



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

MODULACIÓN DEL CITOCROMO P- 450 HÉPÁTICO
POR EFECTO DE LOS EXTRACTOS METANÓLICO Y
ACETÓNICO DE *Heterotheca inuloides*.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO - BIÓLOGO

PRESENTA

ULISES CORONA ACEVEDO



MEXICO D.F

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE **Profesor: Rogelio Gregorio Pereda Miranda**

VOCAL **Profesor: Perla Carolina Castañeda López**

SECRETARIO **Profesor: Jesús Javier Espinosa Aguirre**

1er. SUPLENTE **Profesor: María Elena Bravo Gómez**

2° SUPLENTE **Profesor: Mabel Clara Fragoso Serrano**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA

Jesús Javier Espinosa Aguirre

SUPERVISOR TÉCNICO

Sandra Luz Hernández Ojeda

SUSTENTANTE

Ulises Corona Acevedo

ÍNDICE

I.	Introducción	6
II.1	Árnica (<i>Heterotheca inuloides</i>)	7
II.1.1	Importancia Farmacológica	8
II.1.2	Principales Metabolitos	9
II.2	Citocromo P450	10
II.2.1	Generalidades	10
II.2.2	Clasificación	13
II.2.3	Metabolismo hepático de xenobióticos	14
II.2.4	Ciclo Catalítico	15
II.2.5	Importancia de las familias CYP 1 2 y 3	17
II.	Planteamiento del Problema	20
III.	Hipótesis	21
IV.	Objetivos	21
V.	Diseño Experimental	22
VI.	Metodología	23
VII.1	Diagrama de Flujo	23
VII.2	Preparación y obtención de la Fracción S9	23
VII.3	Preparación y obtención de la Fracción Microsomal	24
VII.4	Cuantificación de Proteína	25
VII.5	Actividad Enzimática de familias CYP 1A, 2B y 2E	25
VII.6	Prueba de Ames	30
VII.7	Análisis estadístico	32
VII.	Resultados	
VIII.1	Determinación de la Actividad Enzimática	33
VIII.2	Prueba de Ames	41
VIII.	Análisis de resultados	42
IX.	Discusión y Conclusiones	47
X.	Anexos	48
XII.	Referencias	50

Dedicatorias

Dedicó este trabajo a mi familia de manera muy especial a mi madre Margarita porque siempre confió en mí, me impulso en los momentos difíciles y sin duda su apoyo reclamos y amor me permiten salir siempre adelante porque en gran parte gracias a ella hoy puedo ver alcanzada esta meta, a mi tía Marina que es mi segunda madre y a la que también quiero muchísimo, a mis primos Atzin y Ezequiel, que han sido como mis hermanos.

A las Familias Acevedo, Camacho, Cornejo, Hernández, Jurado y Yañez mis palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos a todos espero no defraudarlos y contar siempre con su cariño sincero e incondicional.

A mi alma mater, Universidad Nacional Autónoma de México que me brindo el privilegio de formar parte de ella.

Agradecimientos

Al Dr. Javier Espinosa Aguirre por transmitirme un poco de su conocimiento, sus consejos y el gran apoyo ofrecido para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rafael Camacho Carranza por su crítica constructiva, sus comentarios acertados y por hacer el trabajo más agradable.

A la Dr. Elvia Coballase Urrutia gracias por ser un magnífico ejemplo de profesionalismo, dedicación y por ser también mi guía.

A la Bióloga Sandra Luz Hernández Ojeda por el apoyo técnico en la realización de mi trabajo además de tu gran ayuda, tu enorme paciencia y toda tu comprensión.

Al Dr. Omar Arellano Aguilar por el apoyo en el análisis estadístico de los resultados de mi trabajo.

A todos los miembros del Jurado por sus recomendaciones y ayuda en la mejora de mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio muy en especial a Neus, Claudia, Ana, Javier, Mariana, Sitlali, Evelin, Lolita, Dulce y Gaby quienes siempre me brindaron su apoyo, su agradable compañía, sus sabios consejos y quienes hicieron muy feliz la estancia en el laboratorio.

A todos mis amigos que son como mi segunda familia, a los que agradezco por su sinceridad que ayuda a mejorar, por regalarme una amistad tan sincera que es diferente a todas, por permitirme ser parte de algo, por haber dejado en mí algo más que recuerdos y por haberme ayudado a crecer se les quiere mucho la banda.

I. Resumen

En estudios previos realizados en el laboratorio, se describió el efecto hepatoprotector de *Heterotheca inuloides*, mejor conocida como árnica, en un modelo animal. Los resultados obtenidos indican que ambos extractos poseen un efecto protector cuyo mecanismo de acción se debe principalmente a la capacidad de los componentes del árnica para atrapar radicales libres. Para continuar explorando el uso potencial de esta planta o sus metabolitos secundarios en el tratamiento de algunas afecciones en el humano, el presente trabajo plantea el estudio del efecto de los extractos sobre la actividad de los citocromo P450 que participan en la desintoxicación de contaminantes y agentes extraños al organismo. Para ello, se midió la actividad del CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2 y CYP2E1, enzimas que se encargan de la biotransformación de xenobióticos en el hígado de ratas macho tratadas con los extractos acetónico y metanólico.

