabe de la existencia de interacciones entre fármacos que involucran al CYP1A2 como el caso de la furafilina, la cual altera el metabolismo de la cafeína, es por ello que este candidato a medicamento no fue desarrollado y ahora es conocido como inhibidor de CYP1A2 al igual que la fuvoxamina y la α -NF, siendo ésta última un potente inhibidor de CYP1A2 humano. Otro dato clínico interesante, es que se han asociado altos niveles de actividad de esta enzima con la ineficacia de la teofilina en la terapia contra el asma (22).

El CYP1A2 ha sido relacionado con la activación de componentes del humo del tabaco y el metabolismo de compuestos que puedan llegar a producir cáncer ocupacional (23).

2.5 CYP2B6

El CYP2B6 forma parte de la subfamilia 2B siendo la isoforma que más se expresa en humanos, su equivalente en rata es CYP2B1 entre las cuales existe una similitud del 78% en secuencia de aminoácidos (24).

En estudios recientes se ha demostrado que el CYP2B6 es una enzima regulada por el receptor nuclear, receptor constitutivo de androstano (CAR), el cual es un factor de transcripción activado por xenobióticos y que para estimular la transcripción del *gen CYP2B6* tiene que ser activado por la molécula señal de respuesta de crecimiento temprana (EGR 1) (25).

El CYP2B6 es una enzima importante que metaboliza al 3.0% de fármacos conocidos como el metamizol, ciclofosfamida, promazina, metadona, S-mefenitoína, efavirenz, imipramina, artemisina y tamoxifén (13) y constituye del 3 al 5% del total de CYP contenido en hígado expresándose además en intestino, piel, cerebro, y en baja concentración en pulmón (26).

Actualmente se han reportado varios inhibidores potentes de esta enzima como lo es el anticancerígeno tioTEPA (27), el 17 α -etinilestradiol y el clopigrel. (26).

El CYP2B6 posee pobre especificidad en comparación con otras isoformas de CYP por lo que puede metabolizar una amplia variedad de xenobióticos. Entre sus inductores se tiene al fenobarbital, el cual induce a ocho de los miembros de esta familia.

Como ya se mencionó, el equivalente en rata de CYP2B6 es CYP2B1 que es constitutivo en pulmón y testículo, y participa en el metabolismo endógeno de la testosterona; además, interviene en el metabolismo de la 4-[(metilnitrosamina-1-(3-piridil)9-1-butanona] (NNK) que es un componente del tabaco involucrado en el desarrollo de tumores en pulmón y testículo (28).

En rata hay dos isoformas de CYP2B, una es el CYP2B1 y la otra es el CYP2B2 que también se expresa constitutivamente en hígado y es moderadamente inducible por el fenobarbital por medio de la activación transcripcional de los genes, además tiene una homología del 97% con CYP2B1, aunque sus propiedades cromatográficas y electroforéticas así como su regulación y expresión son diferentes (28).

2.6 JUGO DE TORONJA Y SU INTERACCIÓN CON CYP

Varios de los xenobióticos a los que está expuesto el humano están contenidos en productos naturales, muchos de ellos provenientes de plantas presentes en la dieta, como frutas y vegetales. Por otro lado, es ampliamente reconocido que una dieta rica en estos alimentos disminuye el riesgo de problemas cardiovasculares y ciertas formas de cáncer debido a que varios de los éstos contienen fibra, compuestos antioxidantes y otros potencialmente anticancerígenos como ditiolionas, isotiocianatos, flavonoles y lignanos, por mencionar algunos (29,30).

El jugo de toronja es un producto natural consumido por gran parte de la población mundial ya sea por gusto o por sus conocidos efectos antioxidantes, para reducir la placa aterosclerótica y por disminuir la proliferación de células cancerosas (30).

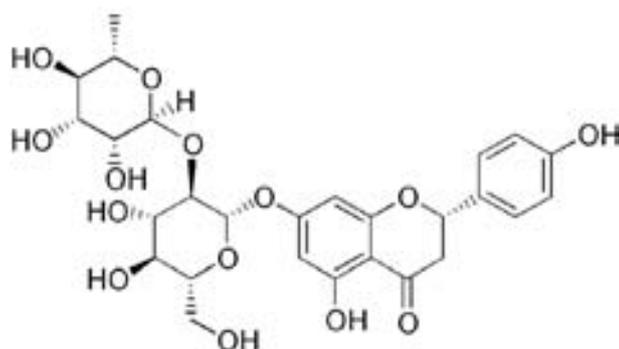
Sin embargo, en 1989 se descubrió por accidente que el jugo de toronja tiene efecto inhibitorio del CYP3A4 (31). En estudios posteriores se determinó que un 47% de la actividad de CYP3A4 intestinal se mantiene disminuida en un intervalo de 4 horas después de la ingestión del jugo de toronja, incrementando la biodisponibilidad de algunos fármacos por las 24 horas siguientes. De tal forma que CYP3A4 parece estar sujeto a inactivación mecanismo-base por los compuestos activos del jugo de toronja (32).

Se ha demostrado que la ingesta de jugo de toronja al mismo tiempo que una gran variedad de fármacos administrados oralmente como verapamil, cafeína y fenacetina, conduce al aumento de sus concentraciones séricas así como de sus efectos tóxicos. Tales alteraciones en el metabolismo de los anteriores fármacos son debidas a la inhibición de CYP1A (33, 34, 35).

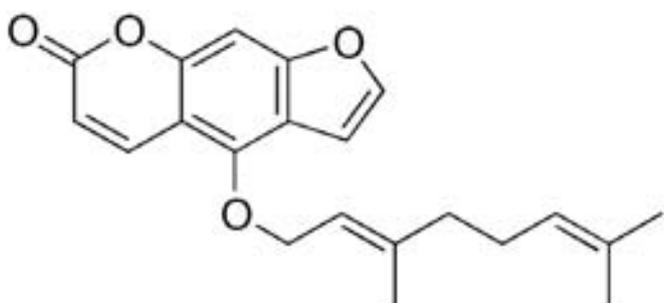
Los compuestos que se proponen como principios activos y responsables del efecto inhibitorio del jugo de toronja sobre CYP incluyen algunos flavonoides como naringina (Nar), quercetina y caempferol, y algunas furanocumarinas como 6, 7-dihidroxibergamotina (DHB), (4-[[6-hidroxi-7[[1-[(1-hidroxi-1-metil)etil]-4-metil-6-(7-oxo-7H-furo-[3,2-g][1]benzopiran-4-il)-4-hexenil]oxy]-3,7-dimetil-2-octenil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (GF-I-1) y 4-[[6-hidroxi-7[[4-metil-1-(1-metil-etenil)-6-(7-oxo-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-4-il)-4-hexenil]oxi]-3,7-dimetil-2-octenil] oxo]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (GF-I-4) y bergamotina (BG). La Nar (fig. 4a) es el compuesto mayoritario del jugo de toronja (174-1472 $\mu\text{mol/L}$), que al ser metabolizado por la α -ramnosidasa y la β -glucosidasa produce a la naringenina, molécula que se ha visto posee actividad inhibitoria sobre CYP3A4 en estudios *in vivo*. En estudios *in vitro* esta molécula presenta una pobre inhibición sobre el CYP3A4 y el

CYP1A2 en comparación con el jugo de toronja que inhibe casi por completo la actividad de estas enzimas. Lo anterior sugiere que la Nar no es el principal agente activo del jugo de toronja, sobre la inhibición de CYP3A4 y CYP1A2 (36).

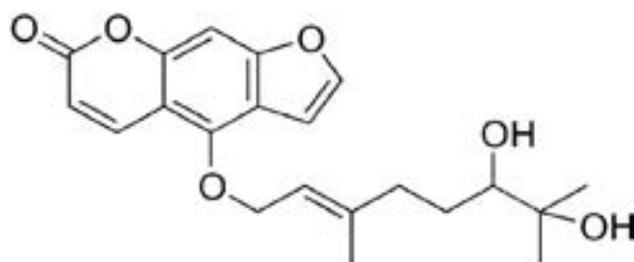
En estudios con las furanocumarinas, BG y DHB (fig. 4b y c), se determinó la concentración para inhibir el cincuenta por ciento de la actividad (CI_{50}) de CYP3A4 (40.00 y 5.56 μ M, respectivamente) (37). En estos resultados vemos que DHB parece tener mayor potencia de inhibición sobre CYP3A4 que BG, sin embargo, BG se encuentra en mayor cantidad en el jugo de toronja que DHB (1.0-36.6 μ mol/L y 0.22-52.5 μ mol/L respectivamente), lo cual no permite definir a BG como el principal responsable del efecto inhibitorio del jugo de toronja sobre CYP3A4 (32).



a) Naringina



b) Bergamotina



c) 6,7-Dihidroxi bergamotina

Fig. 4 Estructuras de naringina, bergamotina y 6,7-dihidroxi bergamotina.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inactivación o inhibición de enzimas CYP pueden conducir a la alteración del metabolismo de fármacos afectando su actividad farmacológica lo cual incrementa el peligro potencial de interacciones fármaco-fármaco. La inhibición del metabolismo de un fármaco, como resultado de la competencia entre dos diferentes fármacos por una misma enzima, puede producir la elevación en la concentración de uno o ambos fármacos en sangre, que en el último de los casos producirá efectos adversos.

Por otro lado, la inactivación de enzimas CYP también puede inhibir el potencial hepatocarcinogénico, como el caso del CYP3A4 y la aflatoxina-1 en el cual al ser inhibida la enzima se disminuye el riesgo de cáncer hepático. Fenómenos como éste, nos conducen a investigar agentes inhibitorios de CYPs que permitan explorar no sólo la faceta negativa del efecto de inhibición sino también la positiva.

Dentro de los agentes inhibitorios de CYP se tiene al jugo de toronja, el cual ha sido estudiado ampliamente, en especial sus compuestos activos sobre el CYP3A4. Sin embargo, no se ha hecho énfasis en el estudio de inhibición sobre otras isoformas importantes en el metabolismo y activación de varios xenobióticos, incluyendo pro-carcinógenos relevantes en las áreas de toxicología y cancerología.

En el presente trabajo se plantea que la BG, DHB y Nar, componentes mayoritarios en el jugo de toronja, inhiben la actividad de las subfamilias 1A y 2B, del citocromo P450, particularmente las isoformas CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2

4. HIPÓTESIS

Los componentes mayoritarios del jugo de toronja, BG, DHB y Nar, además de inhibir a CYP3A4 tendrán la capacidad de inhibir *in vitro* a CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2, isoenzimas importantes en el metabolismo de fármacos y otros xenobióticos.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar en estudios *in vitro* el potencial inhibitorio de BG, DHB y Nar sobre la actividad de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Inducir la producción enzimática de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 en hígado de rata por tratamiento con β -NF/FB.
- Obtener la proteína microsomal hepática de los animales tratados.
- Determinar inmunoespecíficamente la presencia de CYP1A y CYP2B en muestras de microsomas hepáticos de rata.
- Medir la actividad microsomal hepática de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 en presencia y ausencia de Nar, BG y DHB.

6. MATERIALES Y METODOLOGÍA

El fenobarbital (FB) fue adquirido de ABBOTT Laboratories de México (México, D.F., México). La β -naftoflavona (β -NF), la etoxiresorufina, la metoxiresorufina, la pentoxiresorufina, la benciloxiresorufina, la resorufina, la naringina (Nar) y la 6,7-dihidroxi bergamotina (DHB) se adquirieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis MO, USA). La bergamotina (BG) se adquirió de INDOFINE Chemical Company Inc. (Hillsborough, NJ, USA).

