



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN DE LA BERGAMOTINA
COMO INHIBIDOR DE CITOCROMO P450 (CYP) Y
DETERMINACIÓN DE SU EFECTO
ANTIGENOTÓXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
SITLALI DEL R. OLGUIN REYES

Tutor: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE



MÉXICO, D. F.

Diciembre 2010



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.

CARACTERIZACIÓN DE LA BERGAMOTINA COMO INHIBIDOR DE CITOCROMO P450 (CYP) Y DETERMINACIÓN DE SU EFECTO ANTIGENOTÓXICO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. J. Javier Espinosa Aguirre en el laboratorio Toxicología Ambiental, en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. J. Javier Espinosa Aguirre	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Regina D. Montero Montoya	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la Bióloga Sandra Luz Hernández en los experimentos de genotoxicidad-prueba de Ames.

Se reconoce la asesoría técnica del MVZ. Luis Serrano García en los experimentos de genotoxicidad-prueba de micronúcleos.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Georgina Garza Ramos	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Emilio Rojas del Castillo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt B.	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, porque este trabajo es cosecha de la semilla de educación que ellos han sembrado en mí. Gracias por su amor y dedicación. Los amo.

A un gran maestro, al Dr. Espinosa. Por ser la columna que sostiene e hizo posible el término de éste proyecto. Mi más sincero agradecimiento no sólo por sus enseñanzas académicas sino también de vida. Gracias.

Al Dr. Alejandro Fernández y a la Dra. Regina Montero, por su paciencia, apoyo y enseñanza. Gracias.

A mis hermanos, que se han multiplicado en los últimos años. A Ñahñu, Nantzi, Marisol y Román, gracias por su paciencia y apoyo. Los quiero.

Por supuesto no me olvido de ti, Dgni, mi hermana querida. Gracias por tus oraciones y el gran apoyo que siempre me has dado. Te extraño mucho.

A mi prima querida, por consentirnos con la comida tan rica que nos manda. Gracias Junita. Te quiero.

A Rosita fresita, por brindarme siempre un lugar lo más parecido a un hogar en esta ciudad. Gracias amiga.

Por su apoyo en todo momento. Por escucharme, tolerarme, quererme, acompañarme en las horas de desestrés y ser parte esencial de mi desarrollo académico, mi profundo agradecimiento a la "élite" (Cynthia Maria, Cynthia Paola, Ismael, Lalo y Mariana) y a Tungsteno. Los quiero mucho.

A mis amigos de hoy y siempre, por apoyarme, escucharme, compartir comidas, cine, viajes y más. A Chrissi, Eric, Anita, Natita, Roha, Javis, Tigger, Patito.

Gracias al Dr. Rafael Camacho Carranza, por sus críticas y consejos para la presentación de este trabajo. Gracias por compartir con nosotros todos sus conocimientos científicos y culturales.

A los integrantes del laboratorio C206 del departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, muchas gracias por su apoyo para la realización de éste proyecto.

Contenido

Carátula	1
Reconocimientos.....	2
Agradecimientos.....	3
Índice.....	4
Resumen	5
Introducción	6
Citocromo P450 (CYP)	10
Mecanismo catalítico de CYP	11
Inhibición de CYP	13
CYP1A1	15
Benzo [a] pireno (BaP) como sustrato e inductor de CYP1A1.....	17
Evaluación de genotoxicidad	19
Prueba de micronúcleos.....	19
Ensayo de mutagenicidad en <i>Salmonella typhimurium</i>	22
Jugo de toronja y su interacción con CYP	24
Bergamotina (BG) como agente inhibidor de CYP	26
Planteamiento de problema	28
Hipótesis	29
Objetivos	29
Materiales y métodos	30
Resultados	34
Discusión	41
Conclusiones	45
Perspectivas	45
Apéndice	46
Referencias	49

RESUMEN

Uno de los principales sistemas enzimáticos participantes en el metabolismo de xenobióticos es el citocromo P450 (CYP), el cual está conformado por familias de enzimas involucradas en el metabolismo de fase I, a su vez, éstas se dividen en subfamilias, una de las cuales es CYP1A, quien participa en la biotransformación de un grupo de compuestos representativos de la contaminación ambiental, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs).

El CYP1A1 forma parte de la subfamilia 1A y metaboliza una gran variedad de compuestos tipo PAHs, como benzo[a]pireno (BaP), 3-metilcolantreno (3-MC), 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno, entre otros. Como resultado de dicho metabolismo se obtienen metabolitos altamente reactivos capaces de ocasionar daño celular a través de su interacción con macromoléculas como proteínas, lípidos y ADN.

La inhibición de CYP1A1 permite que tales metabolitos reactivos no se generen y por lo tanto se previene el daño por la interacción de éstos con macromoléculas biológicamente importantes.

Recientemente determinamos que componentes del jugo de toronja como la bergamotina (BG) y 6',7'-dihidroxi-bergamotina (DHB), inhiben la actividad de enzimas de las subfamilias 1A y 2B. En específico, observamos que la BG es un potente inhibidor de CYP1A1 con una concentración de inhibición del cincuenta por ciento (CI_{50}) de actividad enzimática de $0.19 \mu\text{M}$.

El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar el tipo de inhibición que BG ejerce sobre CYP1A1 y en base a esto, determinar su participación en la prevención del daño mutagénico y genotóxico.

Realizamos estudios de cinética de inhibición de CYP1A1 por BG, variando la concentración del inhibidor. Se encontró que la BG es un inhibidor competitivo de CYP1A1 con una $K_i=5.43 \mu\text{M}$. Ya que la BG es un inhibidor competitivo de CYP1A1 evaluamos su capacidad antigenotóxica ante un potente mutágeno que es sustrato de esta enzima, el benzo[a]pireno (BaP). La BG ($262 \mu\text{g/Kg}$), presentó tendencia a la protección contra el daño genotóxico ocasionado por el BaP, evaluado mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica de ratón. Para complementar la prueba de antigenotoxicidad *in vivo*, realizamos un prueba *in vitro*, el ensayo de antimutagenesis en *Salmonella typhimurium* deficiente en histidina (His^-), en los cuales obtuvimos que la BG disminuyó la capacidad mutagénica de BaP y de 3-metilcolantreno. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la BG puede ser considerada un agente quimioprotector ante la inducción de daño genotóxico por compuestos procarcinogénicos que son sustrato de CYP1A1.

INTRODUCCIÓN

Diariamente estamos expuestos a distintos compuestos químicos sintéticos o de origen natural que están presentes en el ambiente, en los alimentos o en lugares de trabajo. A los compuestos ajenos a nuestro organismo que no participan en la producción de energía, construcción de nuevos tejidos, o como mensajeros o cofactores, se les denomina xenobióticos. Una gran variedad de xenobióticos suelen ser lipofílicos y cuando ingresan a nuestro organismo este no los puede eliminar fácilmente, así que lleva a cabo un proceso de transformación que los metaboliza a compuestos hidrofílicos facilitando su excreción. En dicho proceso participan sistemas enzimáticos que metabolizan a los xenobióticos disminuyendo su concentración y el riesgo de su acumulación.

El proceso de transformación de los compuestos lipofílicos a hidrofílicos ocurre en dos fases metabólicas. Durante la fase I, llamada de funcionalización, se realiza 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 éstas 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 sólo 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, dependiendo de su estructura química será su mecanismo de eliminación ya sea por reacciones de funcionalización o conjugación o ambas (Fig. 1).

La mayoría de los sistemas enzimáticos que contribuyen al metabolismo de xenobióticos en ambas fases, 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 compuestos

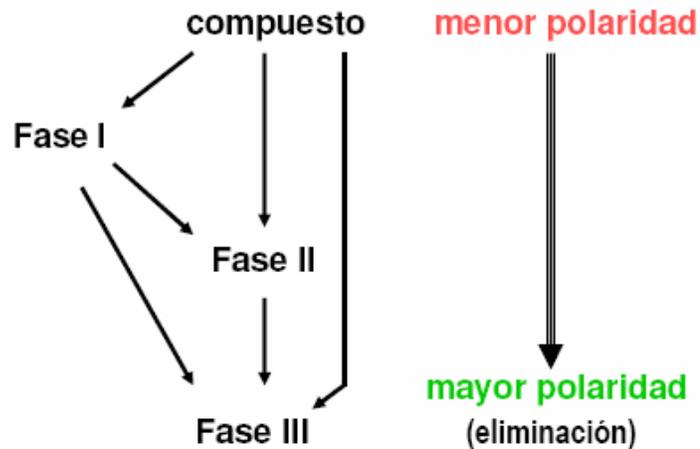


Fig. 1. Metabolismo de compuestos. Hodgson y Smart (2)

Como resultado de la exposición a xenobióticos no sólo actuarán los sistemas enzimáticos de fase I y II para su detoxificación y eliminación, en algunos casos, las reacciones de funcionalización producirán metabolitos altamente electrofílicos capaces de reaccionar con macromoléculas biológicamente importantes como el ADN, generando daños irreparables como la ruptura de cromosomas. Además de la ruptura de cromosomas también se pueden generar mutaciones. La acumulación de estos daños es característica del inicio del proceso de carcinogénesis.

El cáncer es un problema de salud internacional en constante crecimiento, hasta el momento no se han tenido grandes logros en la disminución de muertes por esta enfermedad. La prevención se sugiere como principal estrategia para contender al cáncer. Como tácticas de prevención se ha propuesto: 1) reducir la exposición a agentes carcinogénicos, 2) dar seguimiento clínico a los sujetos con predisposición genética, 3) proveer quimioprotección a través de la dieta o medios sintéticos (3).

Se define como quimioprotección a la supresión, arresto o reversión del proceso de carcinogénesis, principalmente en sus etapas tempranas, por agentes naturales o sintéticos. Sin embargo, el término "agente quimioprotector" se utiliza para aquellos agentes naturales o sintéticos que no sólo previenen el cáncer sino que también lo curan. En general se ha clasificado a los agentes quimioprotectores en:

- 1) Agentes inhibidores de la formación de carcinógenos. Son aquellos que evitan la formación endógena de nitrosaminas a partir de aminas secundarias.

- 2) Agentes bloqueadores. En la iniciación de la carcinogénesis hay varios niveles de intervención para su bloqueo, como la activación metabólica de procarcinógenos, inducción de enzimas de citocromo P450, inducción de enzimas de fase II, disminución de radicales libres y electrófilos e incremento de la reparación de ADN.
- 3) Agentes supresores. Son aquellos agentes que puedan contender con la promoción y progresión de un tumor. La clasificación de este tipo de compuestos es más complicada debido a que no se conocen bien los mecanismos de promoción y progresión de un tumor, sin embargo, por mencionar algunos ejemplos de agentes supresores tenemos a los inductores de la diferenciación celular, moduladores de la transducción de señales, moduladores de factores de crecimiento y hormonales, inhibidores de la actividad de oncogenes, inductores de apoptosis, restauradores de la respuesta inmune, entre otros (4).

Por su intervención en la etapa inicial del proceso de carcinogénesis, son de nuestro interés los agentes bloqueadores, en específico aquellos que actúen inhibiendo o induciendo al sistema citocromo P450 y enzimas de fase II, ya que estos sistemas enzimáticos participan en el metabolismo de una amplia variedad de compuestos carcinogénicos y procarcinogénicos. Las enzimas de CYP se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo, sin embargo, el hígado, tracto gastrointestinal, pulmón y riñón son los órganos más expuestos a xenobióticos.

En estudios de protección a efectos carcinogénicos por compuestos ambientales trataron a animales con los carcinógenos benzo[a]pireno, acetaminofluoreno, dimetilaminoestilbeno, uretano, aflatoxina B1, entre otros, a la par de compuestos inductores de CYP. Los resultados mostraron que se favorece la detoxificación de éstos carcinógenos del organismo por lo cual a los inductores de enzimas de CYP se les ha considerado como agentes quimiprotectores (5).

Por otro lado, a los inhibidores de CYP también se les ha considerado quimiprotectores debido a la evidencia de inhibición del metabolismo de procarcinógenos y por lo tanto la disminución de su efecto carcinogénico. Un ejemplo es el ácido elágico que inhibe la activación de compuestos como benzo[a]pireno, N-nitrosometilbencilamina, entre otros, a través de la inhibición de enzimas como CYP3A1, CYP2A2, CYP2C11, CYP2B1, CYP2C6 y CYP1A1, protegiendo así de la formación de aductos, mutaciones, aberraciones cromosómicas y tumores por dichos compuestos (6, 7).

La inducción de enzimas de fase II es también una importante estrategia de prevención ya que no sólo favorecen la detoxificación de compuestos carcinogénicos sino que también algunas son atraparoras de especies reactivas de oxígeno y compuestos electrofílicos. Un ejemplo de esto

es el sulfurofano el cual es inductor de la glutatión-S-transferasa favoreciendo la protección de cáncer de mama en ratones por carcinógenos prototipo como 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (8).

A los compuestos en los alimentos que no son nutrientes se les denomina fitoquímicos. El ácido elágico y el sulfurofano son dos ejemplos de una gran variedad de fitoquímicos con propiedades quimioprotectoras. De los más estudiados son los carotenoides, polifenoles y alcaloides, en específico, taninos, estilbenos, cumarinas y flavonoides, debido a sus efectos en enzimas de CYP, enzimas antioxidantes, además de también ser atrapadores directos de especies reactivas de oxígeno y compuestos electrofílicos.

Muchos de los fitoquímicos presentes en la dieta han sido propuestos como agentes quimioprotectores y algunos han logrado pasar a fases clínicas I y II (9, 12), por lo cual su estudio sigue siendo parte fundamental de la búsqueda de nuevos agentes para la quimioprevención, y, dado que tenemos una dieta tan diversa, es imperioso tener conocimiento de todos los efectos que los fitoquímicos pudieran tener sobre el organismo con la finalidad de hacer correcto uso de sus propiedades.

CITOCROMO P450 (CYP)

En 1958, por primera vez se detectó espectrofotométricamente al sistema enzimático 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 (13, 14).

De las enzimas de fase I, las enzimas de CYP son un sistema de familias enzimáticas que se encuentran involucradas 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 (15). Adicionalmente, ahora se sabe que el 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 eletrofilicas que causan daño biológico (15).

En el humano se han reportado cerca de 57 isoformas del sistema de CYP las cuales presentan diferencias de especificidad catalítica y de tejido en el cual se expresan (16). Éstas 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. Nerburt (17), en el cual los CYPs con 40% o más de identidad en secuencia de aminoácidos son incluidas en la misma familia, designadas con un número arábigo, CYP1 y aquellas con más del 55% de identidad son incluidas en la misma subfamilia, designadas con una letra en mayúscula, CYP1A. A los genes individuales se les asigna arbitrariamente un número, CYP1A1 (18). Las principales familias involucradas en el metabolismo de xenobióticos son CYP1, CYP2 y CYP3.

En mamíferos, los CYPs 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 (15).

Los CYPs oxidantes de xenobióticos se expresan 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 (15).

MECANISMO CATALÍTICO DE CYP

Los CYPs, como ya se mencionó, son hemoproteínas que catalizan una reacción de oxidación que 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 esta 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. 2. (20).

En la figura 2, 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), también están indicados.

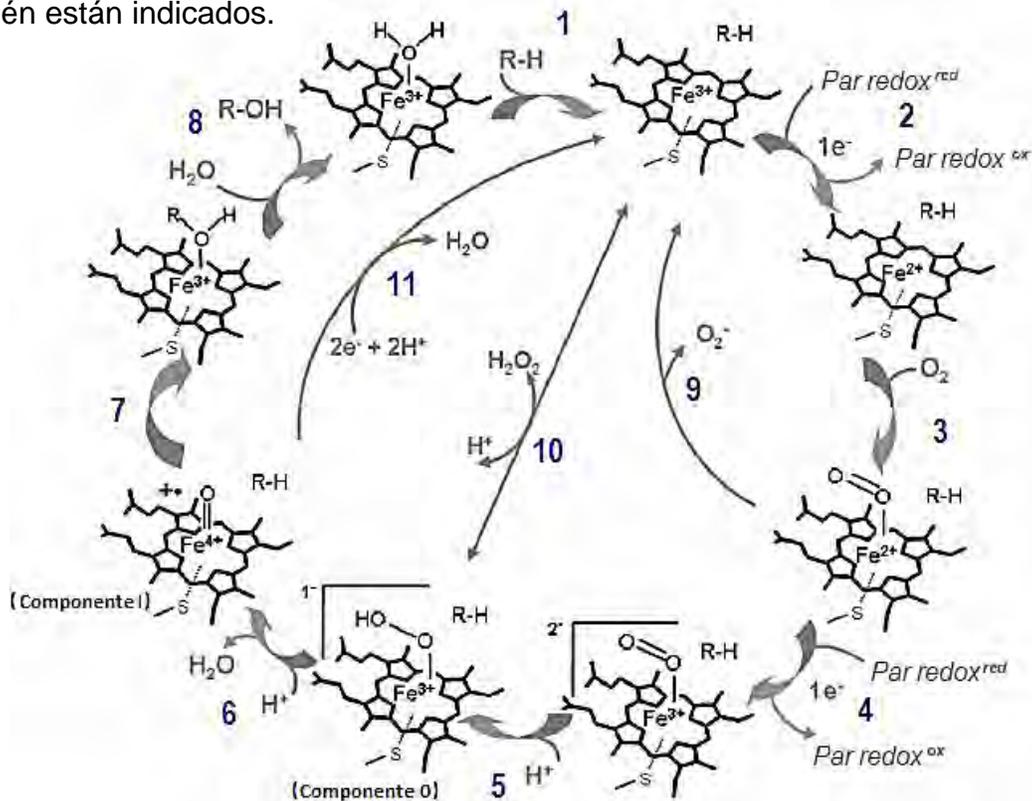


Fig. 2. Ciclo catalítico de citocromo P450. Munro A. (21)

En el primer paso **(1)**, la unión del sustrato conduce al desplazamiento del ligando (agua). Esto tiene como efecto un cambio en el equilibrio 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 por el 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 ruptura del enlace del oxígeno molecular 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)**. Por otro lado, la especie oxi-ferroso puede no continuar con el ciclo y retomar al CYP-férrico con la producción de peróxido **(9)**. El componente 0 puede no seguir el ciclo y producir peróxido de hidrógeno **(10)**. Por último 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 (21).