Los anticuerpos policlonales primarios anti-rata CYP2B1/2 obtenidos en conejo, fueron adquiridos de Research Diagnostics Inc. (Concord Ma., USA). Los anticuerpos policlonales primarios anti-rata CYP1A1 obtenidos en cabra y los anticuerpos policlonales secundarios IgG anti-cabra de cabra y anti-conejo de conejo conjugados con peroxidasa se adquirieron de BD-Gentest (Woburn, MA, USA).

6.1 INDUCCIÓN DEL CYP1A y CYP2B (38)

Se utilizaron seis ratas macho Wistar de 250 g de peso cada una, procedentes del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Cinco de ellas se trataron con fenobarbital (FB) y β -naftoflavona (β -NF) para inducir la producción de las enzimas de CYP requeridas para este proyecto y la sexta rata se trató con el vehículo como control negativo de la inducción.

El esquema de trabajo fue el siguiente: los días 1, 2 y 3 se les administró 60 mg/Kg de FB vía i.p. a las 5 ratas por inducir; el día 3 se les administró 80 mg/Kg de β -NF vía i.p. y el día 4 se les administró 30 mg/Kg de FB. A la rata testigo se le administraron 200 μ L de aceite de maíz los 4 días. El día 5 se sacrificaron a las ratas por dislocación cervical (38).

6.2 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MICROSOMAL (39)

Después del sacrificio por dislocación cervical, se extrajo el hígado el cual se lavó con agua estéril procurando quitar lo más posible la hemoglobina, enseguida se colocó en solución de KCl 0.15 M 3 mL/g de hígado. Cada hígado se cortó en trozos pequeños y se homogeneizó. Enseguida se mezcló el homogeneizado de los 5 animales y se centrifugó a 9,000g por 10 minutos. El hígado de la rata testigo se procesó de igual manera. El

sobrenadante obtenido se centrifugó a 100,000g por 60 minutos. El botón resultante se homogeneizó con una solución de fosfatos 0.1 M pH 7.4 y sacarosa 0.25 M y se centrifugó a 100,000g por 60 minutos adicionales; el botón obtenido se resuspendió en una solución de fosfatos 0.1 M pH 7.4, ácido diamino tetra acético (EDTA) 1 mM, ditioneitol (DTT) 0.1 mM y glicerol 20% v/v. La fracción microsomal así obtenida se distribuyó en alícuotas que se almacenaron a -80°C para su posterior uso en la determinación de proteína total mediante el método de Bradford (40).

6.3 DETERMINACIÓN INMUNOESPECÍFICA DEL CYP1A y CYP2B (41)

Se realizó la separación de proteínas mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida. Con gel separador de 7.5% de acrilamida y el concentrador de 4%. Se colocó 5 μ g de proteína en cada carril del gel y se corrió la electroforesis a 200 voltios por 45 minutos, en una solución de tris-base 2.5 mM, glicina 79.2 mM, SDS 0.1%. La transferencia a una membrana de nitrocelulosa se realizó a 30 voltios por 14 horas a 4°C, en una solución de tris-base 25 mM y glicina 192 mM. Para corroborar que se llevó a cabo la transferencia se hizo una tinción de la membrana con solución Ponceau y en seguida la membrana se bloqueó con una solución de PBS-albúmina al 3% por 1 hora.

Para realizar la inmunodetección se utilizaron anticuerpos contra CYP1A1 y CYP2B1. El primer anticuerpo se dejó actuar con la membrana por 1 hora al igual que el segundo anticuerpo. La membrana se reveló con diaminobencidina.

6.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (42, 43, 44, 45)

La evaluación de la actividad enzimática se realizó mediante la capacidad de O-dealquilación que poseen los CYPs. Los sustratos utilizados etoxiresorufina (actividad EROD, etoxiresorufina O-deetilasa) para CYP1A1, metoxiresorufina (actividad MROD, metoxiresorufina O-demetilasa) para CYP1A2, pentoxiresorufina (actividad PROD, pentoxiresorufina O-dealquilasa) para CYP2B1 y benciloxiresorufina (actividad BROD, benciloxiresorufina O-dealquilasa) para CYP2B2, son metabolizados por las respectivas enzimas, estos sustratos tienen como producto común a la resorufina, compuesto cuantificable mediante fluorescencia.

Se realizó una curva patrón con resorufina a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 pmoles. La curva patrón se realizó mezclando la cantidad correspondiente de resorufina en amortiguador de pH 7.6 (Tris-base 50 mM y MgCl₂ 25 mM) en un volumen final de 1 mL. A partir de esta curva se determinaron las concentraciones de producto formado. La reacción enzimática se llevó a cabo en una mezcla de amortiguador pH 7.6 (tris-base 50 mM y MgCl₂ 25 mM), 1 μ M del sustrato correspondiente (disuelto en DMSO), NADPH 50 μ M (disuelto en amortiguador) y en su caso, el inhibidor. La mezcla se incubó por 3 minutos a 37°C. Posteriormente se comenzó la reacción enzimática al adicionar la cantidad necesaria de proteína microsomal, 38.6, 193.0, 193.0 y 19.3 μ g para la determinación de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 Y CYP2B2 respectivamente. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 1mL. La formación del producto se evaluó durante 3.5 minutos a 37°C registrando lecturas cada 15 segundos en un fluorómetro Versa Fluor® de BioRad. Las mediciones se realizaron en una longitud de onda de excitación de 350 nm y una longitud de onda de emisión de 286 nm.

Se realizaron experimentos preliminares utilizando al CYP1A1 como modelo de inhibición en el que se probaron concentraciones de: 0.25, 0.5, 1, 10, 20 μ M para NG; 1, 10 y 25 para BG; y 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 16.0 μ M para DHB. De los resultados obtenidos en estas pruebas se determinó el intervalo de las concentraciones finales de NG, BG y DHB a usar para mostrar su efecto inhibitorio.

Las determinaciones de actividad enzimática para cada concentración de inhibidor fueron realizadas por triplicado y los resultados de actividad se expresan en porcentaje respecto a la actividad del control.

Con objeto de verificar que los inhibidores probados no interferían con la fluorescencia de la resorufina, se elaboraron curvas de resorufina en presencia de cada inhibidor. Los resultados (incluidos en el Apéndice) muestran que BG y DHB no interfieren en la metodología implementada.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis estadístico con el programa XLSTAT® versión 7.5.2 para Windows XP®. Se determinó ANOVA de una vía a todos los ensayos con una $P \leq 0.005$ (excepto a los ensayos con NG en los que trabajamos con una $P \leq 0.025$), y como prueba post hoc se realizó la prueba de Tukey para determinar diferencia significativa entre los ensayos de actividad enzimática a las diferentes concentraciones de inhibidor analizadas y la prueba de Dunnett a una $P \leq 0.005$ para determinar la diferencia significativa entre los ensayos de actividad enzimática con las diferentes concentraciones de inhibidor y el control de la actividad de la enzima evaluada.

7. RESULTADOS

7.1 INMUNODETECCIÓN.

Los resultados presentados en la figura 4 confirman que el tratamiento con β -NF/FB promueve la inducción de las enzimas de CYP1A (CYP1A1 y CYP1A2).

Los carriles 2, 3 y 4, contienen 5, 3.2 y 3.2 μ g de proteína microsomal hepática de rata tratada con aceite de maíz (control), respectivamente. En ninguno de los carriles se observa la banda correspondiente a la migración de la proteína CYP1A1 lo que refleja su condición de baja o nula expresión basal. Lo anterior concuerda con otros autores que señalan a ésta enzima como no constitutiva y solamente detectable por inmunodetección después de ser inducida por algún tratamiento (por ejemplo con la β -NF y el FB). Por otro lado, el carril 5 contiene 5 μ g de la mezcla de microsomas hepáticos obtenidos de ratas tratadas con β -NF/FB en el que se observa la banda correspondiente a CYP1A1 con lo cual comprobamos su inducción. Sabemos que la banda observada es la correspondiente a CYP1A1 ya que migra de forma similar al control positivo de CYP1A1 semipuro de rata (carril 1), (Supersoma®).

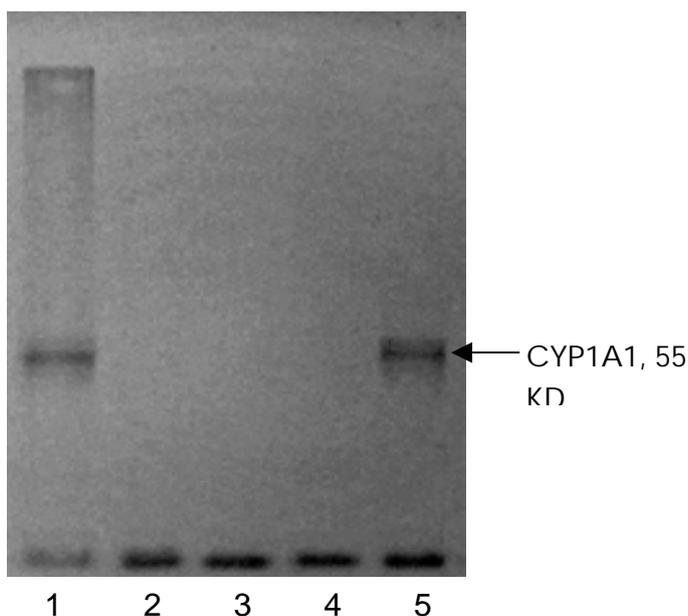


Fig. 5 Inmunodetección de CYP1A1. Carril 1: CYP1A1 semipuro de rata, control positivo (25 μ g); carriles 2, 3 y 4: proteína microsomal hepática de rata testigo (5, 3.2 y 3.2 μ g respectivamente), carril 5: proteína microsomal de ratas inducidas con la β -NF y el FB (5 μ g). Las muestras fueron sometidas a electroforesis, luego transferidas a membranas de nitrocelulosa y expuestas a un anticuerpo policlonal anti-rata desarrollada en cabra contra CYP1A1.

La figura 5 muestra que la inducción de CYP2B se llevó a cabo ya que la banda presente en el carril 4 correspondiente a proteína microsomal hepática de las ratas inducidas con la β -NF y el FB es más intensa que las obtenidas en los carriles 1, 2 y 3, que corresponden a proteína microsomal hepática de la rata tratada con aceite de maíz (control). CYP2B1 es una enzima que se expresa constitutivamente en el hígado pero evidentemente su expresión es mayor al ser inducida.

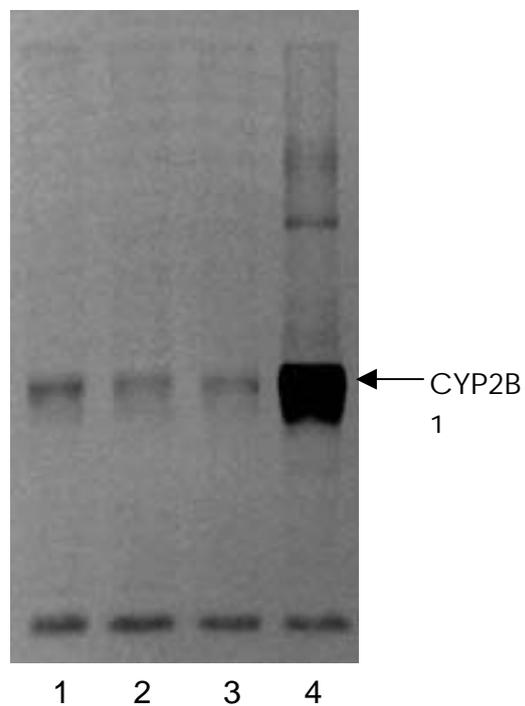


Fig. 6 Inmunodetección de CYP2B1. Carriles 1, 2 y 3: proteína microsomal de rata testigo (5, 3.2 y 3.2 μ g de proteína respectivamente), carril 4: proteína microsomal de rata inducida con la β -NF y el FB (5 μ g). Las muestras fueron sometidas a electroforesis, luego transferidas a membranas de nitrocelulosa y expuestas a un anticuerpo policlonal anti-rata desarrollada en cabra contra CYP2B1.

7.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE Nar SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CYP

Las actividades enzimáticas que se muestran en las figuras 6-9 se determinaron en presencia de diferentes concentraciones de Nar. En todas las figuras la primera barra corresponde a la actividad basal de la proteína inducida por β -NF/FB (Control). Para todas las enzimas evaluadas (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2), se puede observar que no existe diferencia entre las actividades basales y aquellas encontradas cuando se agregó NG.

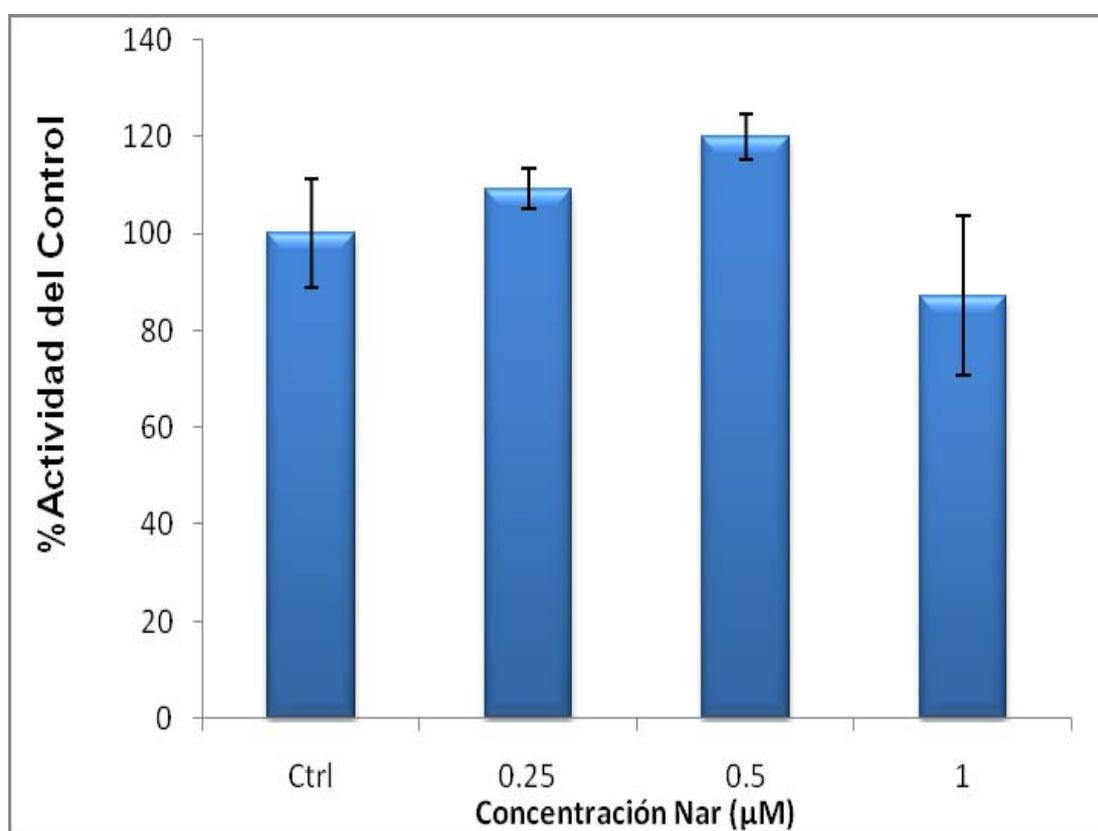


Fig. 7 Efecto de diferentes concentraciones de Nar sobre la actividad de CYP1A1.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.025$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.025$. \pm DE (n=3)

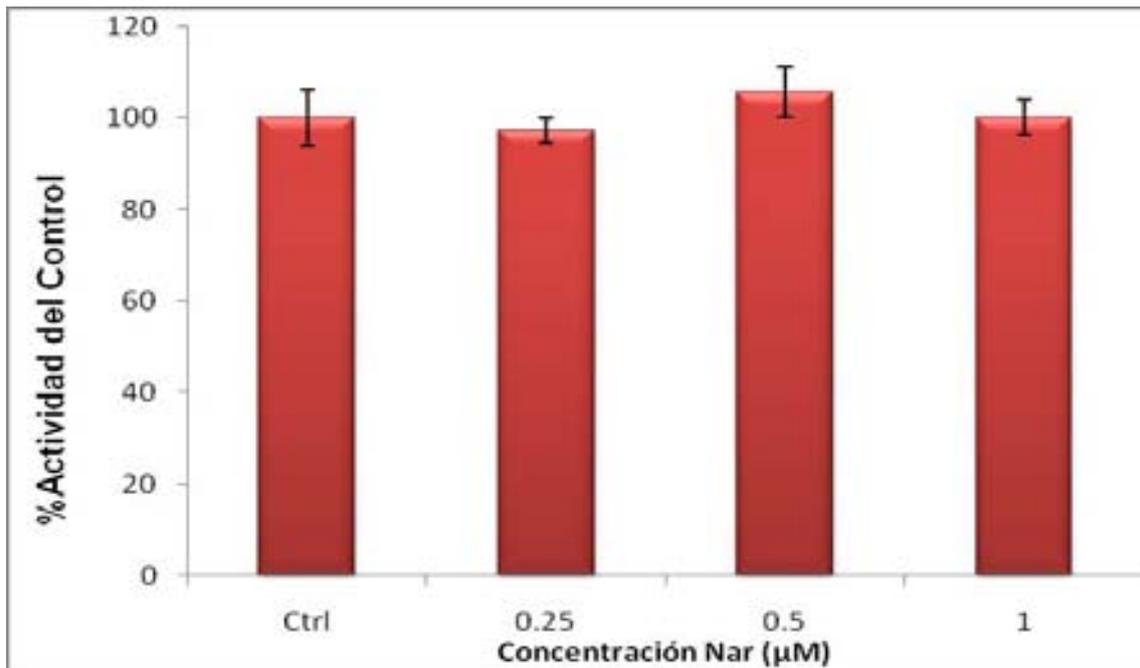


Fig. 8 Efecto de diferentes concentraciones de Nar sobre la actividad de CYP1A2.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.025$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.025$. \pm DE (n=3)

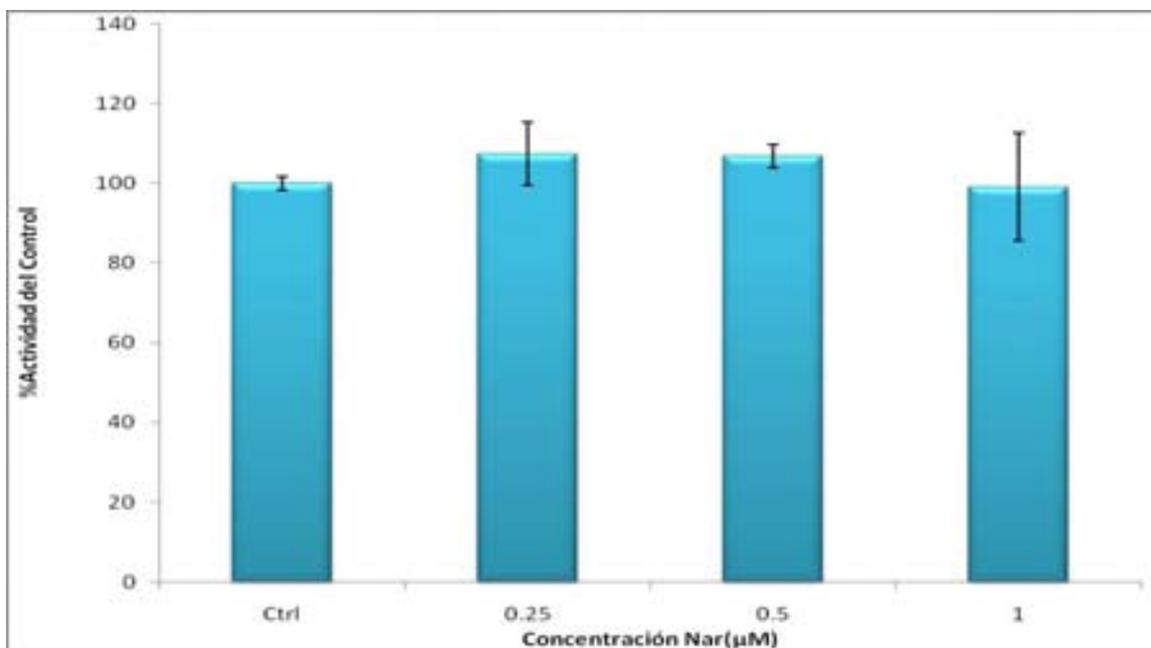


Fig. 9 Efecto de diferentes concentraciones de Nar sobre la actividad de CYP2B1.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.025$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.025$. \pm DE (n=3)

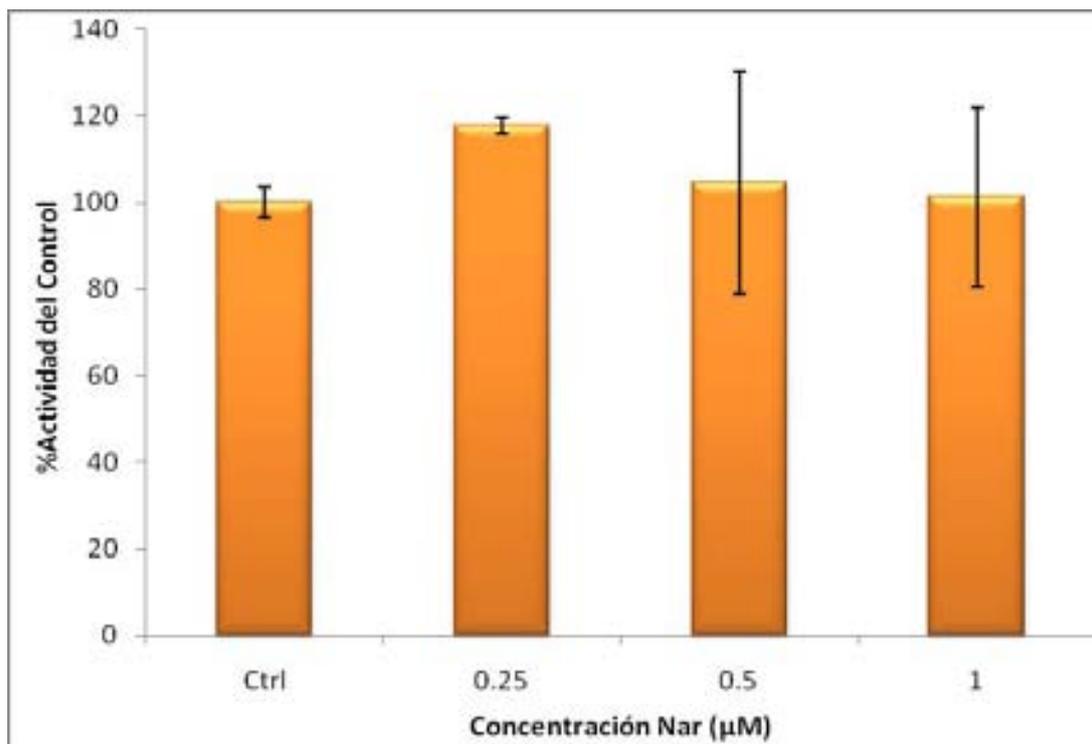


Fig. 10 Efecto de diferentes concentraciones de Nar sobre la actividad de CYP2B2.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.005$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.005$. \pm DE (n=3)

7.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE BG SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CYP

En las figuras 10–13 se muestra el efecto de BG, sobre la actividad de las diferentes enzimas contempladas en nuestro estudio. En todas estas figuras la primera barra muestra la actividad basal de la enzima.