INHIBICIÓN DE CYP

El citocromo P450 (CYP) se encuentra en una gran variedad de organismos catalizando reacciones de oxidación importantes en rutas biosintéticas y metabólicas, también es parte del sistema de detoxificación de fitoquímicos y de una gran variedad de xenobióticos como fármacos y compuestos carcinogénicos.

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 fuerte inhibición que sin embargo es reversible (16).

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 son algunos 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-alkilación de alguna de sus porfirinas (16).

Hay tres tipos básicos de inhibición reversible: 1) competitiva, en la cual el inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima. Este tipo de inhibición es la más común cuando se tienen a dos sustratos diferentes de la misma enzima. En el caso de la inhibición competitiva clásica en la que el inhibidor no es sustrato de la enzima, la $K_{m_{ap}}$ para el sustrato incrementa en presencia del inhibidor, sin embargo no hay cambio en la V_{max} . En el gráfico de Lineweaver-Burk, la inhibición competitiva se observa como un punto de intersección de todas las líneas en el eje de las ordenadas (fig. 3a). 2) Inhibición acompetitiva (también llamada incompetitiva), el inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima, pero también podrá unirse al complejo sustrato-enzima y el sustrato a su vez también podrá unirse al complejo

inhibidor-enzima resultando ambas vías en un complejo sustrato-enzima-inhibidor no productivo. En este caso, tanto V_{max} como K_m disminuirán proporcionalmente por lo que la relación V_{max}/K_m permanece constante. En el gráfico de Lineweaver-Burk se observarán líneas paralelas a diferentes concentraciones del inhibidor (fig. 3b). 3) Inhibición no competitiva, el inhibidor se une

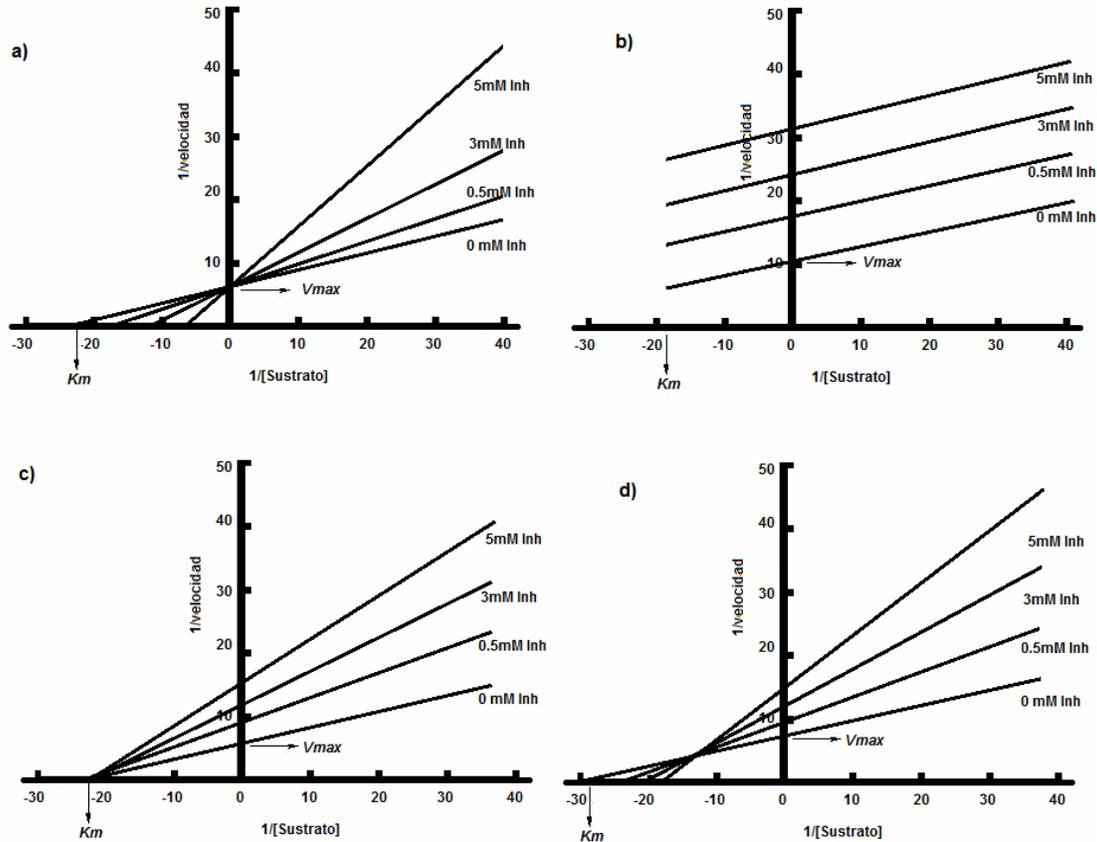


Fig.3 Gráficos de $1/v$ vs $1/[Sustrato]$ (Lineweaver-Burk) de los tipos de inhibición reversible. a) Competitiva; b) Acompetitiva; c) No competitiva; d) Mixta.

en un sitio diferente al sitio activo de la enzima y no interfiere en la unión del sustrato. Sin embargo el complejo que se forma, Sustrato-Enzima-Inhibidor, no es productivo, es decir, no tendrá actividad catalítica. En este caso, se observará una disminución de la V_{max} sin cambio alguno en la K_m . En el gráfico de Lineweaver-Burk se observa el punto de intersección de todas las líneas en el eje de las abscisas (fig. 3c). Este tipo de inhibición no es muy común y los ejemplos de esta se observan raramente. 4) Inhibición mixta, es básicamente la misma que la no competitiva con la diferencia de que una vez formados los complejos sustrato-enzima o inhibidor-enzima la afinidad con la que se podrán unir el inhibidor o el sustrato, respectivamente, será diferente a la afinidad por la enzima libre, por lo tanto variarán tanto la K_m como V_{max} sin proporcionalidad alguna (fig. 3d).

CYP1A1

En el humano existen 57 isoformas de CYP siendo las más importantes CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 (éstas tres en conjunto metabolizan aproximadamente el 75% de los fármacos conocidos), CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2E1, CYP2B6, CYP2C8 (éstas últimas metabolizan al 25% restante), debido a su importancia en el metabolismo de fármacos contribuyendo en conjunto más que cualquier otro grupo enzimático en este proceso fig. 3 (2, 16).



Fig. 3. Participación de CYP en el metabolismo de compuestos. Hodgson y Smart (2).

Las subfamilias CYP1A y CYP2B han sido de mucho interés en la carcinogénesis química, ya que metabolizan a varios xenobióticos generando moléculas altamente eletrofilicas capaces de interaccionar con macromoléculas de interés biológico como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El CYP1A1 es una isoenzima de la subfamilia CYP1A que se expresa a niveles poco apreciables en el hígado fetal haciéndose evidente hasta que el hígado es adulto o 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 se clasifica como no constitutiva, ya que necesita de compuestos inductores para que dicha expresión sea cuantificable.

Para el estudio de su actividad enzimática, la reacción clásica usada es la O-dealquilación de la 7-etoxirresorufina produciendo a la resorufina, un compuesto fluorescente cuantificable (22).

Se ha descrito que aminas aromáticas heterocíclicas y policíclicas son activadas por esta enzima, es decir son sustratos, pero también tienen la capacidad de inducir la expresión del gen de CYP1A1 a través de la interacción con el receptor de hidrocarburos aromáticos policíclicos (AhR), el cual se encuentra en el citoplasma interaccionando con las proteínas chaperonas Hsp90, p23 y XAP2. Cuando el compuesto tipo PAH interacciona con el AhR este se libera de las proteínas chaperonas y se traslada al núcleo en donde formará un complejo con el traslocador del

receptor de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Arnt). En su conjunto el complejo AhR-ligando (PAH)-Arnt será capaz de reconocer la secuencia específica del elemento de respuesta a xenobióticos en la región regulatoria de *CYP1A1* e inducir su transcripción (23-26).

Poco se sabe del sitio activo de *CYP1A1*, los modelos recientes de sustratos e inhibidores sugieren que sus ligandos son moléculas planares. Los compuestos que lo inhiben también actúan sobre *CYP1A2* y *CYP1B1*, entre los cuales frecuentemente se utiliza a la α -naftoflavona (α -NF), siendo más efectiva sobre *CYP1A2*. Entre sus inhibidores selectivos podemos citar al 1-(1'-Propinil)pireno y el 2-(1-propinil)fenantreno (27).

El *CYP1A1* parece no jugar un papel importante en el metabolismo de fármacos, ya que debido a su localización y tasa de expresión no altera significativamente la farmacocinética de medicamentos. Sin embargo, ciertos trabajos en modelos animales muestran un papel importante en la carcinogénesis química ya que algunos de sus inductores suelen 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.

Se ha relacionado a esta enzima con cáncer renal en hámster macho debido a su participación en el metabolismo de estradiol (28, 29). También metaboliza el 7,12-dimetilbenzo[a]-antraceno generando metabolitos iniciadores de tumor epidérmico en piel de ratones (30).

BENZO[a]PIRENO COMO SUSTRATO E INDUCTOR DE CYP1A1

Entre las subfamilias que conforman a la superfamilia de enzimas de CYP, resaltan las subfamilias CYP1A y CYP1B debido a que metabolizan a compuestos del tipo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), aminas aromáticas policíclicas (PAA) y bifenilos policlorinados (PB). El ser humano diariamente se expone a compuestos tipo PAH ampliamente distribuidos en la naturaleza, en alimentos cocinados al carbón, aceites reutilizados, productos de combustiones incompletas en industrias, escapes de automóviles, etc. y son importantes por ser altamente carcinogénicos. Debido a lo anterior, la inhibición de éstas enzimas resulta de suma importancia ya que pueden ser blanco terapéutico de agentes anticancerígenos y de prevención por una parte, y por otra, también puede favorecer interacciones fármaco-fármaco.

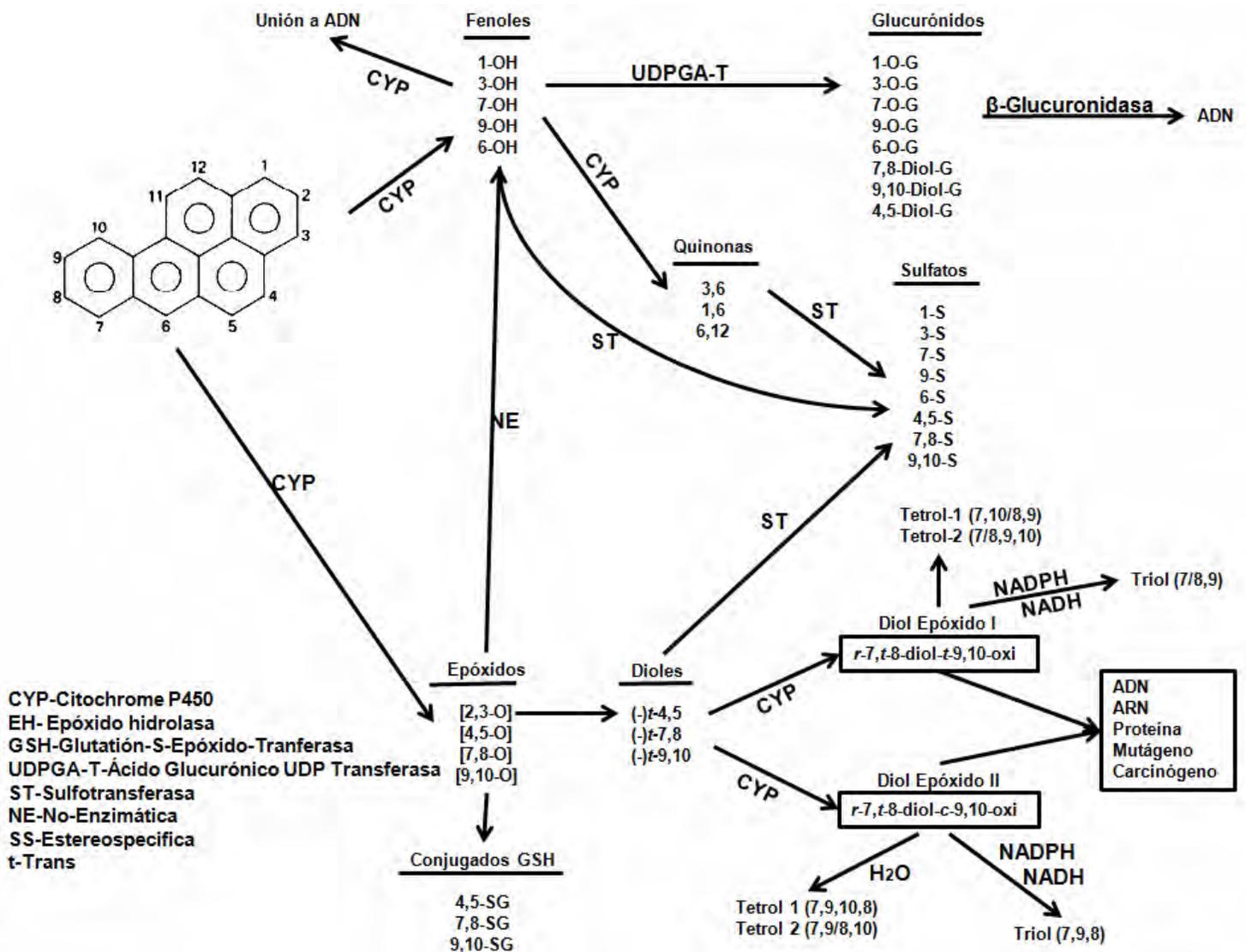


Figura 4. Metabolismo de BaP (31).

Los PAHs, por sus características estructurales, son compuestos lipofílicos por lo cual son biotransformados a compuestos solubles en agua para hacer posible su excreción. Las isoformas CYP1A1 y CYP1B1 participan en el proceso de transformación de estos compuestos generando algunos metabolitos fáciles de excretar y otros con propiedades eletrofílicas iniciadores del proceso carcinogénico.

El prototipo de los compuestos tipo PAH es el benzo[a]pireno (BaP), compuesto relacionado con cáncer de pulmón debido a su presencia en el humo del cigarro (32). Después de ser absorbido y transportado, su activación es llevada a cabo principalmente por el CYP1A1 al cual induce mediante el receptor de hidrocarburos aromáticos. La unión del BaP con el receptor, genera un complejo ligando-receptor que traslocará al núcleo interactuando con el elemento de respuesta a xenobióticos (XRE por su nombre en inglés), modulando la expresión del CYP1A1 además de otros genes.

Después de dos pasos de oxidación, el BaP da origen al (+)-anti-B(a)p-7,8-dihidrodiol-9,10-epoxido, que es el principal metabolito mutagénico y carcinogénico con capacidad de reaccionar con el ADN, particularmente con dGuo (deoxiguanósido) generando aductos y con esto mutaciones así como rompimiento de cromosomas, que en su conjunto generan inestabilidad genética lo cual permite la iniciación de tumor (33). En la fig. 5, se muestran las vías del metabolismo de BaP, ilustrando a otras enzimas además del CYP involucradas en este proceso (31).

Una prueba ampliamente utilizada para la determinación de genotoxicidad por parte del BaP es la prueba de micronúcleos, ya sea en médula ósea de ratas y ratones o en sangre periférica de ratones. En un estudio en el que participaron varios grupos de investigación (34), probaron cuatro dosis de BaP (62.5, 125, 250 y 500 mg/Kg), sobre dos distintas cepas de ratones, se determinó que 48 horas después de la administración de BaP se tiene el pico máximo de incidencia de micronúcleos realizando un conteo de 1000 NE (eritrocitos normocromáticos) en cualquiera de las dosis evaluadas, entre éstas dosis la que obtuvo mayor frecuencia de micronúcleos fue 250 mg/Kg. Por otro lado, la frecuencia de micronúcleos fue dependiente de la dosis con excepción de 500 mg/Kg, con la cual se obtuvieron frecuencias similares a las obtenidas a 250 mg/Kg. El efecto genotóxico del BaP se debe principalmente a su metabolismo por CYP1A1.

EVALUACIÓN DE GENOTOXICIDAD

Debido a la gran cantidad de compuestos químicos existentes y los que se generan día con día que pueden causar daño al material genético de los organismos, es necesario el uso de pruebas que permitan hacer una evaluación rápida y eficiente de aquellos compuestos exógenos a los organismos que causen daño genotóxico. Se denomina genotóxico a un compuesto químico que causa directa o indirectamente daño al ADN, el cual se traduce en mutaciones y/o pérdida de material genético que puede o no desembocar en cáncer.

Las pruebas de toxicidad genética son llevadas a cabo de forma rutinaria para la evaluación de compuestos potencialmente peligrosos para el ADN como los carcinógenos genotóxicos y los mutagénicos. Dichas pruebas comprenden la llamada prueba de Ames, la determinación de aberraciones cromosómicas en células eucariontes y algunas veces el ensayo de mutación en células eucariontes, como pruebas *in vitro*. Las pruebas *in vivo* recomendadas son la determinación de frecuencia de micronúcleos (MN) y la síntesis de ADN no programada en hígado (UDS). Debido a sus limitaciones, las pruebas *in vitro* pueden generar resultados falsos positivos o negativos que dificultan su extrapolación a organismos completos y es por ello que se deben complementar con una prueba *in vivo*. Por la sencillez, rapidez del ensayo y buena correlación con toxicidad genética (por exposición del daño cromosomal de los compuestos probados), el ensayo de micronúcleos (MN) es el ensayo *in vivo* más recomendado.