En el caso de CYP1A1 (Fig.10) vemos que la BG tiene un efecto inhibitorio dependiente de la concentración de BG. Este efecto de BG también es observado en CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2.

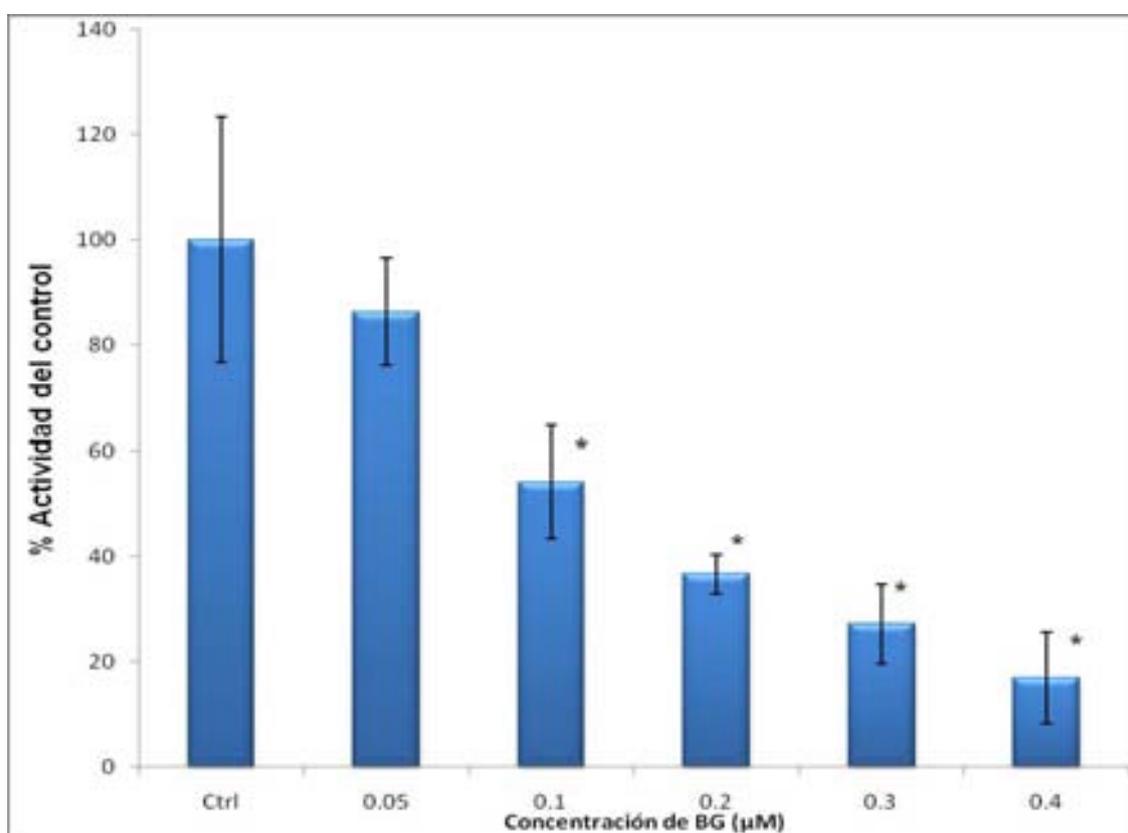


Fig. 11 Efecto diferentes concentraciones de BG sobre la actividad de CYP1A1.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.005$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.005$. \pm DE (n=3)

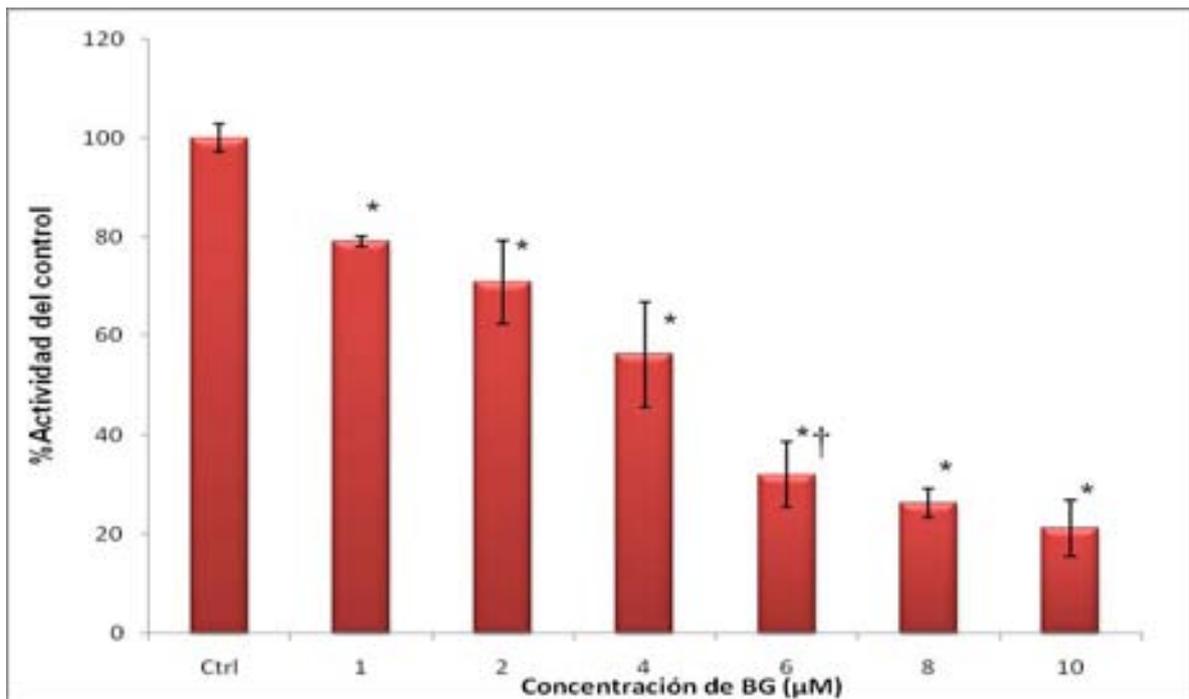


Fig. 12 Efecto de diferentes concentraciones de BG sobre la actividad de CYP1A2.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.005$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.005$. \pm DE (n=3)

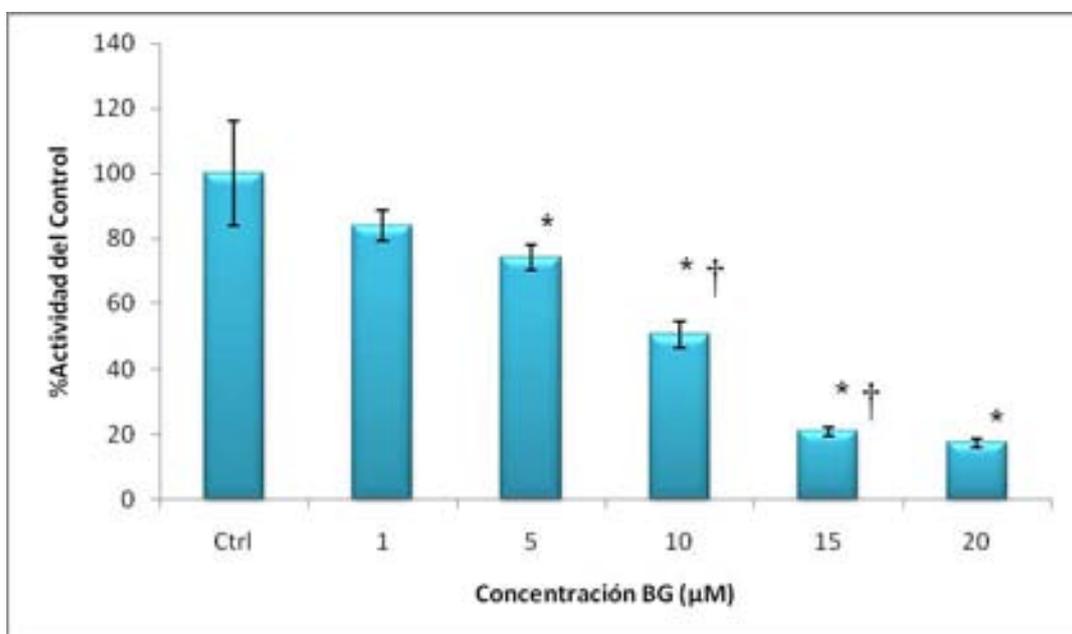


Fig. 13 Efecto de diferentes concentraciones de BG sobre la actividad de CYP2B1.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.005$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.005$. \pm DE (n=3)

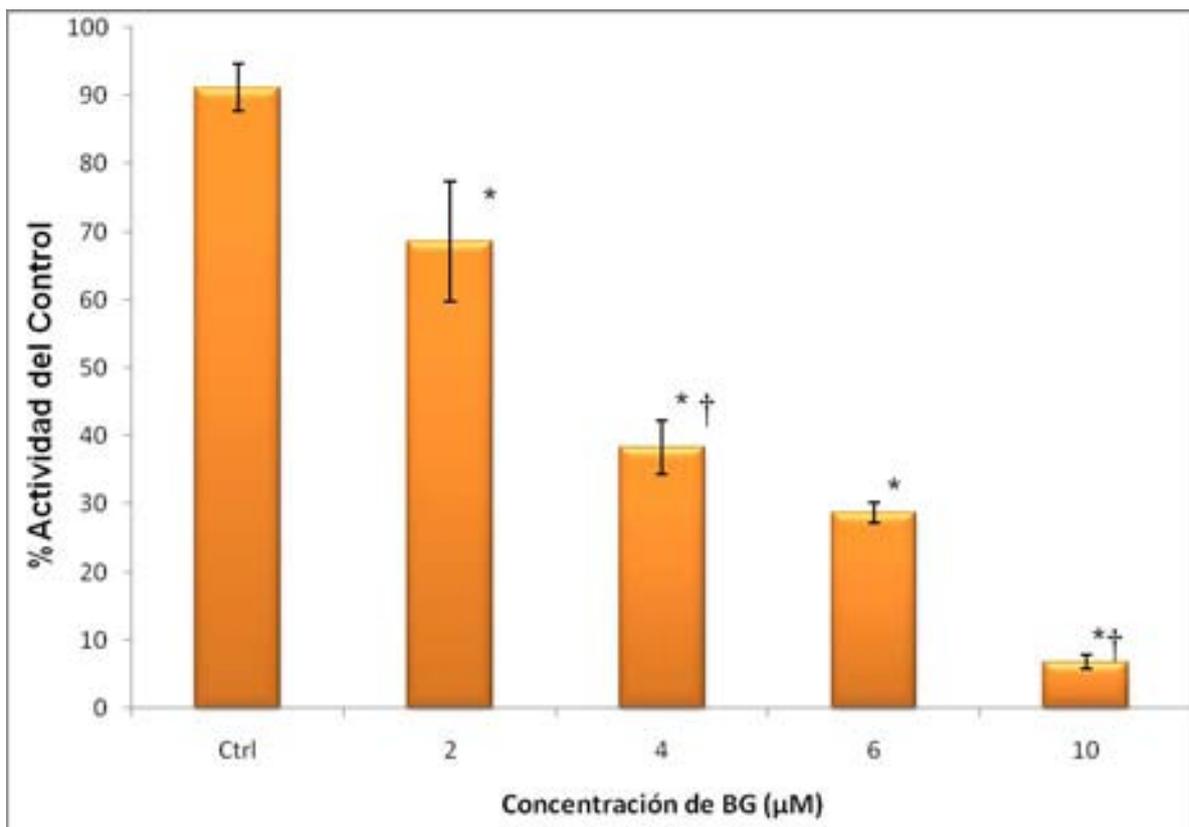


Fig. 14 Efecto de diferentes concentraciones de BG sobre la actividad de CYP2B2.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.005$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.005$. \pm DE (n=3)

7.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE 6, 7- DIHIDROXIBERGAMOTINA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CYP

En las figuras 14-17 se presenta el efecto inhibitorio que posee la DHB sobre enzimas de CYP. En la figura 14 observamos el efecto de éste compuesto sobre CYP1A1, disminuyendo su actividad enzimática en función de la concentración de DHB. Dicho efecto también se presenta en la demás enzimas de CYP analizadas.

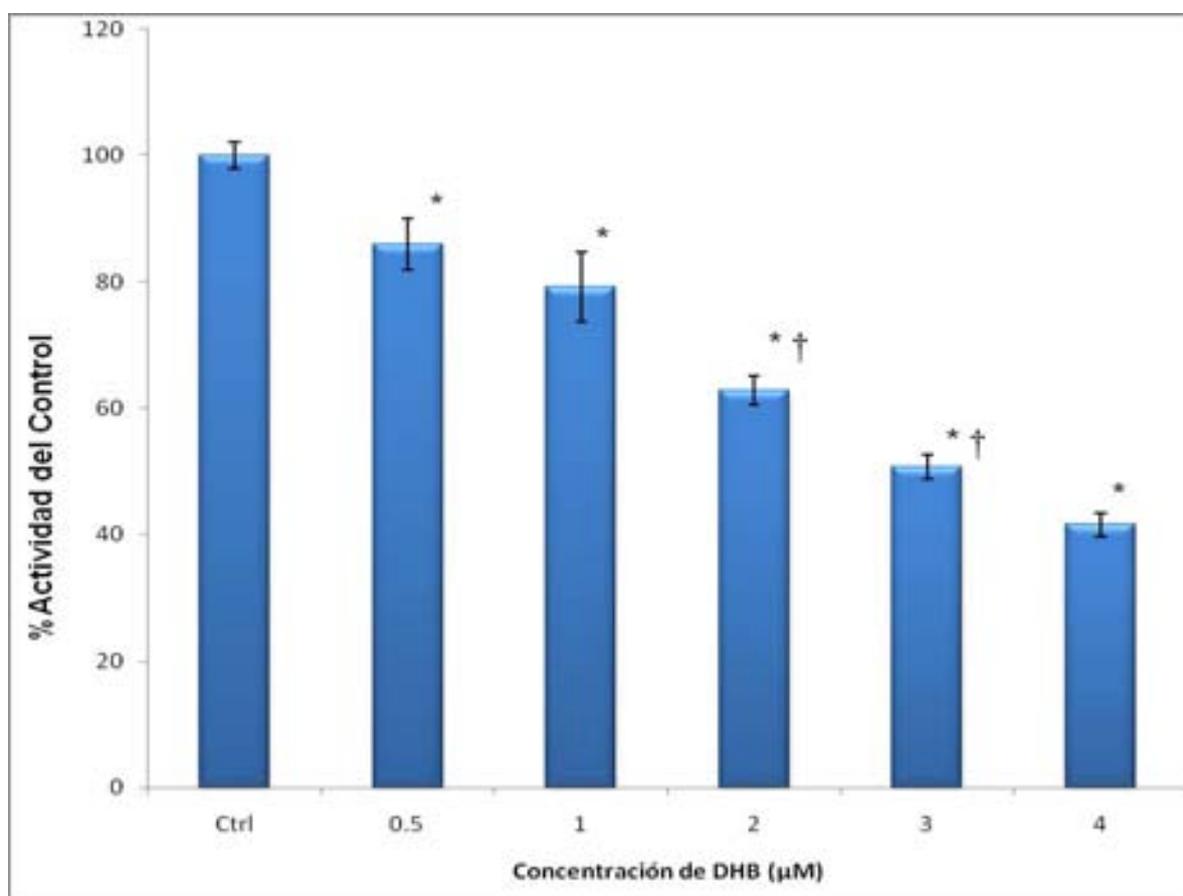


Fig. 15 Efecto de diferentes concentraciones de DHB sobre la actividad de CYP1A1.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.025$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.025$. \pm DE (n=3)

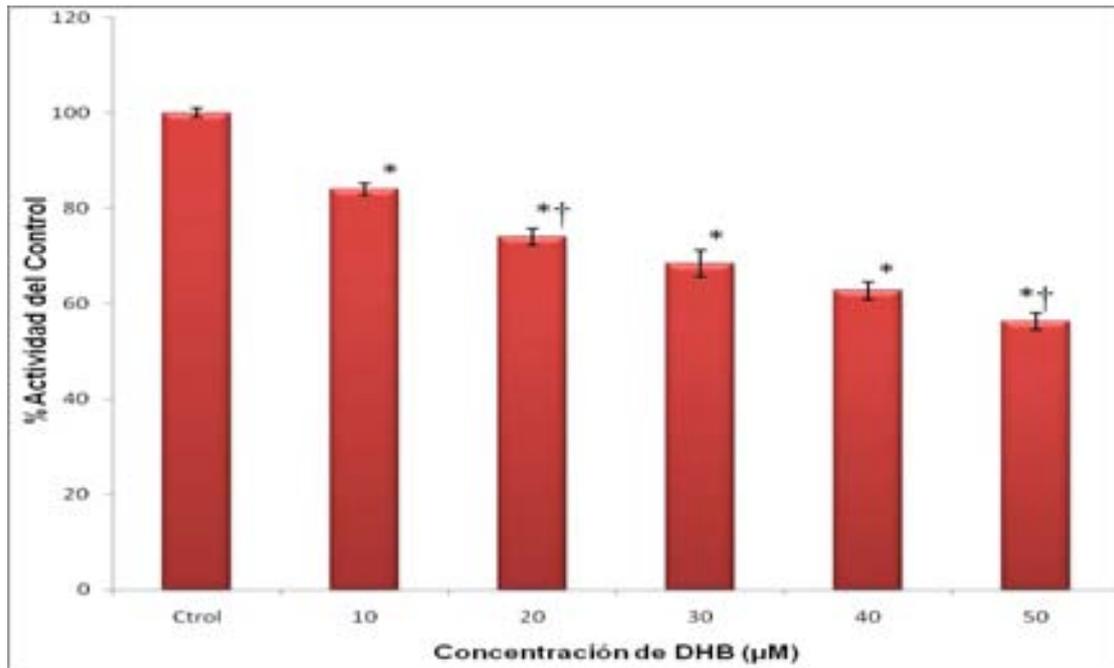


Fig. 16 Efecto de diferentes concentraciones de DHB sobre la actividad de CYP1A2.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.005$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.005$. \pm DE (n=3)

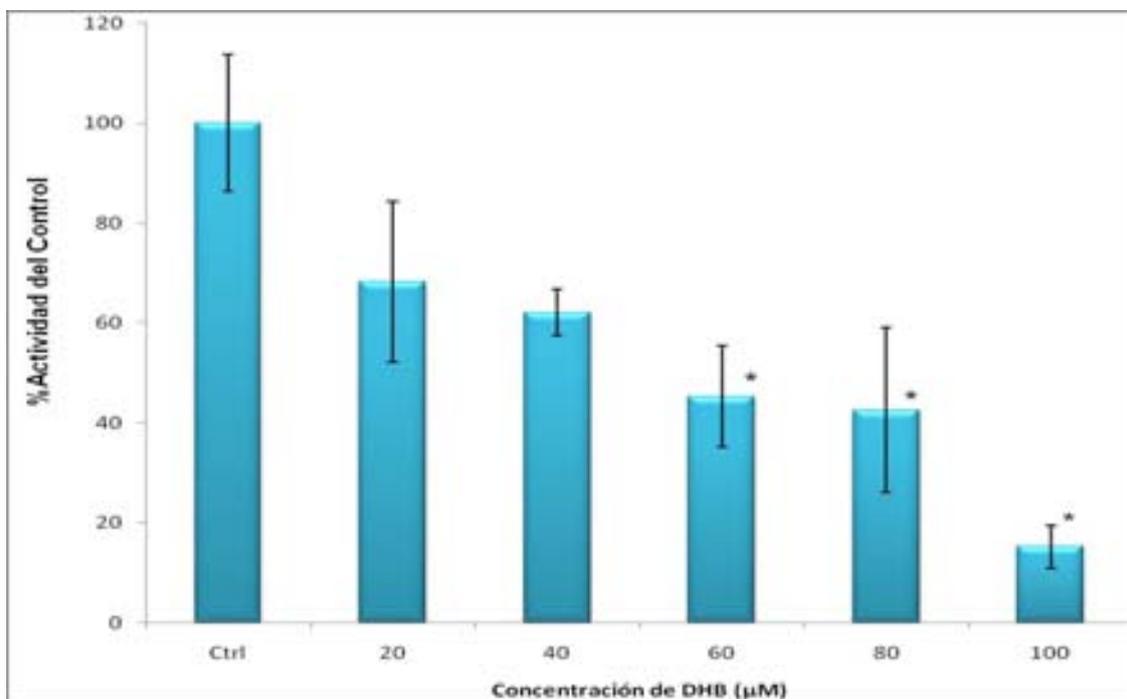


Fig. 17 Efecto de diferentes concentraciones de DHB sobre la actividad de CYP2B1.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.005$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.005$. \pm DE (n=3)

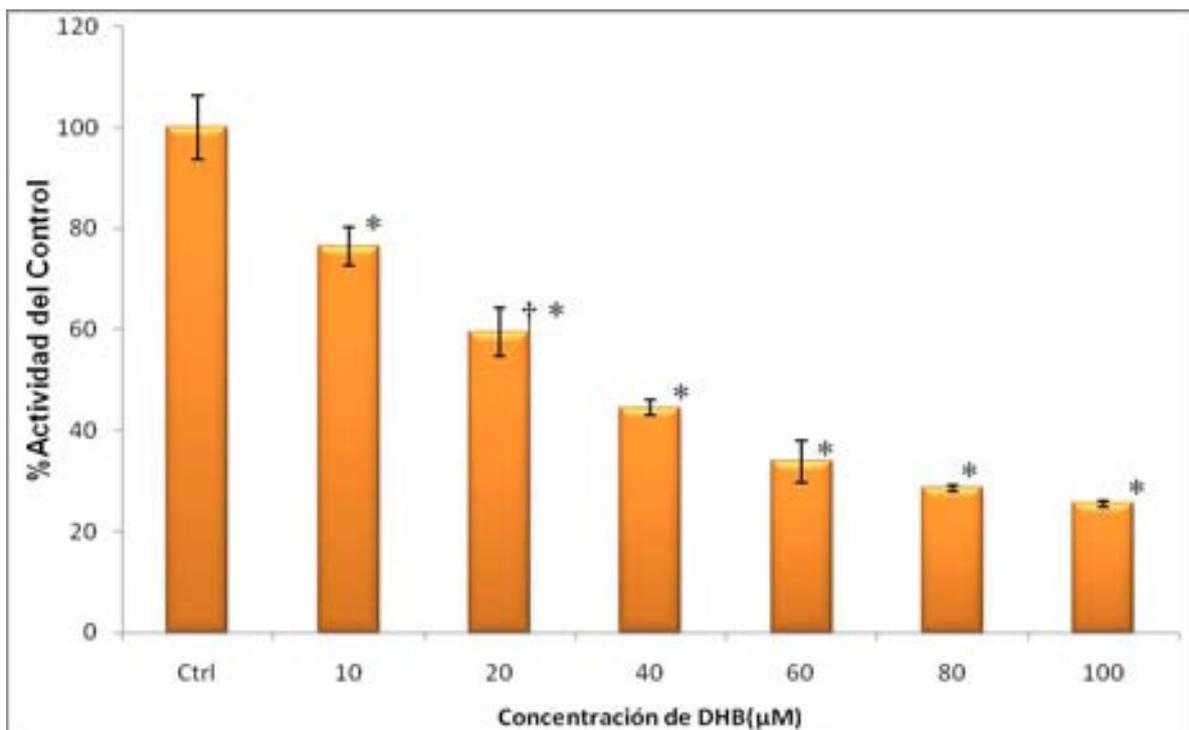


Fig. 18 Efecto de diferentes concentraciones de DHB sobre la actividad de CYP2B2.

* Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.005$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.005$. \pm DE (n=3)

7.5 CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (CI₅₀) DE Nar, BG Y DHB SOBRE CYP

En la tabla 1 se muestra la concentración necesaria de cada compuesto analizado para inhibir el 50% (CI₅₀), de la actividad enzimática de cada enzima evaluada. El cálculo matemático para obtener la CI₅₀ se realizó en base a la ecuación lineal resultante de la relación actividad enzimática vs concentración de inhibidor. Los valores son promedio CI₅₀±DE (n=3).

Tabla 1. CI₅₀ de Nar, BG y DHB sobre CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2

Inhibidor	Nar	BG (μM)	DHB (μM)
CYP1A1		0.192 ± 0.029	3.162 ± 0.153
CYP1A2		5.077 ± 0.321	54.479 ± 1.751
CYP2B1		9.495 ± 0.979	55.066 ± 3.638
CYP2B2		4.535 ± 0.092	48.195 ± 0.189

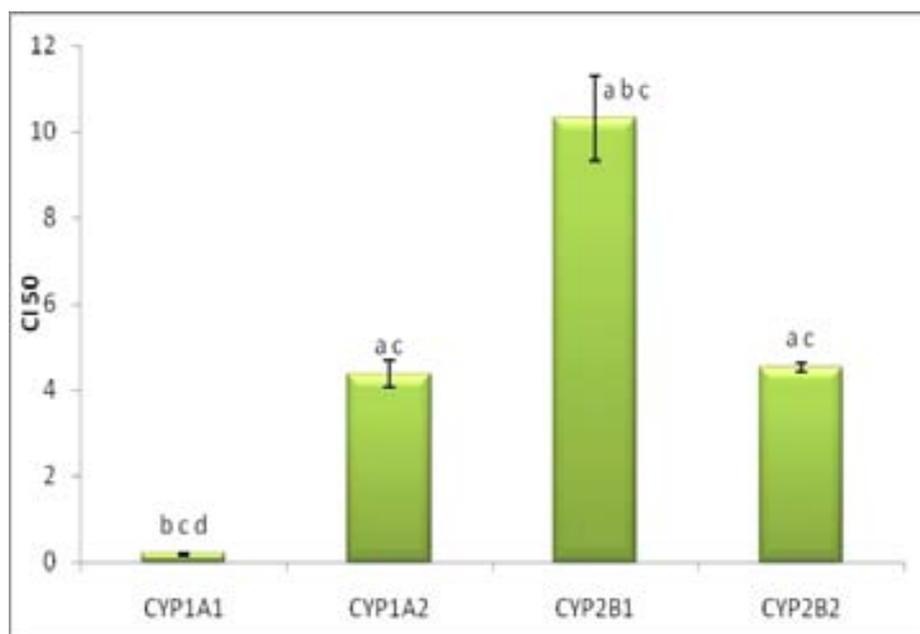


Fig. 19 Comparación de CI₅₀ de BG sobre CYP1A1^a, CYP1A2^b, CYP2B1^c y CYP2B2^d. a, b, c y d = diferencia significativa con CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2, respectivamente, con una $P \leq 0.005$. Promedio \pm DE n=3.

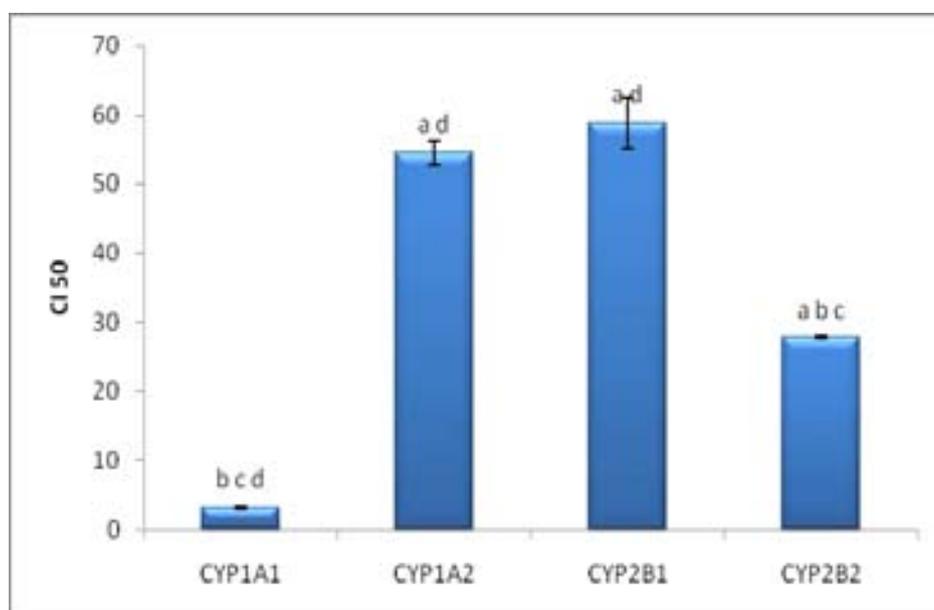


Fig. 20 Comparación de CI₅₀ de DHB sobre CYP1A1^a, CYP1A2^b, CYP2B1^c y CYP2B2^d. a, b, c y d = diferencia significativa con CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2, respectivamente, con una $P \leq 0.005$. Promedio \pm DE n=3

8. DISCUSIÓN

El efecto de flavonoides como la Naringina (Nar), y de furanocumarinas como BG y DHB sobre algunos CYP's, ya ha sido evaluado previamente tanto *in vivo* como *in vitro*. Los estudios de Nar sobre CYP3A4, sugieren que su aglicona, llamada naringenina, es quien posee el efecto inhibitorio sobre la esta enzima ya que *in vivo*, Nar es metabolizada por la α -ramnosidasa y la β -glucosidasa convirtiéndola en naringenina, la cual presenta una alta potencia de inhibición de CYP3A4 (37, 46).

Con respecto a BG y DHB, algunos autores mencionan que BG es el componente del jugo de toronja con mayor potencia de inhibición *in vitro* sobre CYP3A4 en comparación con DHB (47). Adicionalmente, otros autores reportan que DHB tiene un mayor efecto sobre CYP3A4 e inclusive sugieren que *in vivo* éste compuesto y Nar pueden ser los responsables de gran parte de la inhibición de ésta enzima (37, 48, 49), ya que *in vivo* DHB inhibe más que BG a CYP3A4 (37). Por otro lado se sabe que BG y DHB son inhibidores de CYP3A4 dependientes de la concentración y del tiempo, y su inhibición es del tipo inactivación basada en el mecanismo catalítico de la enzima (inhibidor suicida), ya que requiere ser metabolizado por la enzima para poder ejercer su efecto inhibitorio.

También se tienen informes de la inhibición de enzimas como CYP1A1 y CYP1A2 por Nar, BG y DHB. Ueng et al. (50), encontró en un estudio *in vivo* sobre ratones, que Nar es responsable del decremento de la expresión y actividad de CYP1A2 y no así de CYP1A1. Por el contrario Maish et al. (51), determinó que la actividad de CYP1A2, evaluada a través del metabolismo de la cafeína, no se veía afectado por el jugo de toronja lo que significa que la naringina no ejerce un efecto inhibitorio sobre ésta enzima. Estos resultados controversiales dejan sin definición la capacidad inhibitoria de la naringina sobre los CYP's y es por ello que decidimos incluirla en nuestro estudio.

En estudios en los que se utilizan CYP's humanos semipurificados, se ha observado que BG tiene mayor efecto de inhibición sobre CYP1A2 que sobre CYP3A4 (37) y DHB las inhibe por igual. Ambos compuestos inhiben a CYP1A2 y se sugiere que lo hace por inactivación basada en su mecanismo catalítico pero no se ha corroborado aún (37, 47). Además, se sabe que BG es un potente inhibidor de CYP1A1 en cultivo primario de hepatocitos de rata y en microsomas obtenidos de estos cultivos con una concentración de 10 veces más que lo reportado para CYP1A1 humano (52).

Se sabe que BG no sólo inhibe a CYP3A4, CYP1A1 y CYP1A2 sino que también inhibe a CYP2B6 de humano y de igual manera lo hace por inactivación basada en su mecanismo catalítico (53, 54).

En los ensayos *in vitro* con microsomas hepáticos de ratas tratadas con FB/ β -NF realizados en este estudio, obtuvimos que Nar bajo las condiciones y concentraciones trabajadas no presenta inhibición sobre CYP1A y CYP2B (fig. 6-9). Esto es similar a lo reportado para los estudios de inhibición *in vitro* sobre CYP3A4, por lo que podemos apoyar la idea de que naringenina es quien presenta la capacidad de inhibir a CYP1A y CYP2B y no la Nar. El proceso de transformación de Nar a naringenina no ocurre *in vitro* por la falta de la alfa-ramnosidasa y la beta-glucosidasa, por lo que la inhibición sobre CYP1A y CYP2B no se presenta.

Con respecto al estudio con BG y DHB, obtuvimos que BG presenta aproximadamente 16 veces más potencia de inhibición que DHB sobre CYP1A2 siendo sus CI_{50} de 0.192 ± 0.029 y 3.162 ± 0.153 μ M (tabla 1), este resultado concuerda parcialmente con lo reportado por Tassaneeyakul et al. (37), ya que en los estudios que su grupo de trabajo realiza obtienen una CI_{50} de BG y DHB de 0.3 y 0.6 μ M respectivamente. He et al. (47) reportó que con 1 μ M de BG se inhibe el 92% de la actividad de CYP1A2, valor cercano al obtenido en este estudio para el 50% de inhibición. Adicionalmente, la BG resulta ser más potente sobre CYP1A1 que sobre las otras enzimas evaluadas, siendo su potencia de inhibición en el siguiente orden: CYP1A1 > CYP1A2 = CYP2B1 > CYP2B2 (fig. 18), lo cual concuerda con lo que reporta Baumgart et al. (52) respecto a su potencia de inhibición sobre CYP1A1, aunque su estudio es sobre microsomas de un cultivo de hepatocitos y obtiene CI_{50} de 0.01 μ M de BG. Lo anterior sugiere que la inhibición de BG es más específica sobre CYP1A1 que sobre las demás enzimas evaluadas. Sin embargo, el hecho de que la concentración de DHB sea mayor en el jugo de toronja (0.22-52.5 μ M), no nos permite decir que el efecto de inhibición *in vitro* del jugo de toronja sea debido en gran medida a la BG (1.0-36.6 μ M en jugo de toronja).

Por otro lado, observamos que BG presenta mayor potencia de inhibición sobre CYP2B1 y CYP2B2 en comparación con DHB (Tabla 1). Además, la inhibición sobre CYP2B2 por ambos compuestos es mayor que sobre CYP1A2 y CYP2B1 (fig. 18 y 19).