- Prueba de micronúcleos

La prueba de MN es una prueba *in vivo* rápida y eficiente para la determinación de daño cromosomal generado por algunos compuestos químicos. Inicialmente Heddle (35) desarrolló esta prueba como alternativa pues la mejor manera para determinar si un compuesto era mutagénico o peligroso para el material genético era evaluar los cambios cromosomales. Esto se hacía examinando a los cromosomas mitóticos durante la metafase, lo cual resultaba tedioso y necesitaba de buena experiencia para llevar a cabo la técnica. Basándose en el hecho de que los mamíferos roedores como ratones y ratas tienen médula ósea, al igual que el humano, y que en esta se lleva a cabo proliferación celular de manera continua de tal forma que ante la exposición a un compuesto que cause daño cromosomal el efecto podría ser observable rápidamente en éstas células. Ante este hecho, Heddle observó que se podía determinar en médula ósea daño cromosómico cuantificando la frecuencia de MN. Los MN son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que se forman en el citoplasma ante el daño por un agente químico. Se

forman durante la anafase como pequeños agregados de ADN de forma redonda ovalada bien definidos que permanecen allí haciendo posible su rápida detección y cuantificación. Existen varios orígenes de los micronúcleos como son: fragmentos acéntricos, cromosomas multicéntricos, por daño al huso mitótico o por daño al cinetocoro, pero todos se generalizan como daños cromosomales que se traducen en la formación de MN. Otros orígenes posibles son la cariorrexis y la gemación de núcleos, aunque el micronúcleo generado no es debido propiamente a daño cromosomal por ello éstos cuerpos formados no son tomados en cuenta como micronúcleos. los fragmentos de cromosoma con estos orígenes no son tomados en cuenta como micronúcleos debido a que su origen no es propiamente por daño cromosomal. Fig. 5 (36).

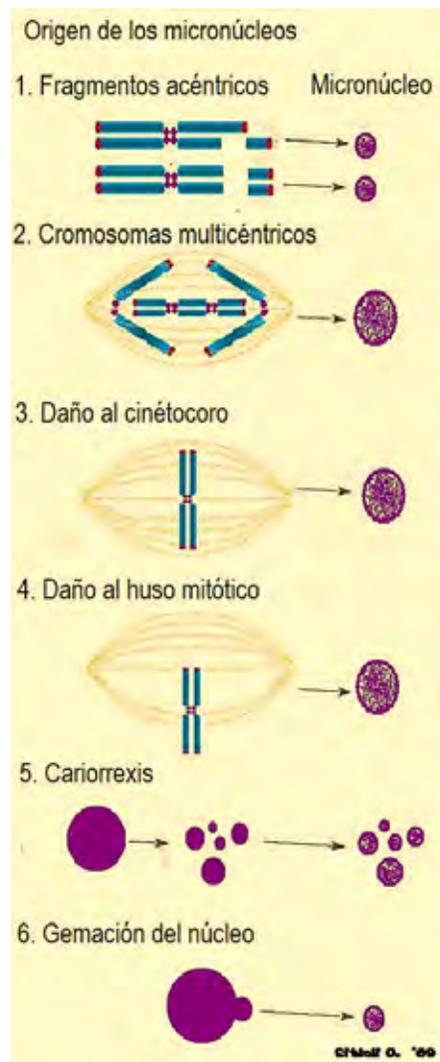


Fig. 5. Origen del micronúcleo y de estructuras que parecen micronúcleos. Adaptado de W.U. Müller y C. Streffer. (36), cap. 2, pág. 6)

Las desventajas que presenta la prueba de micronúcleos en médula ósea son el sacrificio del modelo de estudio para la obtención del material biológico necesario, y si consideramos un

estudio temporal, el multimuestreo no se podría llevar a cabo. En 1980 McGregor y colaboradores (37) desarrollaron un nuevo método para la evaluación de MN *in vivo*, este permite un multimuestreo y el procesamiento de la muestra resulta más sencillo que el de médula ósea. Dado que el bazo de los ratones no lleva a cabo la filtración celular de los MN formados en los eritroblastos de médula ósea, éstos pueden ser observados en eritrocitos policromáticos de sangre periférica, este método además de permitir el multimuestreo, tiene tanta sensibilidad como el de médula ósea.

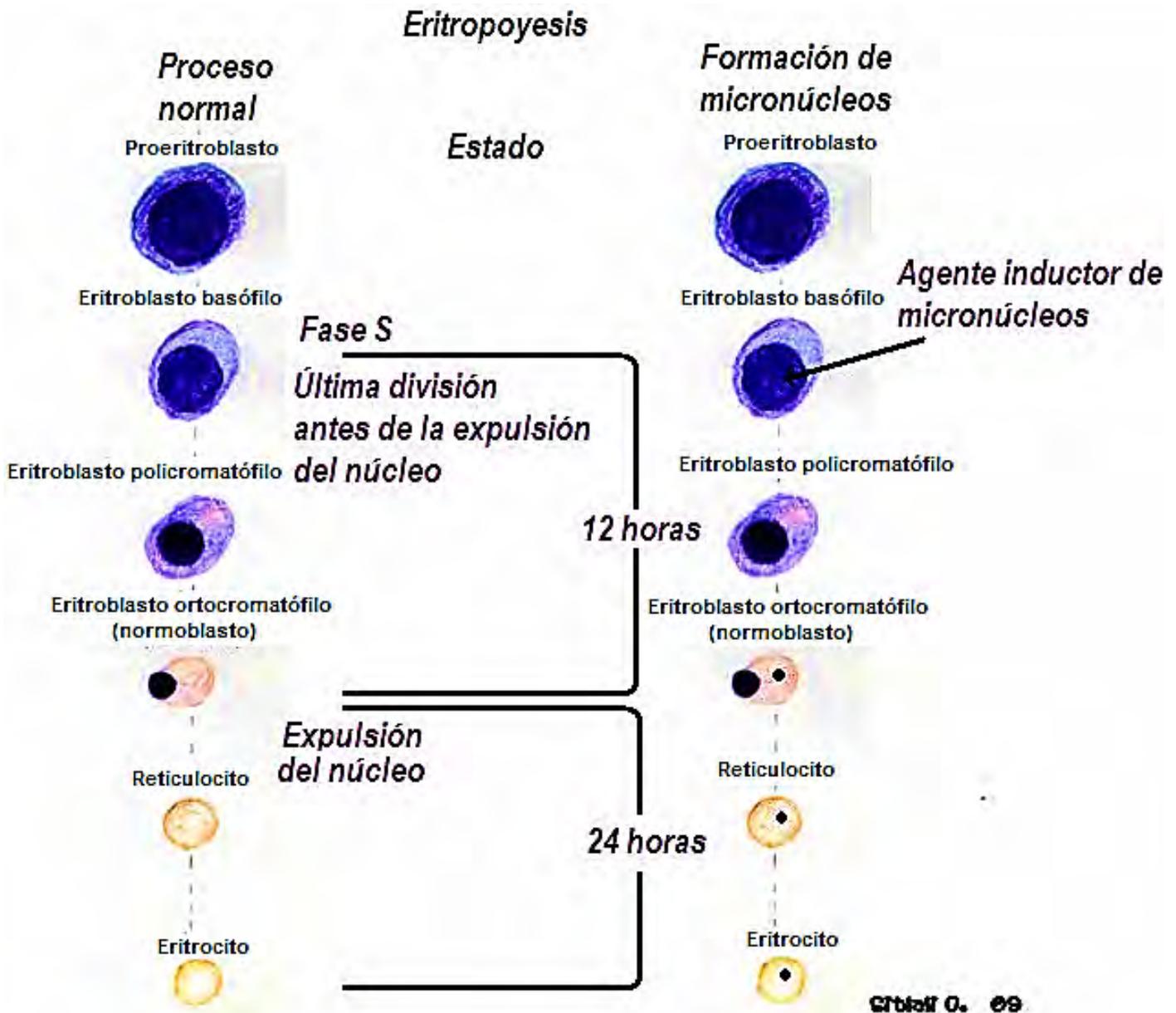


Fig.6. Estado de eritropoyesis y formación de micronúcleos en eritroblastos. Tiempos referidos a eritropoyesis de ratón adulto de acuerdo a Jensen y Ramel (1978). Müller y Streffer. (36).

Para realizar la técnica de MN existen una serie de recomendaciones basadas en observaciones realizadas por el Grupo de Estudio Colaborativo para la Prueba de Micronúcleos (38) (39) (40) (41), como son: el conteo de MN sólo será en eritrocitos inmaduros (eritrocitos policromáticos (PE), es decir, eritrocitos que aún contengan RNA también llamados reticulocitos, retis), aunque también puede ser en eritrocitos maduros (normocromáticos, NE) cuando la exposición al compuesto químico sea mayor a cuatro semanas, (Fig.6). El compuesto a administrar puede ser disuelto en solución salina isotónica, agua o aceite vegetal, según convenga. No se recomienda el uso de solventes orgánicos como dimetilsulfóxido. En cuanto a la especie, cepa y edad del modelo de estudio, comúnmente se utilizan roedores como ratones o ratas por su uso común en toxicología y por la disponibilidad de datos sobre inducción de MN en éstas especies con una amplia variedad de compuestos químicos. Existe variabilidad en la inducción de MN entre cuatro diferentes cepas de ratones con seis distintos compuestos químicos evaluados, sin embargo, no se tiene una cepa específica de ratón para llevar a cabo la técnica de micronúcleos; en cuanto a la edad, se recomienda el uso de adultos jóvenes saludables y escogidos al azar. Por lo que al sexo se refiere, pese a que existe variabilidad entre las respuestas de inducción de MN tanto en hembras como en machos, no existe preferencia entre alguno de ellos aunque es más frecuente utilizar ratones machos debido a su alta respuesta a algunos compuestos prototipo en la inducción de MN.

- **Ensayo de mutagenicidad en *Salmonella* (prueba de Ames) (42, 43)**

Una mutación se considera como una modificación en la secuencia de los nucleótidos que constituyen el material genético (ADN).

Las mutaciones pueden producirse por sustitución de bases o por corrimiento del marco de lectura ("frameshift"). La primera resulta de una transición, reemplazo de una base por otra del mismo tipo, o de una transversión, en la que una base es sustituida por otra de diferente tipo. El desfaseamiento consiste en el corrimiento de la secuencia nucleotídica por eliminación o adición de nucleótidos. Las anomalías que se refieren a grupos de genes pueden deberse a rearrreglos estructurales tales como inversión o translocación, o anomalías numéricas, como eliminación o adquisición de genes o pedazos de cromosomas, o cromosomas completos.

Las mutaciones pueden resultar de la acción directa de los agentes químicos sobre el material genético, o sobre otros componentes celulares ligados a él funcionalmente, como por ejemplo, los que participan en la división celular (centriolo y microtúbulos), las proteínas de la cromatina y las enzimas que contribuyen a la replicación o reparación del ADN.

Uno de los métodos más utilizados para la determinación de agentes mutagénicos es la prueba de Ames, la cual se basa en cepas de *Salmonella typhimurium* mutantes (auxótrofas a histidina, His⁻). Cada cepa contiene diferentes tipos de mutación en su operón de histidina. Adicional a esta mutación, contienen otras mutaciones que incrementan su sensibilidad a la acción de mutágenos. Tienen una mutación en el gen *rfa* que permite la pérdida parcial de la barrera de polisacáridos, con lo cual moléculas de gran tamaño pueden ingresar a la bacteria. Otra mutación que presentan es la delección del gen *uvrB* que codifica para el sistema de reparación por escisión de pares de bases. Las cepas estándar TA97, TA98, TA100 y TA102 contienen el plásmido factor-R, PKM101, el cual incrementa la mutagénesis química y espontánea por incremento del sistema de reparación de ADN propenso a errores (error-prone ADN repair system). La cepa TA100 tiene la mutación *hisG46* en el gen *hisG* que codifica para la primera enzima en la biosíntesis de histidina. Esta mutación sustituye *prolina*- $\frac{GGG}{CCC}$ - por *leucina*- $\frac{GAG}{CTG}$ - en el organismo silvestre, lo cual le confiere la capacidad de detectar mutágenos que causan mutaciones por sustitución de pares de bases. La cepa TA98 tiene la mutación en *hisD3052* en el gen *hisD* que codifica para histidinol deshidrogenasa. Esta mutación tiene una secuencia $\frac{CCCCCCCC}{CCCCCCCC}$, ocho residuos repetidos -GC- cerca del sitio de una mutación del marco de lectura -1 en el gen *hisD*, confiriéndole la capacidad de detectar mutágenos que causen corrimiento del marco de lectura que restaure la correcta secuencia para la síntesis de histidina. La cepa TA97 adiciona una citosina resultando en seis citosinas en el sitio de la mutación *hisD6610*, de tal forma que también detecta a mutágenos que causen corrimiento del marco de lectura y puede traslapar con los detectados por TA98. La cepa TA102 contiene una mutación ocre $\frac{TAA}{ATT}$, en el gen de *hisG*, detectando eficientemente a mutágenos como formaldehído, glioxal, rayos X, luz UV.

En el mamífero existen sistemas enzimáticos responsables de la transformación metabólica de los compuestos que acceden al organismo y que están ausentes en *Salmonella typhimurium*. Por ello, la prueba se suplementa con homogenados de órganos de roedores o humanos que contienen las enzimas necesarias.

Los resultados positivos de la prueba indican que la muestra probada induce mutaciones puntuales por sustitución de pares bases o por desfaseamiento de la secuencia nucleotídica en el genoma del microorganismo de tal forma que revertirá el fenotipo His⁻ a His⁺, lo que confiere a las revertantes la capacidad de crecer en medio libre de histidina o con cantidades limitadas. El resultado se considera positivo cuando el número de revertantes inducidas sea igual o superior al doble del número de colonias revertantes espontáneas del control negativo.

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 contienen fibra, compuestos antioxidantes y otros potencialmente anticancerígenos como isotiocianatos, flavonoides y lignanos, por mencionar algunos (44, 45).

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, por reducir la placa aterosclerótica y por disminuir la proliferación de células cancerosas (45).

Sin embargo, en 1989 se descubrió por accidente que el jugo de toronja tiene efecto inhibitorio del CYP3A4 (46). 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 la inhibición ocasionada por los compuestos activos del jugo de toronja (47).

De la misma manera en que se altera la biodisponibilidad de fármacos que son sustratos de CYP3A4 por la ingesta del jugo de toronja también se observa este efecto con verapamil, cafeína y fenacetina, fármacos metabolizados principalmente por CYP1A, por lo tanto se presume que el jugo de toronja también está actuando sobre CYP1A (48, 49, 50).

Los compuestos que se proponen como principios activos y responsables del efecto inhibitorio del jugo de toronja sobre CYP incluyen algunos flavonoides como naringina (NG), quercetina y caempferol, y algunas furanocumarinas como 6, 7-dihidroxibergamotina (DHB), (4 - [[6-hidroxi - 7 [[1 - [(1 - hidroxil - 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]oxy]-3,7-dimetil-2-octenil] oxil]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (GF-I-4) y bergamotina (BG), (fig.7). La NG 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 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 éstas enzimas. Lo anterior sugiere que la NAR no es el principal agente activo del jugo de toronja, sobre la inhibición de CYP3A4 y CYP1A2 (51).

En estudios con las furanocumarinas, BG y DHB, 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) (52). Lo anterior demuestra que DHB tiene mayor potencia de inhibición sobre CYP3A4 que BG, sin embargo, BG se encuentra en mayor concentración 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 (53).

BERGAMOTINA (BG) COMO AGENTE INHIBIDOR DE CYP

El jugo de toronja contiene tres compuestos que por su concentración y capacidad para inhibir a ciertas isoformas del CYP resultan relevantes, una de ellas es la BG (figura 7), una furanocumarina cuya concentración en el jugo de toronja roja es de $3.10 \mu\text{M}$ (47).

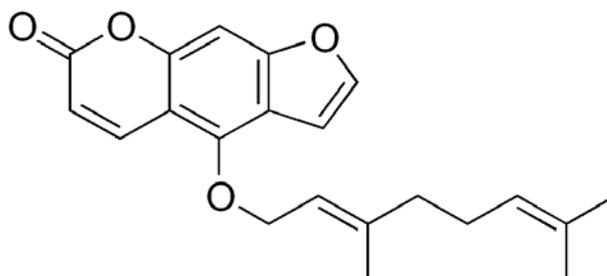


Fig. 7 Estructura de bergamotina (BG)

Debido a la importancia de CYP1A y CYP2B en la activación de compuestos carcinógenos, en estudios previos determinamos el efecto que la BG, DHB y NG ejercen sobre la actividad etoxiresorufin O-deetilasa (EROD) de CYP1A1, metoxiresorufin O-demetilasa de CYP1A2, pentoxiresorufin O-dealquilasa (PROD) y benciloxiresorufin O-dealquilasa de CYP2B2 en microsomas hepáticos de ratas tratadas con β -naftoflavona y fenobarbital. Los valores de CI_{50} en la tabla 1, hacen evidente la potencia de inhibición que BG posee sobre CYP1A1.

Tabla 1. Valor de CI_{50} de BG y DHB sobre cuatro isoenzimas de CYP.

Inhibidor	BG (μM)	DHB (μM)
Enzima		
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

Por otro lado también se ha observado que la BG afecta el transporte de talinolol en ratas, ya que una dosis de 0.2 mg/Kg de BG inhibe dicho transporte el cual es mediado por CYP3A4. Esta concentración de BG, equivalente a la cantidad presente en 200 mL de jugo de toronja,

también se utilizó en estudios clínicos con humanos para evidenciar el efecto del jugo de toronja sobre la biodisponibilidad de atovastatina, sinvastatina y provastatina. (54, 55, 56). He y sus colaboradores (57), realizaron estudios de cinética enzimática y demostraron que los metabolitos de BG inhiben de manera irreversible a CYP3A4. Lo cual sugiere que la BG requiere ser metabolizada para llevar a cabo la inactivación de CYP3A4, abriendo la posibilidad de ser un inactivador basado en el mecanismo catalítico de la enzima. La BG también genera este tipo de inhibición sobre CYP2B6 y CYP3A5 (58). Aunque, es importante hacer notar que existen algunos substratos de CYP3A4 con los que la BG puede comportarse como un inhibidor reversible, tal es el caso reportado por Lin y colaboradores para el midazolam (59).

Kleiner y sus colaboradores (60) demostraron en el ratón el efecto de una dosis de 100 mg/Kg de BG vía oral mostrando que no altera la actividad enzimática de CYP1A1 pero sí su expresión génica. Sin embargo, Sahi y colaboradores (61) utilizando un tratamiento de 10 mg de BG vía oral por 10 días en el perro Beagle, observan una disminución de la actividad de CYP1A1.

En estudios *in vitro*, Baumgart y colaboradores (62) encontraron una CI_{50} de 10 nM de BG sobre CYP1A1 presente en microsomas obtenidos de cultivo de hepatocitos de rata y también mostraron que 100 μ M de BG aumentan el nivel de proteína de CYP1A1. En 1993 Cai (63) realizó un estudio de cinética enzimática con BG y microsomas hepáticos de ratones tratados con 3-metilcolantreno obteniendo una CI_{50} de 1.24×10^{-7} M y caracterizaron a BG como inhibidor no competitivo con una K_i de 2.83×10^{-7} M. En conclusión lo anterior muestra que BG inhibe a CYP1A1 sin tener claro cuál es el tipo de inhibición que se lleva a cabo.

Por otro lado y teniendo en cuenta que BG inhibe a CYP1A1, se han llevado a cabo estudios para evidenciar el efecto protector de BG sobre el inicio de cáncer de piel en ratones (64) y de aductos en células de piel MCF-7 (65), inducidos por BaP. En ambos estudios se encontró una clara protección, lo que demuestra la capacidad de BG para inhibir el inicio de formación de tumor por BaP. Sin embargo, no se tiene un estudio *in vivo* que evidencie el mecanismo de protección de BG.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diariamente nos exponemos a una amplia variedad de xenobióticos, muchos de ellos metabolizados por CYP y como parte de los productos que se generan de dicho metabolismo se tienen metabolitos con capacidad carcinogénica.

Los CYPs más importantes en la activación de compuestos carcinogénicos son: CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1.

En años recientes se descubrió el efecto inhibitorio que el jugo de toronja posee sobre enzimas de la familia CYP teniendo a tres de sus componentes como posibles principios activos, dentro de los cuales BG sobresale debido a su potencia inhibitoria sobre CYP1A1 en microsomas de hígado de rata, pues tiene una CI_{50} de $0.19 \mu\text{M}$. Con base en estudios previos, se propone que la BG es un inhibidor no competitivo (63), aunque esto no es concluyente debido a que los estudios en los que se determina este tipo de inhibición se llevaron a cabo con microsomas hepáticos y no con la enzima pura, además no se puede descartar la idea de que posiblemente sea inactivador irreversible como ya se ha demostrado con CYP3A4 (57) (59). Ante la posibilidad de que el CYP1A1 sea un blanco terapéutico y la BG un agente quimioprotector, resulta relevante definir el tipo de inhibición que este compuesto lleva a cabo sobre CYP1A1.

Al ser BG un inhibidor de CYP1A1 se abre la posibilidad de que este compuesto sea agente quimioprotector, como ya se ha propuesto en estudios tanto *in vivo* como *in vitro* en la iniciación de tumor de piel (64, 65). Con base a lo anterior, sugerimos que la BG posee actividad antigenotóxica.

El presente estudio tiene como objetivo definir el tipo de inhibición que BG efectúa sobre CYP1A1 y determinar su posible actividad protectora ante la inducción de micronúcleos en eritrocitos de ratón por BaP.

HIPÓTESIS

La BG es un inhibidor del CYP1A1 y en consecuencia actuará como un agente quimioprotector ante el daño producido por pro-mutágenos activados por este citocromo.

OBJETIVO GENERAL

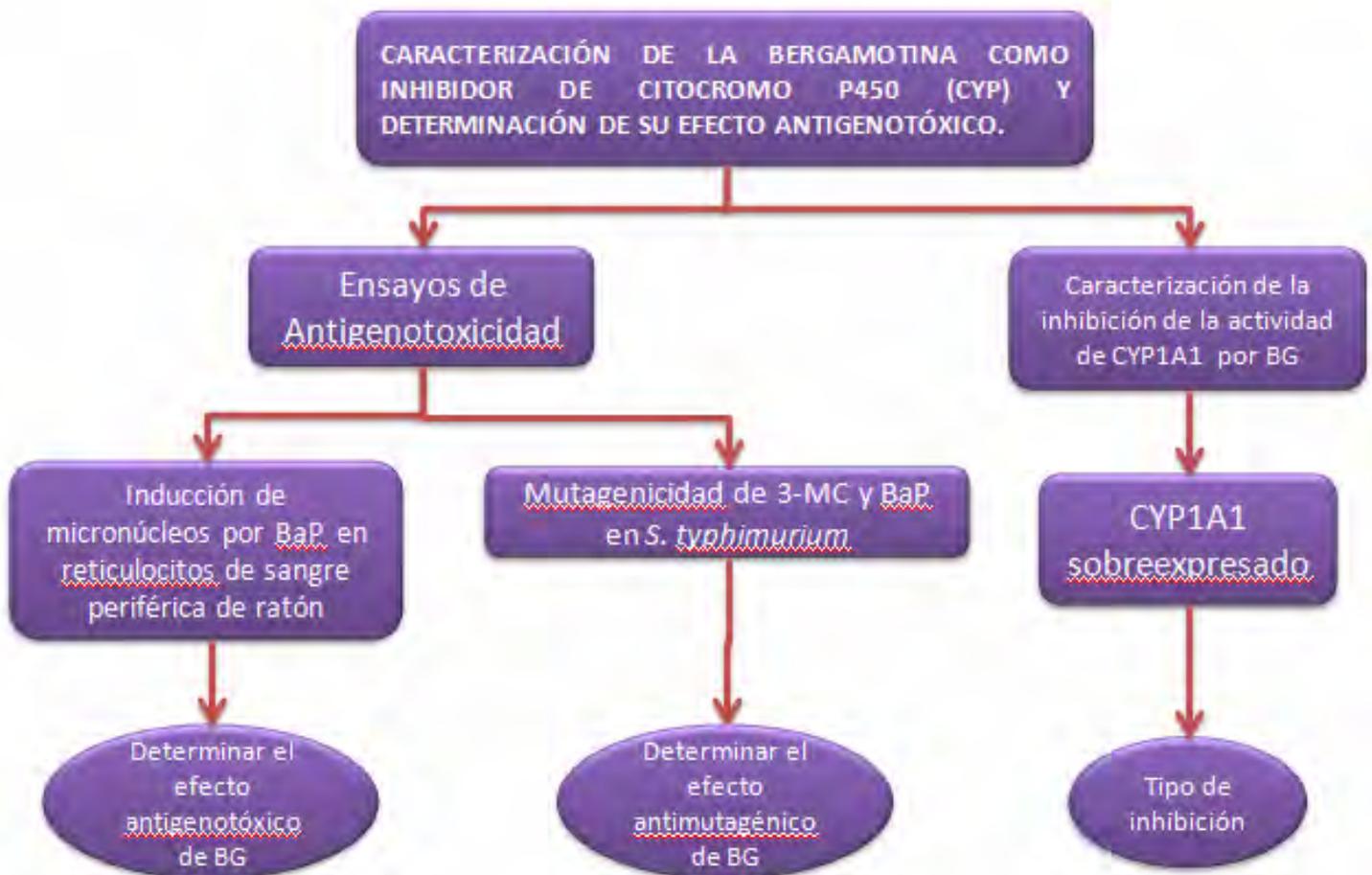
Determinar el tipo de inhibición que BG presenta sobre CYP1A1 y su efecto protector sobre daño mutagénico y genotóxico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar la cinética enzimática de CYP1A1.
- Caracterizar la inhibición que BG presenta sobre CYP1A1.
- Determinar la CI_{50} de inhibición de BG sobre CYP1A1.
- Inducir la producción de micronúcleos con BaP en ratones.
- Determinar si la BG es un compuesto protector de la inducción de micronúcleos por BaP.
- Determinar la capacidad antimutagénica de la BG mediante el uso de la prueba de Ames.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Diseño experimental



Se usaron 20 ratones machos BALB/c de 8 de ocho semanas de edad adquiridos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. La Bergamotina (BG) se adquirió de INDOFINE Chemical Company Inc. (Hillsborough, NJ, USA). La isoenzima citocromo P4501A1 sobreexpresada en baculovirus (Supersome®) se adquirió en BD Gentest (Woburn, MA, USA). La etoxirresorufina NADPH, Giemsa Modificado, se adquirieron en Sigma Chemicals Co. (St. Louis MO, USA).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (66-70)

La evaluación de la actividad enzimática se realizó mediante la capacidad de O-deetilasa que posee el CYP1A1. El sustrato utilizado fue etoxirresorufina (actividad EROD, etoxirresorufina O-deetilasa), que tiene como producto 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 hizo mezclando la cantidad correspondiente de resorufina en amortiguador a pH 7.6 (Tris-base 50 mM y $MgCl_2$ 25 mM) en un volumen final de 1 mL.

La cinética enzimática de CYP1A1 se llevó a cabo en una mezcla de amortiguador a pH 7.6 (tris-base 50 mM y $MgCl_2$ 25 mM), 0.024, 0.04, 0.048, 0.06, 0.08, 0.12 y 0.24 μM del sustrato (disuelto en DMSO), NADPH 50 μM (disuelto en amortiguador) y en el caso de la cinética de inhibición, se trabajó con la BG a cuatro diferentes concentraciones 4, 8, 12 y 16 nM. La mezcla se incubó por 3 minutos a 37°C. Posteriormente se comenzó la reacción enzimática al adicionar 1 pmol de CYP1A1. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 1 mL. La formación del producto se evaluó durante 1.5 minutos a 37°C registrando lecturas cada 10 segundos en un fluorómetro Versa Fluor® de BioRad. Las mediciones se realizaron con una longitud de onda de excitación de 350 nm y una longitud de onda de emisión de 286 nm.

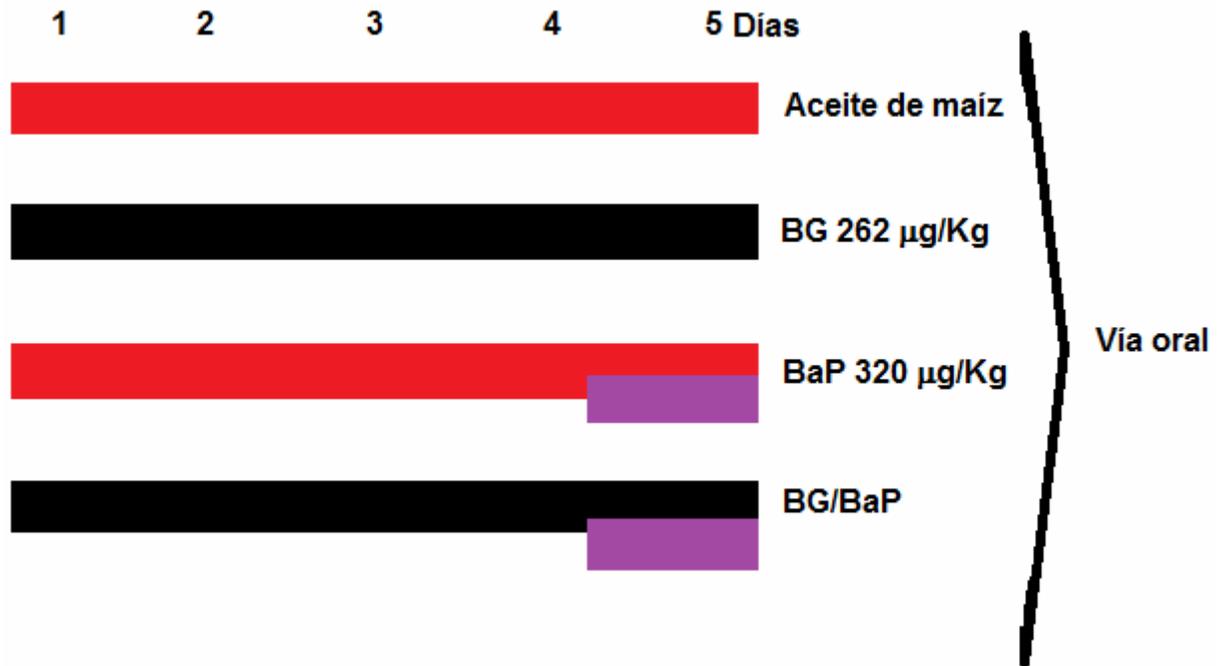
Las determinaciones de actividad enzimática para cada concentración de BG se realizaron por triplicado y los resultados de actividad se expresan en pmol de resorufina por minuto por pmol de proteína (pmol resorufina/min x pmol proteína).

Para la determinación de los parámetros cinéticos K_m , V_{max} y K_i se hizo uso del programa OriginPro 8, ajustando los datos a una regresión no lineal del tipo hiperbólico.

Con objeto de verificar que la BG no interfiere con la fluorescencia de la resorufina, se elaboraron curvas de resorufina en presencia del inhibidor. Se encontró que la BG no interfiere en la metodología implementada (Apéndice).

ENSAYOS DE ANTIGENOTOXICIDAD

Prueba de micronúcleos. Esquema de tratamiento.



Se trabajó con cuatro grupos de 5 ratones, cada uno correspondientes a: i) control aceite de maíz, ii) control BG, iii) control BaP, iv) tratamiento BG/BaP bajo el esquema de tratamiento que se muestra arriba.

A las 24, 48 y 72 horas de la última administración se obtuvieron 10 µL de sangre periférica del tallo de la cola de cada uno de los ratones con la cual posteriormente se realizaron frotis, fijación y tinción del tejido.

El frotis se realizó sobre portaobjetos perfectamente limpios para posteriormente fijarlos con metanol puro. La tinción que se realizó fue mediante la técnica Giemsa utilizando el colorante comercial Giemsa modificado el cual se expone al tejido por 1 minuto, enseguida se mezcla con agua (sobre el tejido) por 2 minutos y finalmente se lava con abundante agua. El conteo de reticulocitos y micronúcleos se realizó con un microscopio de luz marca Nikon con objetivo 100x. El conteo de reticulocitos y de eritrocitos maduros se llevó a cabo en base a su diferencia de color siendo los reticulocitos morado-azulados y de mayor tamaño en comparación a los eritrocitos maduros los cuales presentan un color rosado. El micronúcleo se observa como un cuerpo redondo bien definido y de color morado.

Ensayo de mutagénesis (42, 43)

La cepa de *Salmonella typhimurium* que se usó para los ensayos de mutagénesis fue la TA98, la cual fue donada por el Dr. B.N. Ames (Universidad de California, Berkeley, C.A., USA). Los promutágenos utilizados fueron benzo[a]pireno (BaP) y 3-metilcolantreno (3-MC). Se analizaron dos sistemas enzimáticos metabolizadores, fracciones S9, para la activación de promutágenos: 1) fracción S9 de hígado de rata tratada con β -naftoflavona/fenobarbital (β -NF/FB), los cuales inducen a CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2; 2) fracción S9 de hígado de rata tratada con β -NF, la cual induce a CYP1A1 y CYP1A2. A un tubo estéril con 2 mL de agar de superficie a 45°C se le agregó 0.1 mL de un cultivo de 16 horas de la cepa TA98 de *S. typhimurium*, 25 μ g del mutágeno (BaP o 3-MC), 0.025 mL de la solución de BG a diferentes concentraciones (0, 1, 10, 15, 20 y 25 μ g), y 0.5 mL mezcla S9 β -NF/FB o S9 β -NF (28.7 o 31.2 mg de proteína de la fracción S9 β -NF/FB o S9 β -NF, respectivamente, por c/10 mL de mezcla, MgCl₂ 8 mM, KCl 33 mM, NADP 4 mM, glucosa-6-fosfato 5 mM y amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7.4). Una vez adicionado agar de superficie con los demás componentes y reactivos, se vació en cajas Petri con medio mínimo de Vogel-Bonner. Después de que las cajas se solidificaron se incubaron a una temperatura de 37°C por 48 horas, al cabo de las cuales se contó el número de revertantes, es decir, el número de colonias.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la actividad enzimática se realizaron como mínimo tres experimentos independientes por triplicado. Para los ensayos de micronúcleos y mutagenicidad se realizó un experimento por quintuplicado y triplicado, respectivamente. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa XLSTAT ® versión 7.5.2 para Windows XP®. A los datos obtenidos en la cinética de inhibición se les aplicó la prueba estadística ANOVA de una vía con prueba pos Hoc Tukey con una $P \leq 0.05$. Los resultados obtenidos en la prueba de micronúcleos se analizaron por Kruskal Wallis con una $P \leq 0.05$. Los datos obtenidos en el ensayo de mutagénesis fueron analizados con la prueba estadística ANOVA de una vía con prueba pos Hoc Tukey con una $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

En la figura 8 podemos observar el ajuste por regresión no lineal de la velocidad de reacción de CYP1A1 a diferentes concentraciones de etoxirresorufina, mostrando tener un comportamiento del tipo Michaelis-Menten. Del ajuste de datos a la ecuación de Michaelis-Menten obtuvimos una $V_{max}= 6.81$ U/pmol proteína (pmol resorufina/min x pmol proteína) y una $K_m= 0.069$ μ M.