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio demostramos que la Nar no tiene efecto inhibitorio, *in vitro*, sobre CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 a las tres concentraciones evaluadas 0.25, 0.5 y 1.0 μM ; que BG es un potente inhibidor de las enzimas evaluadas con diferente potencia de inhibición teniendo el siguiente orden: CYP1A1>CYP2B2=CYP1A2>CYP2B1 y a Cl_{50} de 0.192 ± 0.029 , 5.077 ± 0.321 , 9.495 ± 0.979 y 4.535 ± 0.092 μM para cada una de las enzimas respectivamente. DHB también es un inhibidor, aunque menos potente que BG ya que sus Cl_{50} son aproximadamente 10 veces menores que ésta última molécula. DHB presenta el siguiente orden de inhibición sobre las enzimas: CYP1A1>CYP2B2=CYP1A2>CYP2B1, con una Cl_{50} de 3.162 ± 0.153 μM (CYP1A1), 54.479 ± 1.751 μM (CYP1A2), 55.066 ± 3.638 μM (CYP2B1) y 48.195 ± 0.189 μM (CYP2B2).

10. PERSPECTIVAS

Para enriquecer al presente trabajo es importante ampliarlo mediante estudios de inhibición enzimática con naringenina, con el objetivo de evaluar su capacidad inhibitoria *in vitro* y así confirmar su posible efecto sobre CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2. Además de la realización de estudios de cinética enzimática para definir el tipo de inhibidores que son BG y DHB, y con ellos determinar su mecanismo de acción.

Finalmente, este estudio nos permite sugerir que BG y DHB poseen actividad antígenotóxica ya que presentan la capacidad de inhibir a enzimas involucradas en la activación de compuestos mutagénicos y carcinogénicos, para comprobar lo anterior es necesario realizar el estudio y caracterización del posible efecto antígenotóxico de BG y DHB con lo cual se abriría la posibilidad de su uso en la quimioprevención de enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer.

11. REFERENCIAS

1. Maquardt H., Schäfer S. G., McClellan RO. (1999). *Toxicology*. Academic Press, Wileisch F.
2. Hodgson E., Smart R.C. (2001), *Introduction to biochemical toxicology*. Third edition, Wiley-Interscience. USA. p. 134.
3. Guengerich F. P. (1992), *Cytochrome P450: advances and prospects*. The FASEB Journal. Vol.6, p. 667-668.
4. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. T., Vaz A. D. N. (1992), *Cytochrome P450: progress and predictions*. The FASEB Journal. Vol.6, p. 669-672.
5. Costas Loannides. (2005), *Xenobiotic metabolism an overview: Enzyme Systems that metabolize drugs and other xenobiotics*. John Wiley and Sons, LTD, USA. p. 1-29.
6. Ortiz de Montellano, P. (2005). *Cytochrome P450: Structure, mechanism and function*. 3th Edition, Plenum publishers, NY, USA. Chapter 1: Models and Mechanism of Cytochrome P450 Action; Chapter 7: Inhibition of Cytochrome P450 enzymes; Chapter 10: Human Cytochrome P450 enzymes.
7. Nerber D. W., Nelson D. R., Coon M.J., Estabrook R. W., Feyereisen R., Gunsalus I.C., Johson E. F., Loper J.C., Sato R., Waterman M. R., Waxman D. J. (1991). *The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature*. DNA Cell Biol. Vol 10, p. 1-14
8. Nelson D.R. , Kiymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C., Nebert D. W. (1996). *P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature*. *Pharmacogenetics*, Vol. 6, p. 1-42.
9. Hollenberg P. F. (1992). *Mechanisms of Cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiótic metabolism*. The FASEB Journal, Vol. 6, p.686-694.
- 10.Poulos T. L., Raag R., (1992). *Cytochrome P450cam:crystallography, oxygen activation and electron transfer*.The FASEB Journal, Vol. 6, p. 674-679.
- 11.Munro A. W., Girvan H. M., McLean K. (2007). *Variatons on a (t)heme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the Cytochrome P450 superfamily*. Nat Prod Rep, Vol. 24, p- 585-609.
- 12.Shimada T., Yamasaki H., Mimura Inui Y., Guenguerich F. P. (1994). *Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of*

- drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 japanese and 30 caucasians.* J Pharmacol Exp Ther, Vol 270, 414-423.
13. Rendic S. (2002). *Summary of information on human CYP enzymes: Human P450 metabolism data.* Drug Metab. Rev., Vol 34, p. 83-448
 14. Costas Loannides. (2005), *Cytochrome P450: Enzyme Systems that metabolize drugs and other xenobiotics.* John Wiley and Sons, LTD, USA. p. 33-55
 15. Prough R. A., Burke M. D., Mayer R. T. (1978). *Direct fluorometric methods for measuring mixed-function oxidase activity.* Meth Enzymol, Vol. 52, p. 372-377
 16. Bauer E., Guo Z., Ueng Y. F., Bell I. C., Guengerich F. P. (1995). *Oxidation of benzo [a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes.* Chem Res Toxicol, Vol. 8, 132-142
 17. Shou m., Krausz K. W., Gonzalez F. K., Gelboin H. V. (1996). *Metabolic activation of potent carcinogen dibenzo(a,h)anthracene by cDNA-expressed human cytochromes P450.* Arch Biochem Biophys, Vol. 328, p. 201-207.
 18. Shou m., Krausz K. W., Gonzalez F. K., Gelboin H. V. (1996). *Metabolic activation of potent carcinogen dibenzo(a,l)pyrene by human recombinant cytochromes P450, lung and liver microsomas.* Carcinogenesis, Vol. 17, p. 2429-2433
 19. Shimada T., Hayes C.L., Yamasaki H., Amin S., Hecht S. S., Guengerich F. P. (1996). *Activation of chemically diverse procarinogens by human cytochrome P4501B1.* Cancer Res, Vol. 56, p. 2976-2984
 20. Shimada T., Yamasaki H., Mimura M., Wakamiya N., Guengerich F. P. and Inui Y. (1996). *Characterization of microsoma cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal livers and lungs.* Drug Metab Dispos, Vol. 24, p. 515-522
 21. Merurio M. G., Shiff S. J., Galbraith R. A., Sassas S. (1995). *Expression of cytochrome P450 mRNAs in the colon and the rectum in normal human subjects.* Biochem Biophys Res Commun, Vol. 210, p. 350-355
 22. Kappas A., Alvares A. P., Anderson K. E., Pantuck E. J., Chang R. (1978). *Effect of charcoal-broiled beef on antipyrine and theophylline metabolism.* Pharmacol Ther, Vol. 23, p. 445-450.
 23. Lang N. P., Butler M. A., Massengill J., Lawson M., Stotts R. C., Mclurer-Jensen M. (1994). *Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., Vol. 3, p. 675-682.

24. Miles J. S., Spurr N. K., Gough A. C., Jowett T. T., McLaren A. W., Brook J. D., Wolf C. R. (1988). *A novel human cytochrome P450 gene (P450IIB): chromosomal localization and evidence for alternative splicing*. Nucl Acids Res, Vol. 16, p. 5738-5795
25. Inoue K., Negishi M., (2008). *Nuclear receptor CAR require Early Growth Response 1 to activate the human Cytochrome P450 2B6 gene*. The Journal of Biochemistry. p. 1-12
26. Guan S., Huang M., Chan E., Chen X., Duan W., Zhou S. (2007). *Genetic polymorphisms of Cytochrome P450 2B6 gene in Han Chinese*. Eur Jou Pharm Scien, Vol. 29, p. 14-21
27. Jacobson PA, Green K, Birnbaum A, Remmel R. P., (2002). *Cytochrome P450 isozymes 3A4 and 2B6 are involved in the in vitro human metabolism of thiotpea to TEPA*. Cancer Chemother Pharmacol. Vol. 49, p. 461–7
28. Escobar G. D. (2003), *La mezcla del cicloexanol y el albendazol como inductor de los Citocromos P450 en hígado de roedores*. Tesis Posgrado Ciencias Biológicas, UNAM.
29. Cerda J. J., Norma S. J., Sullivan M. P. (1994). *Inhibition of atherosclerosis by dietary pectin in microswine with sustained hypercholesterolemia*. Circulation, Vol. 89, p. 1247-1253
30. So F. V., Guthrie N., Chambers A. F., MOussa M., Carroll K. F. (1996). *Inhibitors of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices*. Nutr Cancer, Vol. 26, p. 167-181.
31. Bailey DG, Spence JD, Edgar B, Bayliff CD, Arnold JM. (1989). *Ethanol enhances the hemodynamic effects of felodipine*. Clin Invest Med. Vol. 12, p.357-362.
32. Castro W. V., Talcott S. M. Derendorf V. B., Butterweck V., (2006). *Variation of Flavonoids and Furanocoumarins in Grapefruit Juices: A Potential Source of Variability in Grapefruit Juice-Drug Interaction Studies*. J. Agric. Food Chem. Vol. 54, p. 249255
33. Fuhr U, Klitlich, Staib A. H., (1993). *Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man*. Br J Clin Pharmacol, Vol. 35, p. 431-436.
34. Xiao Dong S., Zhi Ping Z., Zhon Xiao W., Chong Shu C., Fattone C., Gatti G., D'urso S., Perucca E. (1999). *Possible enhancement of the first pass metabolism of*

- phenacetin by ingestion of grapefruit juice in chinese subjects.* Br J Clin Pharmacol, Vol. 48, p. 638-640
35. Fuhr U., Müller-Peltzer H., Kern R., Lopez Rojas P., Jünemann M., Hander S., Staib A. H. (2002). *Effects of grapefruit juice and smoking on verapamil concentrations in steady state.* Eur J Clin Pharmacol, Vol. 58, p. 45-52
36. Kane G.C., Lipsky J. J., (2000). *Drug-Grapefruit juice interactions.* Clin Proc. Vol. 75, p. 933-942.
37. Tassaneeyakul W., Guo L. Q., Fukuta K., Ohta T., Yamazoe Y., (2000). *Inhibition Selectivity of Grapefruit juice components on human Cytochrome P450.* Arch Biochem Bioph. Vol 378, No.2, p. 356-363.
38. Matsushima T., Sawamura M., Hara K., Sugimura T. (1976). *In vitro metabolic activation in mutagenesis.* Testing, p. 85
39. Maron D., Ames B., (1983). *Revised methods for the salmonella mutagenicity test.* Mutation research, Vol. 113, pág. 186-190.
40. Bradford M., (1976). *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, Vol. 72, pág. 248-254
41. Current Protocols in Cell Biology, John Wiley and Sons, 1998, pág. 6.2.1-6.2.20.
42. Burke M. D., Thompson S., Weaver R. T., Wolf C. R., Mayers R. T. (1994). *Cytochrome P450 specificities of alcoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver.* Bioch Pharm, Vol. 48, No. 5, p. 923-936.
43. Burke M. D., Mayer R. T., (1975). *Inherent specificities of purified Cytochromes P450 and P448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorfin deethylation.* Drug Metab Disp. Vol. 3, p. 245-253.
44. Burke M. D., Thompson S., Elcome C. R., Halpert J., Haaparanta T., Mayer R. T., (1985). *Ethoxy-, pentox-, and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced Cytochromes P450.* Bioch Pharmacol, Vol. 34, p. 3337-3345.
45. Rodriguez A. D., Prough R. A., (1991). *Induction of Cytochromes P4501A1 and CYP1A2 measurement of catalytic activities.* Methods Enzymol, Vol. 206, p. 425-431.
46. Edwards D., Bernier S., (1996). *Naringin and naringenin are not the primary CYP3A inhibitors in grapefruit juice.* Life Sciences, Vol. 59, No. 13, p. 1025-1030.