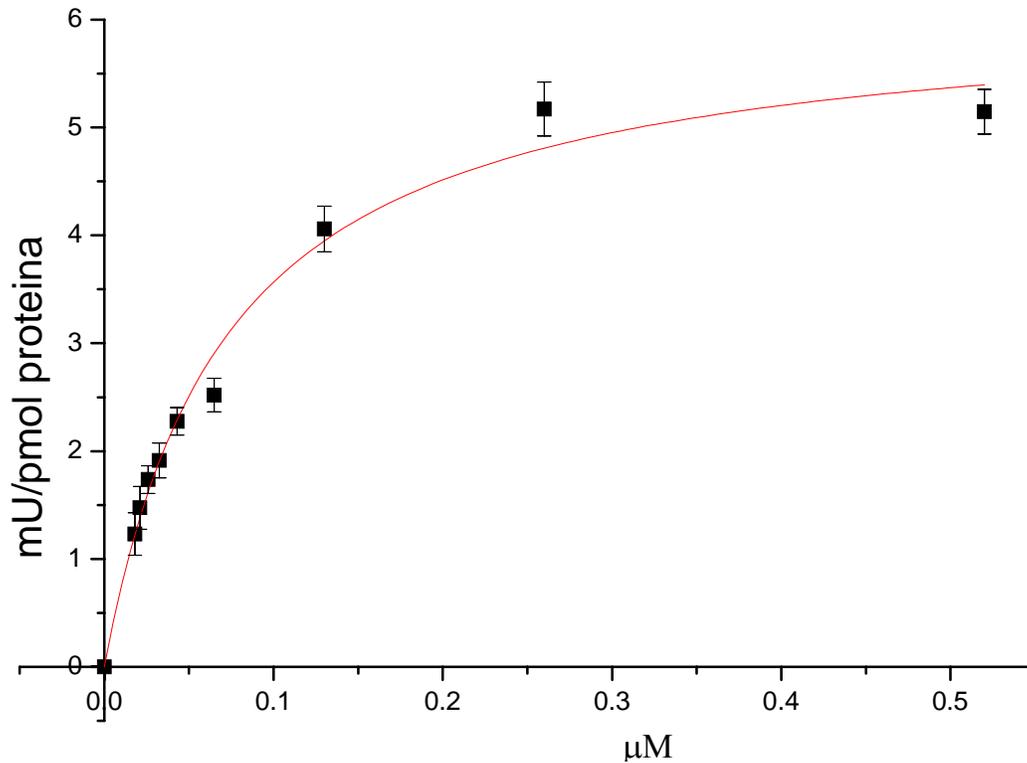


Fig. 8 Gráfico de velocidad inicial de reacción de CYP1A1 vs concentración de etoxirresorufina. Los datos obtenidos por el ajuste de la regresión no lineal a la ecuación $v = \frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]}$ mediante el programa Origin 5.0 fueron $V_{max}=6.141\pm 0.255$ mU/pmol proteína y $K_m=0.0723\pm 0.0079$ μ M. La reacción se llevó a cabo durante 1.5 minutos con 1 pmol de proteína (Supersome $\text{\textcircled{R}}$), 50 mM de NADPH, con las distintas concentraciones de etoxirresorufina a un volumen final de amortiguador (pH 7.6) de 1 mL. Cada punto es el promedio de cuatro experimentos independientes con su respectivo error estándar.

En la figura 9 podemos observar el efecto inhibitorio de cinco distintas concentraciones de BG 0, 4, 8, 12 y 16 nM sobre la cinética enzimática de CYP1A1. En el gráfico de dobles recíprocos, se demostró que la BG un inhibidor competitivo de CYP1A1, es decir, tiene la capacidad de competir por el sitio activo de la enzima libre afectando la unión del sustrato.

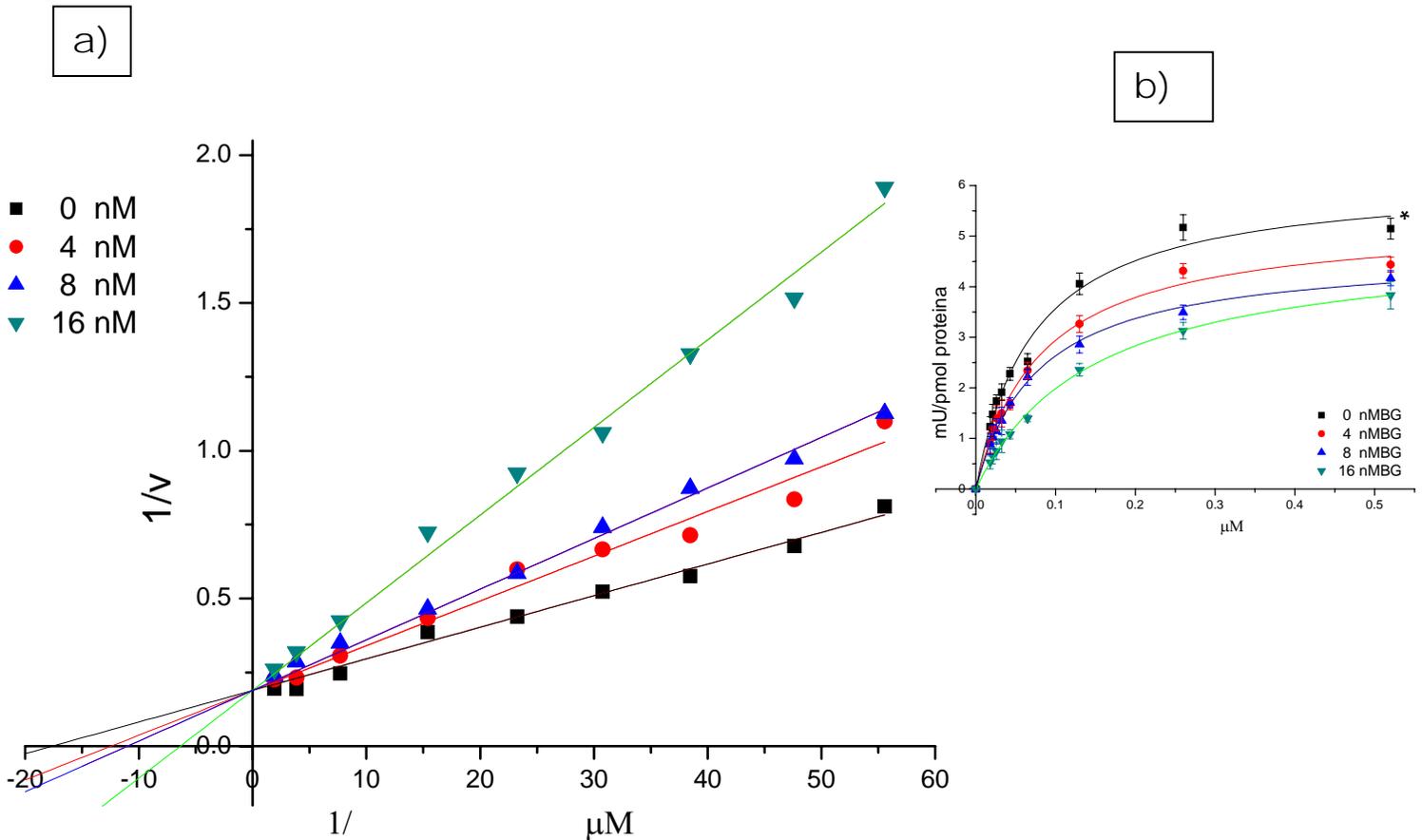


Fig. 9. Efecto inhibitorio de cinco distintas concentraciones de BG sobre la cinética enzimática de CYP1A1.

a) Ajuste simultáneo a gráfico de dobles recíprocos $1/v$ vs $1/[Etoxrresorufina]$ para inhibición competitiva; b)

Ajuste simultáneo por regresión no lineal a la ecuación $v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$. La reacción se llevó a cabo durante 1.5

minutos con 1pmol de proteína (Supersome®), 50 mM de NADPH, con las distintas concentraciones de etoxirresorufina y en reacciones independientes 0 (■), 4 (●), 8 (▲) y 16 (▼) μM de BG a un volumen final de amortiguador (pH 7.6) de 1mL. Cada punto en los gráficos es el promedio de tres experimentos independientes para cada concentración de BG. * Diferencia significativa con 0 nM de BG, con una $P \leq 0.05$, † Diferencia significativa con la concentración de BG que le antecede con una $P \leq 0.05$.

En la figura 10 se observa el efecto inhibitorio de cinco diferentes concentraciones de BG sobre CYP1A1 mediante el gráfico $1/v$ vs [BG], conocido como gráfico de Dixon, el cual muestra un tipo de inhibición competitiva, (panel a). Este tipo de inhibición es corroborada con el regráfico de las pendientes obtenidas en el gráfico de Dixon vs $1/[\text{sustrato}]$, (panel b).

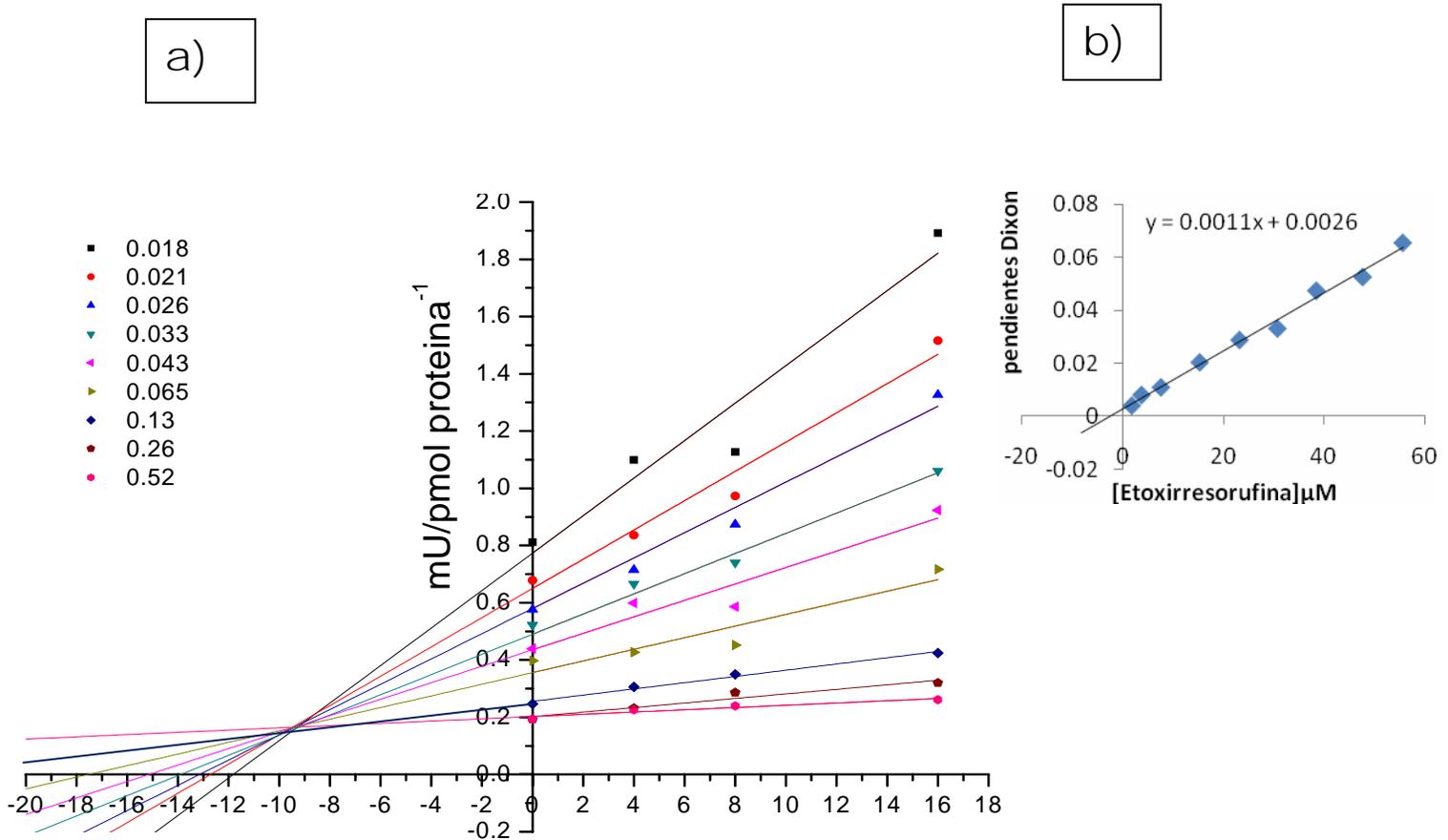


Fig. 10. Efecto inhibitorio de cuatro distintas concentraciones de BG sobre la cinética enzimática de CYP1A1. a) Ajuste simultáneo al gráfico de Dixon $1/v$ vs [BG]; b) Regráfico de pendientes del gráfico de Dixon vs $1/[\text{Etoxicresorufina}]$. Del regráfico y el gráfico de Dixon se obtuvo como parámetro cinético de inhibición la $K_i=10.703$ nM. La reacción se llevó a cabo durante 1.5 minutos con 1 pmol de proteína (Supersome®), 50 mM de NADPH, con las distintas concentraciones de etoxicresorufina y en reacciones independientes para 0, 4, 8 y 16 nM de BG a un volumen final de amortiguador (pH 7.6) de 1 mL.

En la figura 11 observamos el efecto de la BG sobre la genotoxicidad inducida por BaP a las 24 horas de la última administración. El control negativo (Ctrl), presentó una frecuencia de 1.5 ± 1.06 MNPE/1000 PE, valor no significativamente diferente al obtenido con el control de BG ($262 \mu\text{g/Kg}$), 1.3 ± 0.67 MNPE/1000 PE. En lo que respecta al control positivo, BaP (320 mg/Kg), la inducción de micronúcleos fue de 2.4 ± 1.5 MNPE/1000PE el cual no es significativamente diferente del control negativo ni del tratamiento BG-BaP, teniendo para este último un valor de 3.3 ± 1.5 MNPE/1000PE que sí es significativamente diferente de ambos controles negativo y de BG. Estos resultados muestran que a 24 horas y bajo las condiciones de nuestro estudio, la BG no tiene efecto genotóxico.

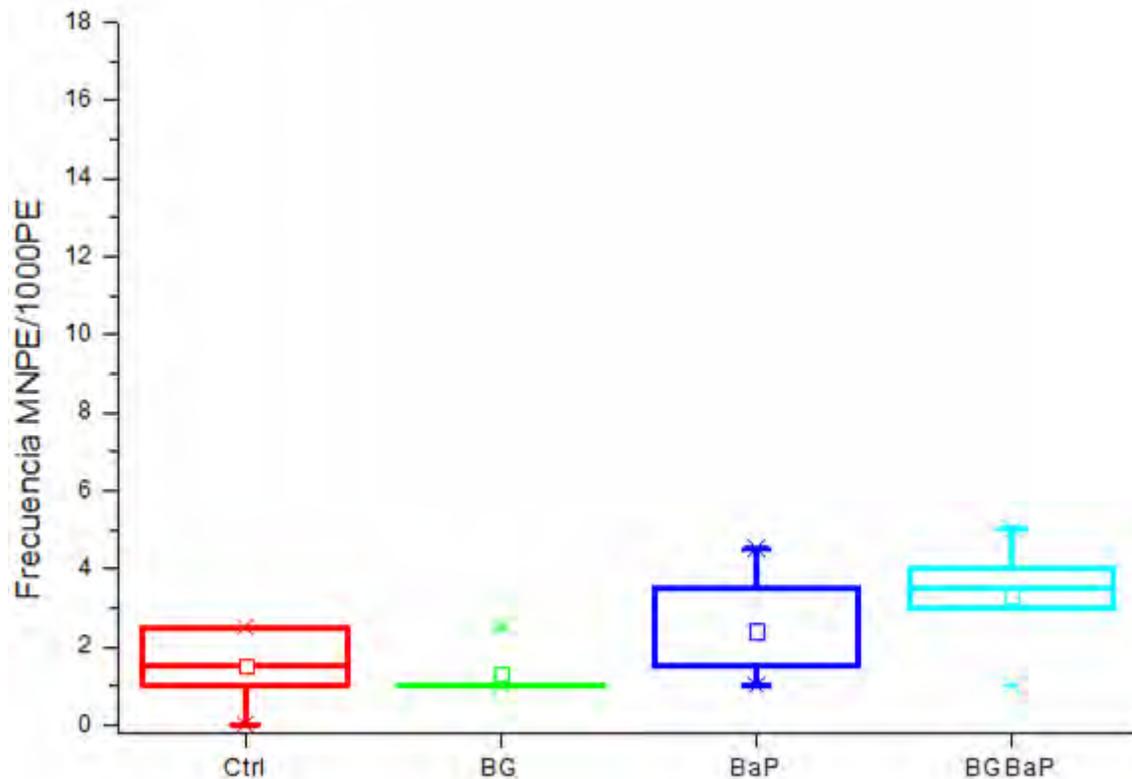


Fig. 11 Efecto de BG sobre la inducción de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (MNPE) de sangre periférica de ratones por BaP a las 24 h. Se trabajó con cuatro grupos, **1)** control negativo (Ctrl ■, aceite de maíz - vehículo) administrado por 5 días consecutivos cada 24 h, **2)** control de BG (BG ■, $262 \mu\text{g/Kg}$) administrado por 5 días consecutivos cada 24 h, **3)** control positivo (BaP ■, 320 mg/Kg) administrado el vehículo por 5 días consecutivos cada 24 h y el día 5 una hora después de la administración del vehículo se administró el BaP, y **4)** tratamiento BG + BaP (BGBaP ■, 262 y 320 mg/Kg respectivamente) se administró la BG por 5 días consecutivos cada 24 h y el día 5 una hora después de la administración del vehículo se administró el BaP. Se obtuvo la frecuencia percentil del total de MN/total de células evaluadas*1000. La frecuencia percentil es el rango de los promedios del total de MNPE/ total de PE evaluados *1000 PE en cada ratón a las 24 horas de la última administración de los compuestos. a) Diferencia significativa con el control negativo (Ctrl) con una $P \leq 0.05$, b) Diferencia significativa con el control de BG con una $P \leq 0.05$. Prueba estadística, Kruskal Wallis de 2 muestras independientes.

En la figura 12 observamos el efecto de la BG sobre la genotoxicidad inducida por BaP a las 48 horas de la última administración. El control negativo (Ctrl), presentó una frecuencia de 1.2 ± 0.03 MNPE/1000 PE, valor no significativamente diferente al obtenido con el control de BG (262 $\mu\text{g/Kg}$), 1.44 ± 0.46 MNPE/1000 PE. En lo que respecta al control positivo BaP (320 mg/Kg), la inducción de micronúcleos fue de 8.16 ± 6.36 MNPE/1000PE el cual es significativamente diferente sólo del control negativo. El tratamiento BGBaP generó una frecuencia de 5.24 ± 1.37 MNPE/1000PE que es significativamente diferente de ambos controles, negativo y de BG, pero no del control positivo BaP. Estos resultados muestran que la BG, bajo nuestras condiciones experimentales, no es un compuesto genotóxico, pero tampoco es un agente protector del daño genotóxico ocasionado por BaP.

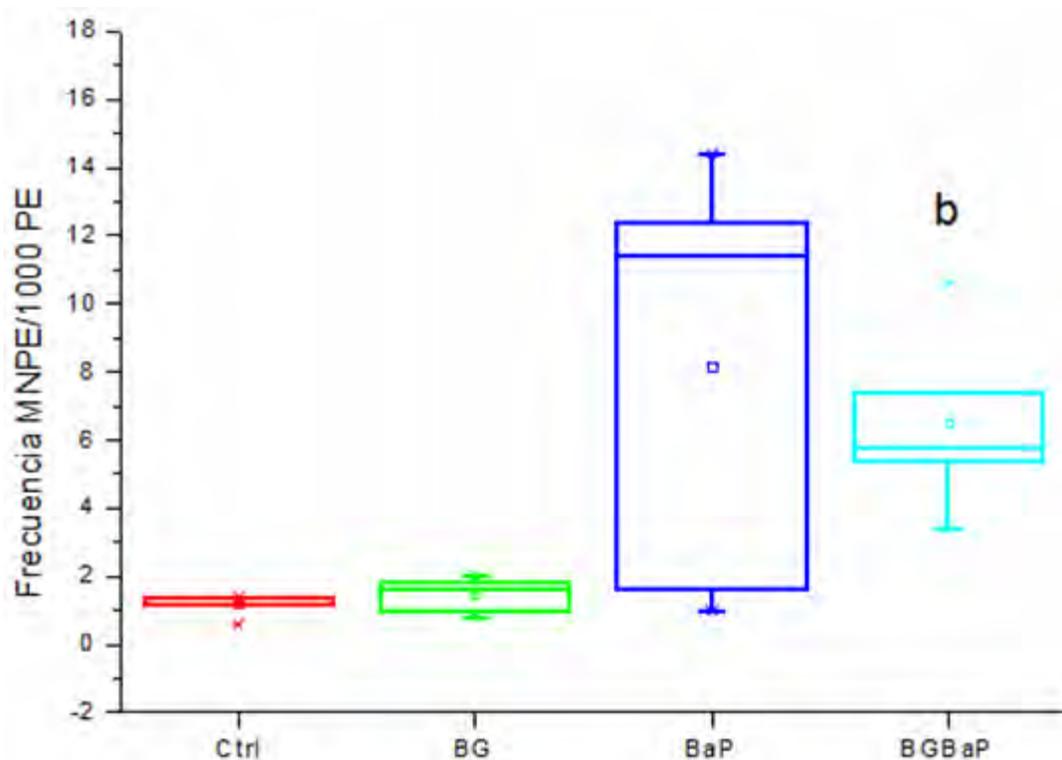


Fig. 12 Efecto de BG sobre la inducción de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (MNPE) de sangre periférica de ratones por BaP a las 48 h. Se trabajó con cuatro grupos, **1**) control negativo (Ctrl ■, aceite de maíz - vehículo) administrado por 5 días consecutivos cada 24 h, **2**) control de BG (BG ■, 262 $\mu\text{g/Kg}$) administrado por 5 días consecutivos cada 24 h, **3**) control positivo (BaP ■, 320 mg/Kg) administrado el vehículo por 5 días consecutivos cada 24 h y el día 5 una hora después de la administración del vehículo se administró el BaP, y **4**) tratamiento BG + BaP (BGBaP ■, 262 y 320 mg/Kg respectivamente) se administró la BG por 5 días consecutivos cada 24 h y el día 5 una hora después de la administración del vehículo se administró el BaP. Se obtuvo la frecuencia percentil del total de MN/total de células evaluadas*1000. La frecuencia percentil es el rango de los promedios del total de MNPE/ total de PE evaluados *1000 PE en cada ratón a las 24 horas de la última administración de los compuestos. a) Diferencia significativa con el control negativo (Ctrl) con una $P \leq 0.1$, b) Diferencia significativa con el control de BG con una $P \leq 0.1$. Prueba estadística Kruskal Wallis de 2 muestras independientes.

En la figura 13 se presenta el efecto antimutagénico de 0, 1, 5, 10, 15, 20 y 25 μg de BG sobre la activación de 25 μg de 3-metilcolantreno (3-MC); un mutágeno activado principalmente por CYP1A2. Se utilizaron dos sistemas de activación enzimática hepática 1) S9 $\beta\text{-NF}/\text{FB}$ y 2) S9 $\beta\text{-NF}$, las cuales se diferencian por las enzimas CYP que inducen. Observamos que el sistema de $\beta\text{-NF}/\text{FB}$ genera mayor número de mutantes en comparación con $\beta\text{-NF}$ y que la BG protege del daño mutagénico ocasionado por el 3-MC en ambos tipos de activación.

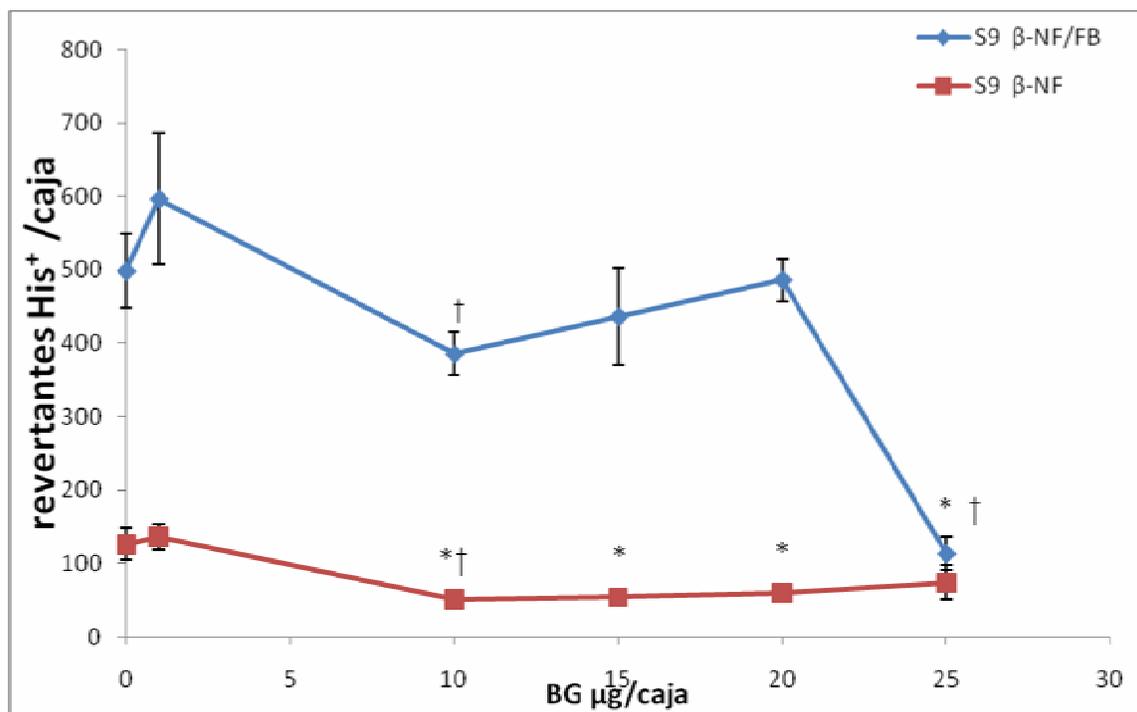


Fig. 13 Efecto protector de BG sobre la mutagenicidad de 3-MC en la prueba de Ames. En un tubo estéril con 2 mL de agar de superficie se agregaron 25 μg de 3-MC, 0.1 mL de cultivo de 16 h de *S. typhimurium cepa TA98*, 500 μL de mezcla S9 (28.7 y 31.2 mg de proteína de la fracción S9 $\beta\text{-NF}/\text{FB}$ y $\beta\text{-NF}$, respectivamente, por 10 mL de mezcla) y 0, 1, 5, 10, 15, 20 o 25 μg de BG. La mezcla se vertió sobre cajas petri con medio mínimo Vogel-Bonner y se incubó por 37°C por 48 horas. Cada punto en el gráfico representa el promedio de revertantes de His⁺ encontradas en tres réplicas de cultivo a la concentración de BG indicada. * Diferencia significativa con el control (0 μg de BG), con una $P \leq 0.05$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.05$.

En la figura 14 observamos el efecto de 0, 1, 5, 10, 15, 20 y 25 μg de BG sobre la activación del 25 μg de BaP; mutágeno activado principalmente por CYP1A1. Se utilizaron dos sistemas de activación enzimática hepática: 1) S9 $\beta\text{-NF}/\text{FB}$ y 2) S9 $\beta\text{-NF}$, las cuales se diferencian en las enzimas CYP que inducen. Observamos que el sistema de $\beta\text{-NF}/\text{FB}$ genera mayor número de revertantes en comparación con $\beta\text{-NF}$ y que la BG protege del daño mutagénico ocasionado por el BaP en ambos tipos de activación.

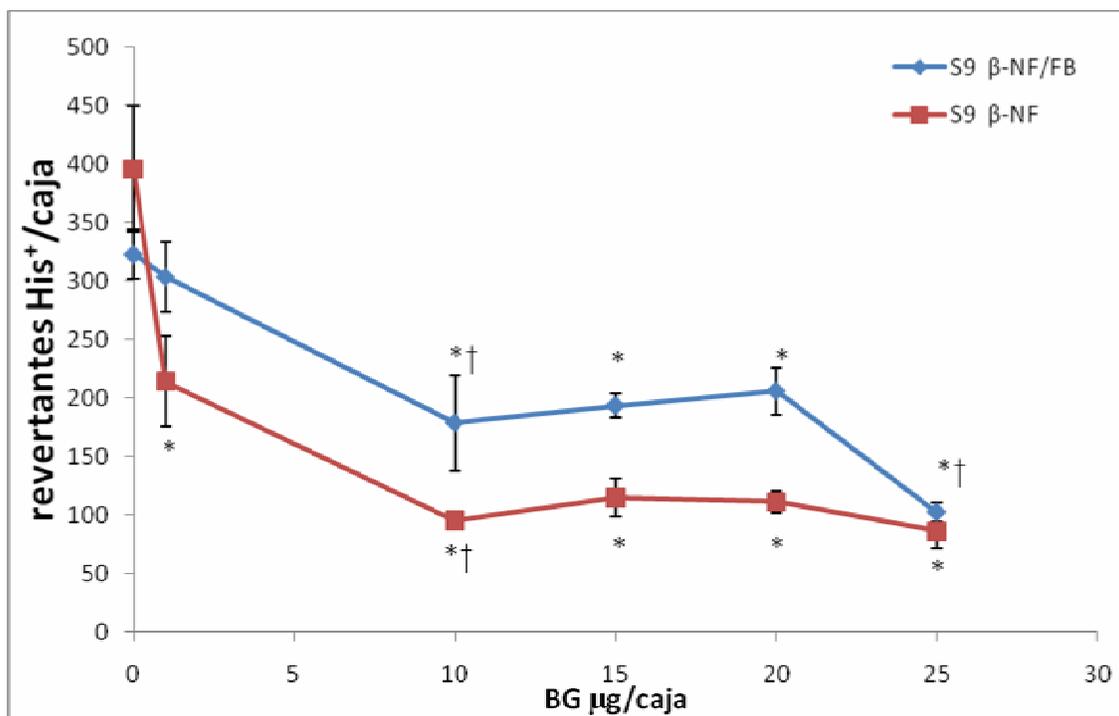


Fig. 14 Efecto protector de BG sobre la mutagenicidad de 3-MC en la prueba de Ames. En un tubo estéril con 2 mL de agar de superficie se agregaron 25 μg de BaP, 0.1 mL de cultivo de 16 h de *S. typhimurium cepa TA98*, 500 μL de mezcla S9 (28.7 y 31.2 mg de proteína de la fracción S9 $\beta\text{-NF}/\text{FB}$ y $\beta\text{-NF}$, respectivamente, por 10 mL de mezcla) y 0, 1, 5, 10, 15, 20 o 25 μg de BG. La mezcla se vertió sobre cajas petri con medio mínimo Vogel-Bonner y se incubó por 37°C por 48 horas. Cada punto en el gráfico representa el promedio de revertantes de His⁺ encontradas en tres réplicas de cultivo a la concentración de BG indicada. * Diferencia significativa con el control (0 μg de BG), con una $P \leq 0.05$, † Diferencia significativa con la muestra que le antecede con una $P \leq 0.05$.

DISCUSIÓN

En la vida diaria nos exponemos a una gran variedad de compuestos químicos, ya sea por el ambiente, lugar de trabajo o nuestra alimentación. Muchos de aquellos compuestos pueden resultar potencialmente tóxicos y otros, por el contrario, benéficos. En nuestra dieta diaria se encuentran presentes una diversa cantidad de compuestos químicos que resultan no sólo nutritivos sino protectores ante enfermedades diversas. El jugo de toronja es inhibidor de enzimas del sistema enzimático CYP (52), lo cual es de gran interés debido a su efecto en la modulación de la farmacocinética de una gran cantidad de fármacos metabolizados por éstas enzimas. Aunado a lo anterior, las isoformas del CYP relacionadas con el metabolismo de compuestos carcinogénicos pueden ser susceptibles a la inhibición por los compuestos del jugo de toronja, sobresaliendo las isoformas de la subfamilia de CYP1A, específicamente CYP1A1, por estar íntimamente relacionado con el metabolismo de compuestos del tipo PAHs, aminas aromáticas policíclicas y policlorinados, siendo sus metabolitos compuestos potencialmente reactivos con ADN y proteínas. De los fitoquímicos que constituyen al jugo de toronja la NG, la BG y la DHB, han sido de gran interés debido a su concentración en el jugo de toronja y a sus efectos sobre el metabolismo de diversos compuestos (47, 52). En estudios previos, estos compuestos fueron probados *in vitro* como inhibidores de enzimas como CYP3A4, CYP1A2, CYP1B1, CYP3A5, CYP2D6, resultando ser inhibidores de éstas a diferentes concentraciones (52, 58, 59). Sin embargo, la BG presentó tendencia de ser el inhibidor más potente en comparación con NG y DHB. Por nuestro lado, como parte de mi tesis de licenciatura realizamos pruebas de inhibición *in vitro* de estos compuestos sobre CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2, que son de nuestro interés por su participación en la activación de compuestos mutagénicos. Como resultado del estudio determinamos que la BG es el inhibidor más potente las enzimas evaluadas y sobretodo de CYP1A1, en comparación con NG y DHB, con una $CI_{50} = 0.19 \mu\text{M}$. En estudios sobre BG y su efecto en enzimas de CYP, realizados por otros grupos investigación, se demostró que es inhibidor irreversible de CYP3A4, CYP3A5 y CYP2D6 (59); se obtuvo su CI_{50} sobre la actividad EROD en microsomas de cultivo primario de hepatocitos de rata ($CI_{50}=1.24 \times 10^{-7}\text{M}$) (62); Cai reportó que la BG es un inhibidor no competitivo de la actividad EROD de microsomas hepáticos de ratones tratados con 3-MC (63). Para complementar estos estudios bioquímicos de BG sobre CYP1A1, consideramos necesario determinar el tipo de inhibición que BG ejerce sobre CYP1A1, con base en su posible actividad como agente quimioprotector. El aporte que Cai hizo con respecto a la inhibición no competitiva de BG sobre la actividad EROD, no nos precisa que este

tipo de inhibición se presenta sobre CYP1A1, debido a que dicha actividad EROD puede ser dada no sólo por CYP1A1 sino también por CYP1A2, la cual también es inducida por 3-MC (71), además de la influencia de las otras enzimas presentes en la fracción microsomal hepática de ratones. Es por ello que nos planteamos como primer objetivo evaluar el tipo de inhibición que BG ejerce sobre CYP1A1 en Supersome®, el cual es un sistema que contiene a la enzima semipura. Comenzamos por determinar que CYP1A1 es una enzima que sigue una cinética del tipo michaeliana con una $V_{max}=6.141\pm 0.255$ mU/pmol proteína y una $K_m=0.0723\pm 0.0079$ μ M (Fig. 8), datos que concuerdan con los obtenidos previamente por Dávila et al. (72). Continuamos nuestro estudio con los ensayos de inhibición de CYP1A1 por varias concentraciones de BG. La elección de dichas concentraciones se hizo con base en un estudio de exploración (Apéndice I, fig. 3), en el cual se probaron concentraciones que abarca un intervalo de 5 pmol - 50 nM de BG sobre CYP1A1 recombinante (Supersome®). Con base en la concentración a la cual se obtuvo mayor inhibición de la enzima, inicialmente propusimos trabajar en el intervalo de 0 a 10 nM de BG para finalmente decidimos por 0, 4, 8, 12 y 16 nM, concentraciones a las cuales se observa la inhibición paulatina de CYP1A1 pero no proporcional a las concentraciones usadas (**fig. 9**). Al obtener los gráficos de dobles recíprocos observamos que el inhibidor se comporta como un inhibidor competitivo de CYP1A1 (**fig. 9**), esto lo confirmamos con el gráfico de Dixon y el regráfico de sus pendientes versus concentración de sustrato (**fig. 10**), en donde se muestra claramente la inhibición competitiva de CYP1A1 por BG con una $K_i=10.703$ nM.