47. He K., Iyer K., Hayes R., Sinz M., Woolf T., Hollenberg, (1997). *Inactivation of cytochrome P450 3A4 by Bergamottin, a component of grapefruit juice*. Chem Res. Toxicol 1998, vol. 11, p. 252-259.
48. Bailey DG, Dresser GK, Kreeft JH, Munoz C, Freeman DJ, Bend JR., (2000). *Grapefruit-felodipine interaction: effect unprocessed fruit and probable active ingredients*. Clin. Pharmacol Ther. Vol. 68, p. 468-477.
49. Girenavar B., Poulouse S., Jayaprakasha G., Bhat N., Patil B., (2006). *Furanocoumarins from grapefruit juice and their effect on human CYP 3A4 and CYP1B1 isoenzymes*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, Vol. 14, p. 2606-2612.
50. Ueng Yune-Fang Y., Changl Y., Oda Y., Park S., Liao J., Lid M., Chen C., (1999). *In vitro and in vivo effects of naringin on cytochrome p450-dependent monooxygenase in mouse liver*. Life Sciences, Vol. 65, No. 24, p. 2591-2602.
51. Maish W.A., E.M. Hampton, T.L. Whitsett, J.D. Shepard and W.R. Lovallo (1996). *Influence of grapefruit juice on caffeine pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Pharmacotherapy Vol. 16, p. 1046-1052.
52. Baumgart A., Schmidt M., Schmitz H. J. Schrenk D., (2005). *Natural furanocoumarins as inducers and inhibitors of cytochrome P450 1A1 in rat hepatocytes*. Bioch Pharm, Vol. 69, p. 657-667.
53. Kent U. M., Lin H., Kathleen R. N., Harris D., Hollenberg P. F., (2006). *Metabolism of Bergamottin by Cytochromes P450 2B6 and 3A5*. J. Pharma. Exper. Therap. Vol. 318, p. 992-1005.
54. Lin H., Kent U. M., Hollenberg P. F., (2005). *The Grapefruit Juice Effect Is Not Limited to Cytochrome P450 (P450) 3A4: Evidence for Bergamottin-Dependent Inactivation, Heme Destruction, and Covalent Binding to Protein in P450s 2B6 and 3A5*. J. Pharma. Exper. Therap. Vol. 313, p. 154-164.

12. APÉNDICE

En la figura 20 se muestra la inmunodetección de CYP1A1 y CYP1A2 en proteína microsomal hepática de ratas tratadas con β -NF/FB. En el carril 2 se observan dos bandas correspondientes a CYP1A1 (59 KD) y CYP1A2 (58 KD).

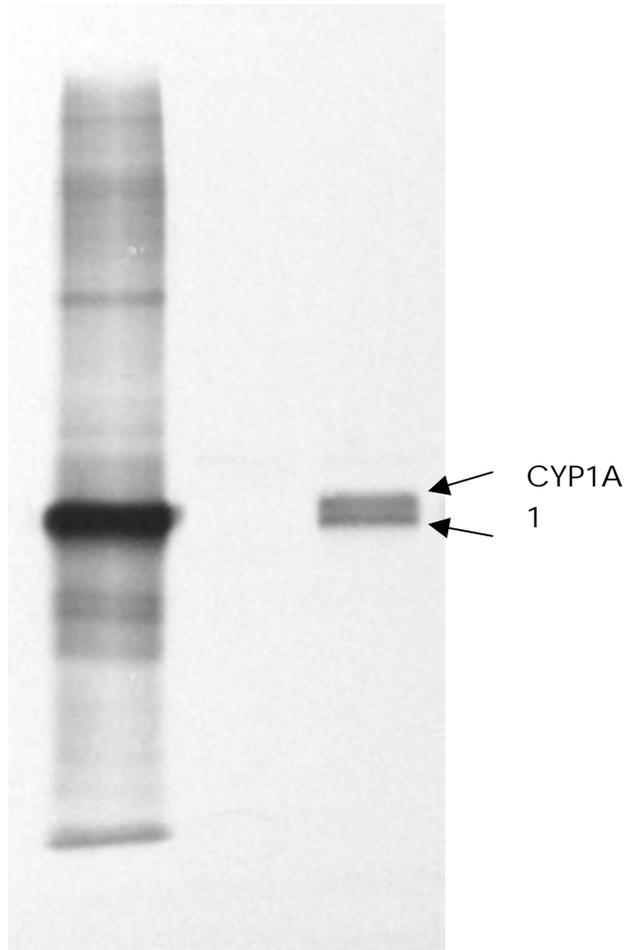


Fig. 21 Inmunodetección de CYP1A1 y CYP1A2. Carril 1: CYP1A1 semipuro de rata, control positivo (15 μ g); carril 2: proteína microsomal de ratas inducidas con β -NF/FB (0.03 μ g). Las muestras fueron sometidas a electroforesis, luego transferidas a membranas de nitrocelulosa y expuestas a un anticuerpo policlonal anti-rata desarrollada en contra CYP1A1 y CYP1A2.

En la fig. 21 se muestra la evaluación del efecto de BG sobre la fluorescencia de la resorufina en tres diferentes concentraciones de BG, 0.5, 2 y 16 μM . Obtuvimos que esta molécula no afecta la fluorescencia de la resorufina lo que nos asegura que los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición enzimática se deben al efecto de inhibición que la BG presenta sobre las enzimas evaluadas y no por su interferencia con la fluorescencia de la resorufina.

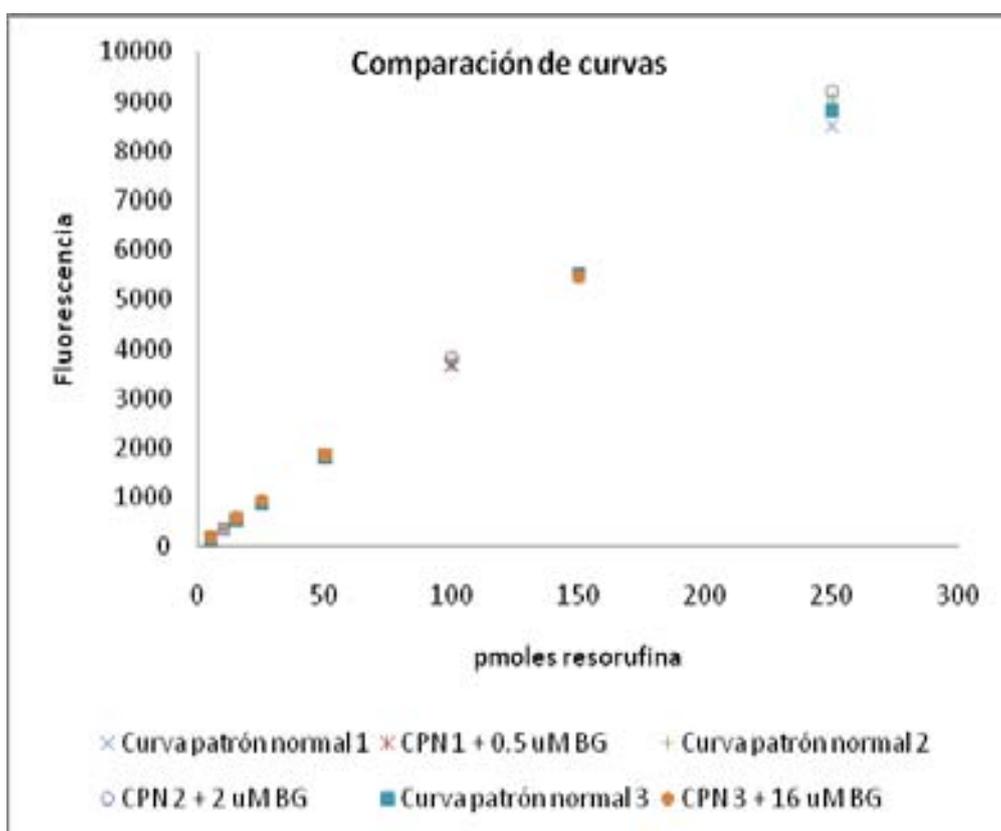


Fig 22. Efecto de BG sobre la fluorescencia de la resorufina. Se realizó por triplicado la curva patrón de resorufina con y sin BG a tres diferentes concentraciones de 0.5, 2 y 16 μM de ésta molécula.

En la fig. 22 se muestra la evaluación del efecto de DHB sobre la fluorescencia de la resorufina en tres diferentes concentraciones de DHB, 0.5, 2 y 16 μM . Obtuvimos que esta molécula no afecta la fluorescencia de la resorufina lo que nos asegura que los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición enzimática se deben al efecto de inhibición que la DHB presenta sobre las enzimas evaluadas y no por su interferencia con la fluorescencia de la resorufina.

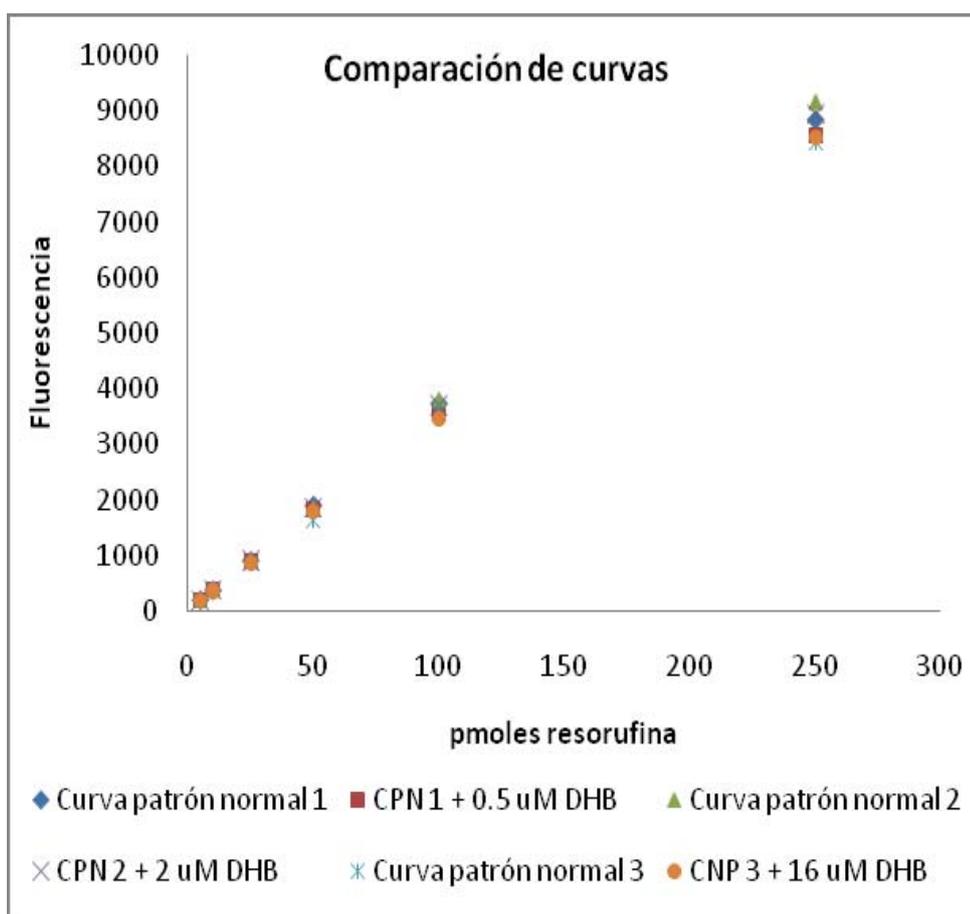


Fig 23. Efecto de DHB sobre la fluorescencia de la resorufina. Se realizó por triplicado la curva patrón de resorufina con y sin DHB a tres diferentes concentraciones de 0.5, 2 y 16 μM de ésta molécula.