Al inhibir competitivamente a CYP1A1 nos da la posibilidad de plantear la hipótesis de que la BG presenta actividad antígenotóxica contra los agentes genotóxicos que son sustrato del CYP1A1 compitiendo con ellos por el sitio activo de la enzima. Para comprobar esta hipótesis hicimos uso de dos de las pruebas más utilizadas y recomendadas para la determinación de agentes mutagénicos y antimutagénicos, la prueba de micronúcleos y la prueba de Ames. Para la prueba de micronúcleos, por su sencillez y la posibilidad de hacer multimuestras, optamos por el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratones y escogimos al BaP como agente genotóxico, dado que es un procarcinógeno bioactivado por CYP1A1, de tal forma que si bajo las condiciones de nuestro estudio la BG inhibe a CYP1A1 protegerá del daño genotóxico ocasionado por BaP. En la **fig. 11** mostramos los resultados del efecto de los distintos tratamientos sobre la inducción de MNPE en sangre periférica de ratones a las 24 horas de la última administración. A este tiempo, en el tratamiento con aceite de maíz (control negativo de la inducción de MN), se obtuvo una frecuencia de 1.5 ± 1.06 MNPE/1000PE y con la administración de 262 μ g/Kg de BG al

segundo grupo de ratones se obtuvo una frecuencia 1.3 ± 0.69 MNPE/1000PE. Ambos controles (aceite de maíz y de BG), se encuentran dentro de la frecuencia basal de MN en ratón. La administración del tercer grupo con 320 mg/Kg de BaP resultó una frecuencia de 2.4 ± 1.51 MNPE/1000PE y con el tratamiento de 262 μ g/Kg de BG por 5 días y una sola dosis de 320 mg/Kg de BaP el día 5, la frecuencia de micronúcleos resultante fue de 3.3 ± 1.48 MNPE/1000PE. Como se puede observar a este tiempo no hay inducción de MNPE por BG ni por BaP y por tanto tampoco es posible observar el efecto protector de BG. A las 48 horas (**Fig. 12**), en el tratamiento con aceite de maíz se obtuvo una frecuencia de 1.2 ± 0.31 MNPE/1000 PE y con 262 μ g/Kg de BG para el segundo grupo se obtuvieron 1.44 ± 0.46 MNPE/1000 PE; comparados con los resultados de los tratamiento respectivos a las 24 horas, no se observa incremento de MNPE tanto con aceite de maíz como con BG. En el tratamiento con BaP hay una tendencia al incremento en la frecuencia de MNPE aumentando la frecuencia a 8.16 ± 6.35 MNPE/1000PE, la cual es disminuida con la administración de BG (262 μ g/Kg BG/320 μ g/Kg BaP), resultando una frecuencia de 5.24 ± 1.37 MNPE/1000PE. La concentración de BG con la que se trabajó se escogió con base en la cantidad de BG contenida en 250 mL de jugo de toronja, cantidad generalmente ingerida por la población (48-50). Bajo nuestras condiciones experimentales la BG no mostró proteger del daño genotóxico generado BaP. Estos resultados pueden deberse a que la cantidad de BG no es la suficiente como para observar un efecto protector *in vivo*. Hasta el momento sólo se tiene un estudio en el perro Beagle, en el cual aseguran que a los 20 min de administración oral de BG se puede encontrar al compuesto en plasma, sin embargo (por las bajas concentraciones que utilizaron del compuesto), no fue posible calcular parámetros farmacocinéticos (61). Ni en rata ni ratón se han realizado estudios de farmacocinética de este compuesto, por lo cual no sabemos la concentración de BG que se tiene en plasma y menos si es la necesaria para inhibir a CYP1A1 y evitar la activación del BaP presente en el hígado, sin embargo, si observamos la tendencia de las medianas en la fig. 12, podemos observar que hay tendencia a la disminución de la formación de micronúcleos, sugiriendo una posible protección al daño genotóxico ocasionado por el BaP, que bajo nuestras condiciones de estudio no fue posible determinar de forma significativa.

Para complementar los estudios *in vivo*, decidimos realizar un estudio *in vitro* y optamos por el ensayo de antimutagenesis de Ames. Utilizamos a *Salmonella typhimurium cepa TA98* como cepa de prueba y como agentes mutagénicos al BaP y al 3-MC, los cuales son principalmente metabolizados por CYP1A1 y CYP1A2, respectivamente. Como podemos observar en las figuras 13 y 14, la protección que ejerce la BG contra el daño mutagénico es evidente,

aunque en el ensayo con 3-MC a bajas concentraciones de BG se observa un ligero incremento en el número de revertantes de His⁺, lo cual puede deberse a que la alta afinidad de BG por CYP1A1 da oportunidad a que las otras enzimas presentes en el sistema S9 metabolicen al 3-MC, principalmente CYP1A2, y con ello se favorezca su efecto mutagénico. Conforme se incrementa la concentración de BG, su efecto sinergista sobre la mutagenicidad de 3-MC se pierde y se hace evidente la capacidad protectora de la BG, lo cual sugiere que las demás enzimas involucradas en el metabolismo de 3-MC también están siendo inhibidas por BG. El efecto antimutagénico de BG sobre el daño generado por BaP es mucho más evidente, así como que este efecto está directamente relacionado con la inhibición de CYP1A1. El BaP es principalmente metabolizado por CYP1A1, y la β -NF la induce preferencialmente, de tal manera que el efecto protector de BG sobre el daño por BaP lo podemos atribuir a su inhibición por BG. En otros estudios, como el de protección de formación de aductos por BaP y dimetilbenzantraceno (65), también es claro que dicha protección es debida a la capacidad de la BG de interferir con la activación de estos compuestos.

En su conjunto, los estudios de inhibición enzimática de CYP1A1 y antigenotoxicidad tanto *in vivo* como *in vitro* demuestran cómo la BG puede prevenir del daño causado por agentes genotóxicos que sean metabolizados por CYP1A1. Según Stoner et al. (3) y su clasificación de agentes quimioprotectores, la BG puede ser catalogada como agente bloqueador en función de su efecto inhibitorio sobre una enzima de CYP que participa en la bioactivación de pro-carcinógenos. Sin embargo, un inhibidor de CYPs tiene dos facetas, pues puede ser benéfico o nocivo dependiendo su dosis, del estado fisiológico del individuo, del órgano en el que se está evaluando, de su biodisponibilidad, y también hay que tomar en cuenta que si bien se estaría inhibiendo el metabolismo de un compuesto procarcinogénico eso mismo pasa con su desintoxicación y la de muchos compuestos a los que, siendo realistas, también estaría expuesto el individuo y que necesitan ser eliminados.

Los estudios epidemiológicos e *in vitro* permiten sugerir a varios fitoquímicos con propiedades quimioprotectoras contra el proceso de carcinogénesis como agentes potencialmente quimioprotectores (3, 9-12). Actualmente se hace uso indiscriminado de esos agentes agregándolos en grandes cantidades en suplementos alimenticios para el consumo humano, dejando fuera información fundamental para el consumidor como: dosis farmacológicas, ingesta diaria recomendada y contraindicaciones; las cuales requieren de un amplio estudio del compuesto tal como se hace en el desarrollo de fármacos. A pesar de saber que los fitoquímicos

con características quimioprotectoras son xenobióticos, la necesidad de probarlos antes de darles amplio uso es frecuentemente sobrestimada.

CONCLUSIONES

Nuestro aporte en cuanto al estudio de la bergamotina como agente quimioprotector es que es un inhibidor competitivo de CYP1A1, con una $K_i=10.703$ nM. En cuanto a su capacidad de protección contra agentes carcinogénicos los resultados muestran una clara protección al daño genotóxico *in vitro*. En el ensayo de antimutagenesis con BaP y 3-MC su efecto protector contra agentes mutagénicos fue evidente. *In vivo*, bajo nuestras condiciones experimentales, no observamos efecto protector contra el agente genotóxico probado. De momento podemos concluir que la BG es un agente quimioprotector en base a la protección al daño mutagénico, sin embargo, hace falta demostrar la protección a agentes genotóxicos. Dicha protección es debida a su intervención en la activación de compuestos pro-carcinogénicos.

PERSPECTIVAS

Hay mucho más por evaluar acerca del efecto de la BG tanto *in vivo* como *in vitro* en distintos modelos, ya sea animal, líneas celulares o bacterias, con la finalidad de saber lo más que se pueda sobre este compuesto y su acción al ingresar en un organismo, no sólo en función del beneficio que nos pudiera proveer sino de los daños que nos puede causar, recordando que es un compuesto que se encuentra en un alimento que es parte de la dieta de la población en general.

Los estudios que consideramos más necesarios son:

- Estudios de farmacocinética y farmacodinamia.
- Efecto inhibitor o inductor sobre otras enzimas de CYP y de fase II en el hígado y en distintos órganos extrahepáticos.
- Estudios de inhibición e inducción de enzimas metabólicas en distintos periodos de tiempo.
- Ensayos de protección genotóxica en distintos modelos, concentraciones y periodos de tiempo.

Para enriquecer nuestro estudio en particular, como perspectivas tenemos:

- Realizar los experimentos de antigenotoxicidad con otras concentraciones de BG.

- Determinar la cantidad de CYP1A1 en microsomas tratados con BaP, BG y BaP/BG.

APÉNDICE I

En la figura 1 confirmamos la alta pureza del CYP1A1 sobreexpresado en baculovirus utilizado para los ensayo de inhibición con BG. La figura es una membrana teñida con Solución de Ponceau ® después de efectuadas la electroforesis y la transferencia de la proteína a la membrana de nitrocelulosa.

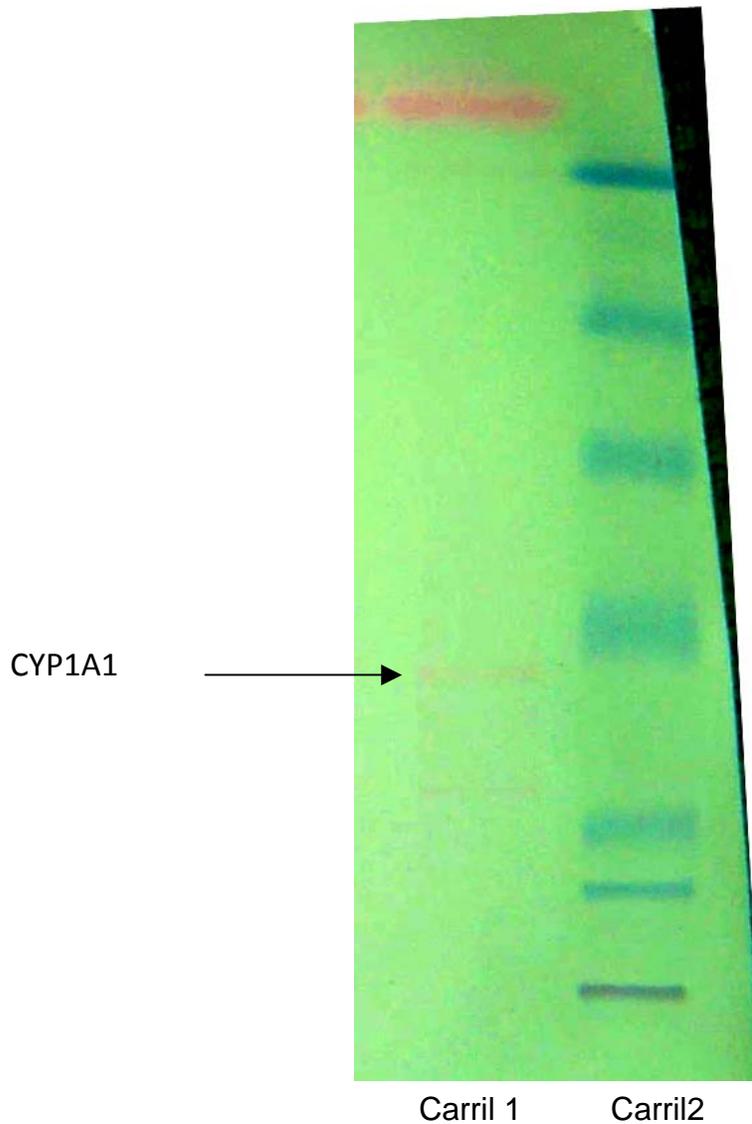


Fig. 1. Membrana de nitrocelulosa teñida con Solución de Ponceau S ®. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: CYP1A1. Las muestras se sometieron a electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y teñidas con Solución de Poceau S ®.

En la fig. 2 se presenta la evaluación del efecto de BG sobre la fluorescencia de la resorufina en tres diferentes concentraciones de BG, 0.5, 2 y 16 μM . Encontramos 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 ejerce sobre las enzimas evaluadas y no por su interferencia con la fluorescencia de la resorufina.

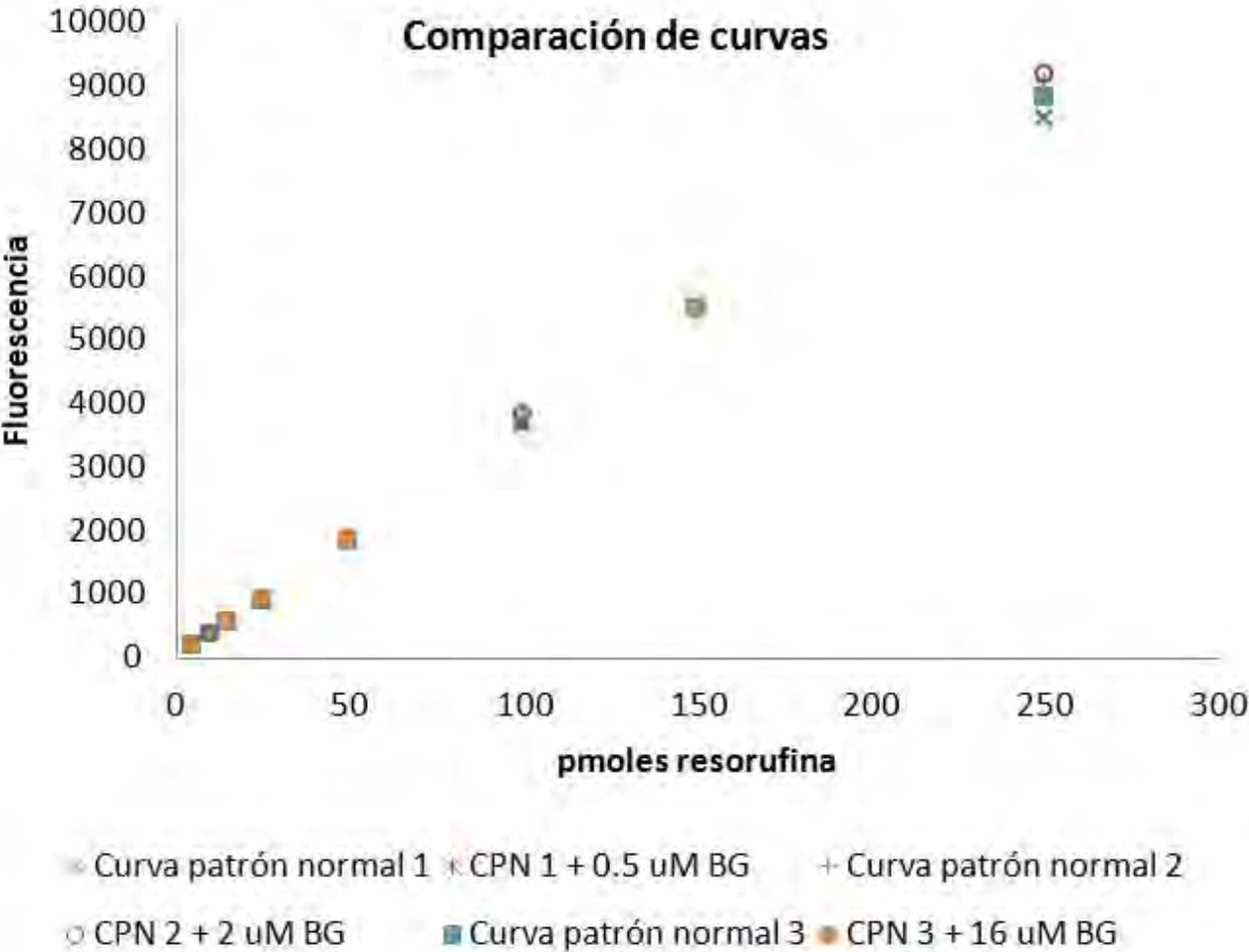


Fig. 2. Efecto de BG sobre la fluorescencia de la resorufina. Se realizó por triplicado la curva patrón de resorufina con y sin BG a tres diferentes concentraciones de 0.5, 2 y 16 μM de esta molécula.

En la figura 3 se presenta el resultado de un estudio exploratorio en el que se evaluaron 0, 5, 50, 500 pmol y 5 y 50 nmol de BG sobre CYP1A1 (Supersoma ®). Obuvimos inhibición del CYP1A1 proporcional a la concentración de BG utilizada; 5 nmol y 50 nmol son las concetraciones con las se observa mayor inhibición y diferencia significativa con respecto al control (0 nM de BG).

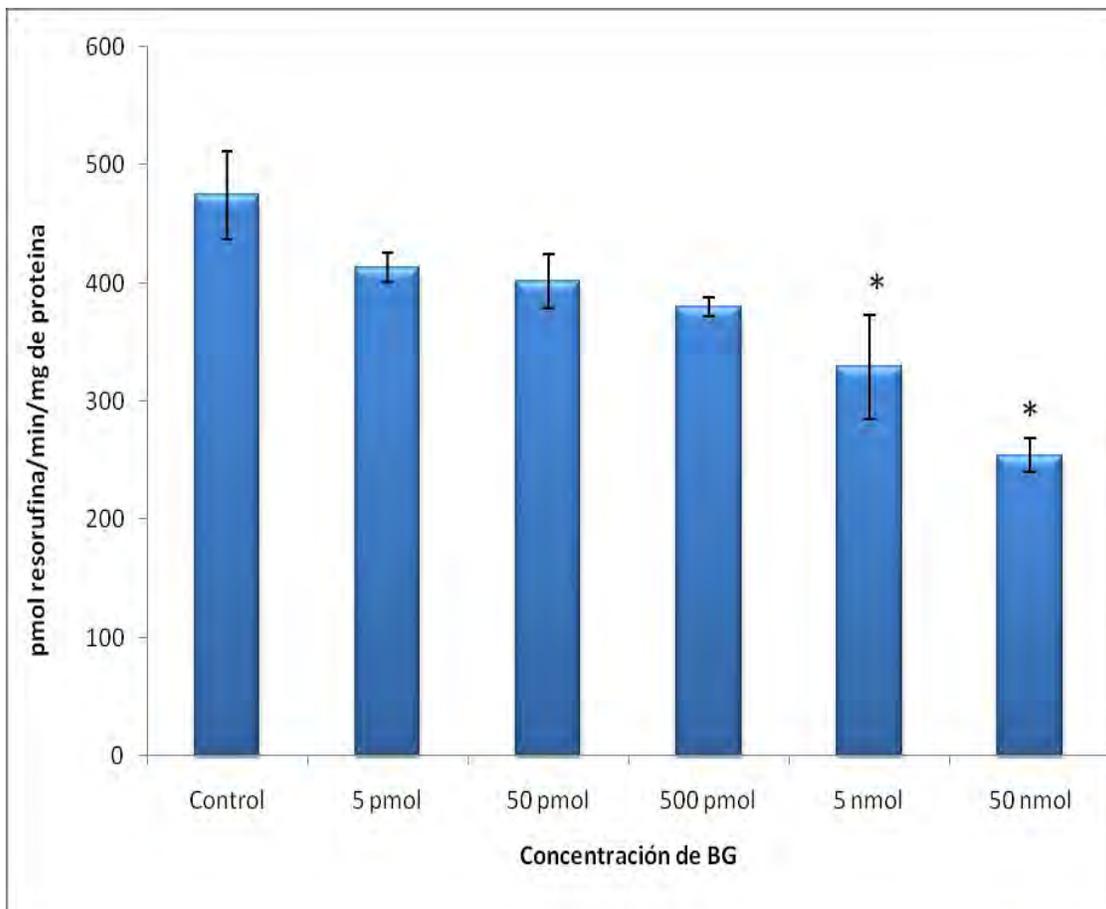


Fig. 3 Estudio exploratorio del efecto de distintas concentraciones de BG sobre CYP1A1 supersoma ®. La reacción se llevó a cabo por triplicado durante 1.5 minutos con 1 pmol de proteína (Supersome ®), 50 mM de NADPH, 50 µM de etoxirresorufina y en reacciones independientes 0, 5, 50, 500 pmol y 5 y 50 nM de BG a un volumen final de amortiguador (pH 7.6) de 1 mL. * Diferencia significativa con el control con una $P \leq 0.05$ y Tukey como prueba Post hoc.

REFERENCIAS

1. **Maquardt, H., Schäfer, S.G. and McClellan, R.O.** *Toxicology*. s.l. : Academic Press, 1999.
2. **Hodgson, E. and Smart, R.C.** *Introduction to biochemical toxicology*. s.l. : Wiley-Interscience, 2001. p. 134.
3. **Stoner, G.D., Morse, M.A. and Kelloff, G.J.** 1997, *Perspectives in cancer chemoprevention*. Environmental Health Perspectives, Vol. 105, pp. 945-954.
4. **Wattenberg, L.W.** 1985, *Chemoprevention of cancer*. Cancer Research, Vol. 45, pp. 1-8.
5. **Hodel, P., et al., et al.** 2009, *Chemopreventive Compounds - View from the other side*. Chemico-Biological Interactions, Vol. 180, pp. 1-9.
6. **Dixit, R., et al., et al.** 1985, *Inhibition of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-trans-7,8-diol metabolism and DNA binding in mouse lung explants by ellagic acid*. Cancer Research, Vol. 45, pp. 2951-2956.
7. **Mandal, S., et al., et al.** 1988, *Inhibition of N-nitrosobenzylmethylamine metabolism and DNA binding in cultured rat esophagus by ellagic acid*. Carcinogenesis, Vol. 9, pp. 1313-1316.
8. **Zhang, Y., et al., et al.** 1994, *Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbomyl isothiocyanates*. Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 91, pp. 3147-3150.
9. **Sing, R.P. and Agawal, R.** 2004, *Prostate cancer prevention*. Current Cancer Drug Targets, Vol. 4, pp. 1-11.
10. **Fisher, B., et al., et al.** 1998, *Tamoxifen for prevention of breast cancer. Report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 study*. Journal of National Cancer Institute, Vol. 90, pp. 1371-1388.
11. **Cummings, S.R., et al., et al.** 1999, *The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial*. Journal of the American Medical Association, Vol. 281, pp. 2189-2197.
12. **Veronesi, U., et al., et al.** 1999, *Randomized trial of fenretinide to prevent second breast malignancy in women with early breast cancer*. Journal of National Cancer Institute, Vol. 91, pp. 1847-1856.
13. **Guengerich, F.P.** 1992, *Cytochrome P450: advances and prospects*. The FASEB Journal, Vol. 6, pp. 667-668.
14. **Coon, M.J., et al., et al.** *Cytochrome P450: progress and predictions*. 1992, The FASEB Journal, Vol. 6, pp. 669-672.
15. **Costas, L.** *Xenobiotic metabolism an overview. Enzyme systems that metabolize drugs and other xenobiotics*. s.l. : John Wiley and Sons, 2005. pp. 1-29.
16. **Ortiz de Montellano, P.** *Models and Mechanism of Cytochrome P450 Action. Cytochrome P450: Structure, mechanism and function*. 3th. New York : Plenum Publishers, 2005.
17. **Nebert, D.W., et al., et al.** 1991, *The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature*. DNA Cell Biology, Vol. 10, pp. 1-14.
18. **Nelson, DR, et al., et al.** 1996, *P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature*. Pharmacogenetics, Vol. 6, pp. 1-42.

19. **Hollenberg, P.F.** 1992, *Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism*. The FASEB Journal, Vol. 6, pp. 686-694.
20. *Cytochrome P450cam: crystallography, oxygen activation and electron transfer*. **Poulos, T.L. and Raag, R.** 1992, The FASEB Journal, Vol. 6, pp. 674-679.
21. **Munro, A.W., Girvan, H.M. and McLean, K.** 2007, *Variations on a (h)eme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the Cytochrome P450 superfamily*. *Natura Product Reports*, Vol. 24, pp. 585-609.
22. **Prough, R.A., Burke, M.D. and Mayer, R.T.** 1987, *Direct fluorometric methods for measuring mixed-function oxidase activity*. *Methods in Enzymology*, Vol. 52, pp. 372-377.
23. **Bauer, E., et al., et al.** 1995, *Oxidation of benzo [a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes*. *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 8, pp. 132-142.
24. **Shou, M, et al., et al.** 1996, *Metabolic activation of potent carcinogen dibenzo(a,h)anthracene by human recombinant cytochrome P450, lung and liver microsomes*. *Carcinogenesis*, Vol. 17, pp. 2429-2433.
25. **Shou, M., et al., et al.** 1996, *Metabolic activation of potent carcinogen dibenzo(a,h)anthracene by cDNA-expressed human cytochromes P450*. *Arch Biochem Biophys*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 328, pp. 201-207.
26. **Shimada, T., et al., et al.** 1996, *Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P4501B1*. *Cancer Research*, Vol. 56, pp. 2976-2984.
27. **Redic, S.** 2002, *Summary of information on human CYP enzymes: Human P450 metabolism data*. *Drug Metabolism Reviews*, Vol. 334, pp. 83-448.
28. **Liehr, J.G., et al., et al.** 1986, *Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters*. *Journal of Steroid Biochemistry*, Vol. 24, pp. 353-356.
29. **Li, J.J. and Li, S.A.** 1996, *Estrogen carcinogenesis in Syrian hamster tissues: role of metabolism*. *Federation Proceedings*, Vol. 46, pp. 1858-1863.
30. **Tang, M.S., et al., et al.** 2000, *Both syn- and anti-7,12-dimethylbenz[a]anthracene-3,4-diol-1,2-epoxides initiate tumors in mouse skin that possess-CAA- to -CTA-mutations at Codon 61 of c-H-ras*. *Cancer Research*, Vol. 60, pp. 5688-5695.
31. **Gelboin, H.** 1980, *Benzo[a]pyrene Metabolism, Activation, and Carcinogenesis: Role and Regulation of Mixed-Function Oxidases and Related Enzymes*. *Physiological Reviews*, Vol. 60, pp. 1907-1966.
32. **Haenszel, W. and Traueber, K.E.** 1964, *Lung cancer mortality as related to residence and smoking histories. II. White females*. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 32, pp. 803-838.
33. **Digiovanni, J.** 1992, *Multistage carcinogenesis in mouse skin*. *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 54, pp. 63-128.
34. **Shimada, H, et al., et al.** 1992, *The micronucleus test of benzo[a]pyrene with mouse and rat peripheral blood reticulocytes*. *Mutation Research*, Vol. 278, pp. 165-178.

35. **Heddle, JA.** 1973, *A rapid in vivo test for chromosomal damage*. Mutation Research, Vol. 18, pp. 187-190.
36. **Obe, G.** *Advances in mutagenesis research*. 5th. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 1994.
37. **McGregor, JT, Wehr, CM and Gould, DH.** 1980, *Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test*. Environmental Mutagenesis, Vol. 2, pp. 509-514.
38. **The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test.** 1985, *Sex difference in the micronucleus test*. Mutation Research, Vol. 172, pp. 151-163.
39. **The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test.** 1987, *Strain difference in the micronucleus test*. Mutation Research, Vol. 204, pp. 307-316.
40. **The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test.** 1990, *Single versus multiple dosing in the micronucleus test: the summary of the fourth collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS*. Mutation Research, Vol. 234, pp. 205-222.
41. **Hayashi, M, et al., et al.** 1994, *In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay*. Mutation Research, Vol. 274, pp. 173-215.
42. **Maron, D. and Ames, B.** 1983, *Revised methods for the salmonella mutagenicity test*. Mutation Research, Vol. 113, pp. 186-190.
43. **Espinosa, JJ.** *Metodos para la detección de mutaciones génicas en Salmonella typhimurium*. [book auth.] C Cortinas de Nava and P Ostrosky de Wegman. *Manual de métodos para la identificación de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales*. México D.F. : Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 1980, pp. 31-50.
44. **Cerda, JJ, Norma, SJ and Sullivan, MP.** 1994, *Inhibition of atherosclerosis by dietary pectin in microswine with sustained hypercholesterolemia*. Circulation, Vol. 89, pp. 1247-1253.
45. **So, FV, et al., et al.** 1996, *Inhibitors of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices*. Nutrition Cancer, Vol. 26, pp. 167-181.
46. **Baley, DG, et al., et al.** 1989, *Ethanol enhances the hemodynamic effects of felodipine*. Clinical and Investigative Medicine, Vol. 12, pp. 357-362.
47. **Castro, W.V., et al., et al.** 2006, *Variation of Flavonoids and Furanocoumarins in Grapefruit Juices: A Potential Source of Variability in Grapefruit Juice-Drug Interaction Studies*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 54, pp. 249-255.
48. **Fuhr, U, Klitlich and Staib, AH.** 1993, *Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal naringenin on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man*. British Journal of Clinical Pharmacology, Vol. 35, pp. 431-436.
49. **Xiao Dong, S, et al., et al.** 1999, *Possible enhancement of the first pass metabolism of phenacetin by ingestion of grapefruit juice in chinese subjects*. British Journal of Clinical Pharmacology, Vol. 48, pp. 638-640.
50. **Fuhr, U, et al., et al.** 2002, *Effects of grapefruit juice and smoking on verapamil concentrations in steady state*. European Journal of Clinical Pharmacology, Vol. 58, pp. 45-52.
51. **Kane, GC and Lipsky, JJ.** 2000, *Drug-Grapefruit juice interactions*. Clinical Proceedings, Vol. 75, pp. 933-942.

52. **Tassaneeyakul, W., et al., et al.** 2000, *Inhibition Selectivity of Grapefruit juice components on human Cytochrome P450*. Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 378, pp. 356-363.
53. **Wargovich, MJ.** 1997, *Experimental evidence for cancer preventive elements in foods*. Cancer letters, Vol. 114, pp. 11-17.
54. **Lilja, J.J., et al., et al.** 1998, *Grapefruit juice substantially increases plasma concentrations of buspirone*. Clinical Pharmacology and Therapeutics, Vol. 64, pp. 477-483.
55. **Lilja, J.J., Kivistö, K.T. and P.J., Neuvonen.** 1999, *Grapefruit juice increases serum concentrations of atorvastatin and has no effect on pravastatin*. Clinical Pharmacology and Therapeutics, Vol. 66, pp. 118-127.
56. **Lilja, J.J., Kivistö, K.T. and Neuvonen, P.J.** 2000, *Duration of effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of the CYP3A4 substrate simvastatin*. Clinical Pharmacology and Therapeutics, Vol. 68, pp. 384-390.
57. **He, K., et al., et al.** 1998, *Inactivation of cytochrome P450 3A4 by Bergamottin, a component of grapefruit juice*. Chemical Research in Toxicology, Vol. 11, pp. 252-259.
58. **Paine, MF, Criss, AB and Watkins, PB.** 2004, *Two major grapefruit juice components differ in intestinal cyp3a4 inhibition kinetic and binding properties*. Drug Metabolism and Disposition, Vol. 313, pp. 1146-1153.
59. **Lin, H., Kent, U.M. and P.F., Hollenberg.** 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*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 313, pp. 154-164.
60. **Kleiner, H.E., et al., et al.** 2008, *Effects of naturally occurring coumarins on hepatic drug-metabolizing enzymes in mice*. Toxicology and Applied Pharmacology, Vol. 232, pp. 337-350.
61. **Sahi, J., et al., et al.** 2002, *The effect of bergamottin on diazepam plasma levels and p450 enzymes in beagle dogs*. Drug Metabolism and Disposition, Vol. 30, pp. 135-140.
62. **Baumgart, A., et al., et al.** 2005, *Natural furanocoumarins as inducers and inhibitors of cytochrome P450 1A1 in rat hepatocytes*. Biochemical Pharmacology, Vol. 69, pp. 657-667.
63. **Cai, Y.** 1993, *Inhibition and inactivation of murine hepatic ethoxy- and pentoxyresorufin O-dealkylase by naturally occurring coumarins*. Chemical Research in Toxicology, Vol. 6, pp. 872-879.
64. **Cai, Y., et al., et al.** 1997, *Effect of naturally occurring coumarins on the formation of epidermal DNA adducts and skin tumors induced by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in SENCAR mice*. Carcinogenesis, Vol. 18, pp. 1521-1527.
65. **Kleiner, H.E., Reed, M.J. and DiGiovanni, J.** 2003, *Naturally Occurring Coumarins Inhibit Human Cytochromes P450 and Block Benzo[a]pyrene and 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene DNA Adduct Formation in MCF-7 Cells*. Chemical Research Toxicology, Vol. 16, pp. 415-422.
66. **Bradford, M.** 1976, *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, Vol. 72, pp. 248-254.
67. **Bonifacino, JS, et al., et al., [ed.].** 1998, *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley and Sons, pp. 6.2.1-6.2.20.

68. **Burke, MD, et al., et al.** 1985, *Ethoxy-, penthoxy-, and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced Cytochromes P450*. *Biochemical Phamacology*, Vol. 34, pp. 3337-3345.
69. **Burke, MD and Mayer, RT.** 1975, *Cytochrome P450 and P488 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation in human and rat liver*. *Drug Metabolism and Disposition*, Vol. 3, pp. 245-253.
70. **Burke, MD, et al., et al.** 1994, *Cytochrome P450 specificiencies of alcoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver*. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 3, pp. 923-936.
71. **Lewis, DF, Modi, S and Dickins, M.** 2002, *Structure-activity relationship for human cytochrome P450 substrate and inhibitors*. *Drug Metabolism Reviews*, Vol. 34, pp. 69-82.
72. **Dávila, V, et al., et al.** 2007, *Induction of CYP1A1 and CYP2E1 in rat liver by histamine: binding and kinetics studies*. *Toxicokinetics and Metabolism*, Vol. 81, pp. 697-709.