Los resultados de actividad enzimática muestran que los extractos provocan una inhibición en la actividad de todas las familias de CYP estudiadas con respecto a la actividad encontrada en el hígado de animales de control. La mayor respuesta fue la que se encontró en el CYP1A1 de animales tratados con el extracto acetónico.

Estos resultados fueron corroborados por experimentos en los que se explora la capacidad de enzimas hepáticas para metabolizar un compuesto mutagénico a metabolitos que interaccionan con el ADN produciendo mutaciones en bacterias (prueba de Ames). El hígado de ratas tratadas con el extracto acetónico mostró una capacidad

disminuida para “activar” al benzo(a)pireno y 3-metilcolantreno a metabolitos mutagénicos.

Los datos obtenidos muestran que, aunque los extractos pueden proteger del efecto de radicales libres, la capacidad de desintoxicación de los organismos expuestos a los extractos puede verse afectada.

II. Introducción

Existe una amplísima diversidad estructural de productos naturales como consecuencia de la evolución de los organismos a lo largo de aproximadamente 4 mil millones de años.

Los productos naturales orgánicos son sustancias derivadas del metabolismo secundario de organismos, éstos generalmente participan directamente en los mecanismos de defensa y supervivencia por lo cual, es de suponer que presentan actividad biológica de interés y debido a su diversidad representan una oportunidad de estudio para así desarrollar el conocimiento químico sobre su origen, organización, diversidad estructural, toxicidad, síntesis y propiedades para poder entender un poco más las complejas relaciones químico-biológicas de la naturaleza.

Se estima que a partir de plantas se han logrado aislar y caracterizar más de 110 mil metabolitos pero quedan varios millones de sustancias por descubrir, ya que sólo se ha analizado una ínfima parte de fuentes naturales disponibles (Pietra 2002).

En todas las culturas del mundo existe una tradición en el uso de ciertas fuentes naturales para diversos propósitos como pueden ser su uso medicinal, aromático, cosmético, agronómico o tóxico. Debido a ello, en las últimas décadas se han realizado numerosos estudios en nuestro país con el fin de compilar información de algunas plantas y algunas de estas, se utilizan en la medicina tradicional. Una planta muy utilizada en nuestro país es la *Heterotheca inuloides*.

II.1 *Heterotheca inuloides*

Usos y nombres

Heterotheca inuloides es conocida popularmente con los nombres de: árnica, acahua, acahualli, árnica de campo, árnica de monte, árnica del país, arnika (purépecha), cuateteco, falsa árnica y tlályetl (nahuatl) (Martínez 1984). En la figura 1 se muestra una fotografía de la planta.

Tradicionalmente está catalogada como una medicina excelente para las hemorroides, las rozaduras del bebé, las ronchas y las llagas de cualquier origen. La infusión es provechosa para reumas, dolores de úlceras gastrointestinales, bronquitis e inflamación de vías urinarias. Las flores secas se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de contusiones y moretones, también es buena para el tratamiento posoperatorio de trombos. Se utiliza con mayor frecuencia en forma tópica para aliviar heridas y lesiones de la piel (Almaguer 2001).

Descripción

Heterotheca inuloides pertenece a la familia de las compuestas, es una planta herbácea perenne que puede llegar a medir hasta 1 metro de altura, con tallos erectos de hojas dentadas, alargadas y anchas, cubiertas de vello. Sus flores de color amarillo intenso, se agrupan en forma circular en capítulos que parecen una única flor pero en realidad, constituyen una inflorescencia.



Fig. 1- *Heterotheca inuloides*.

Localización

El árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*) es una planta que crece en las regiones con clima templado – frío del centro de nuestro país; principalmente se le puede encontrar en los estados de:

Chihuahua, Durango, Guerrero (Coyuca de Catalán), Guadalajara, Michoacán (Zitácuaro, Tacuaro, Coalcoman de Vázquez); Hidalgo (Gangueo); Morelia (Ocampo); Oaxaca, Puebla (Cuetzalan, Zacapoaxtla); Estado de México, San Luis Potosí, Aguascalientes, Valle de México, Veracruz y Tlaxcala.

II.1.1 Importancia Farmacológica

Se han reportado diversas propiedades del árnica como son antimicrobiana (Kubo et al. 1994), antiinflamatoria y analgésica (Gené et al. 1998). Se han descrito también propiedades como citotoxicidad en contra de tumores de diferentes líneas celulares, además de propiedades antioxidantes (Kubo et al. 1996; Haraguchi et al. 1997), y presenta la capacidad de inhibir la lipoperoxidación en microsomas de hígado, mitocondria y glóbulos rojos en sistemas *in vitro* (Haraguchi et al.1996).

En el mercado se encuentran en diferentes presentaciones por ejemplo: en forma de tabletas, en presentación homeopática, tinturas, té, pomadas, las cuales son utilizadas para infecciones de la piel, fiebres, golpes y llagas (Rzedowski, de J. Rzedowski y cols., 2001; Villaseñor Ríos y Espinosa García 1998).

II.1.2 Principales Metabolitos

Es importante conocer cuales son los metabolitos que presentan una actividad biológica para poder entender las propiedades terapéuticas de los productos herbolarios de árnica.

Esta planta ha sido estudio de numerosos estudios químicos los que han permitido el aislamiento de varios de sus constituyentes como son sesquiterpenos poliacetilenos, triterpenoides, esteroides (Willuhn and Schneider, 1987), y flavonoides (Willuhn 1983; Jerga 1990)

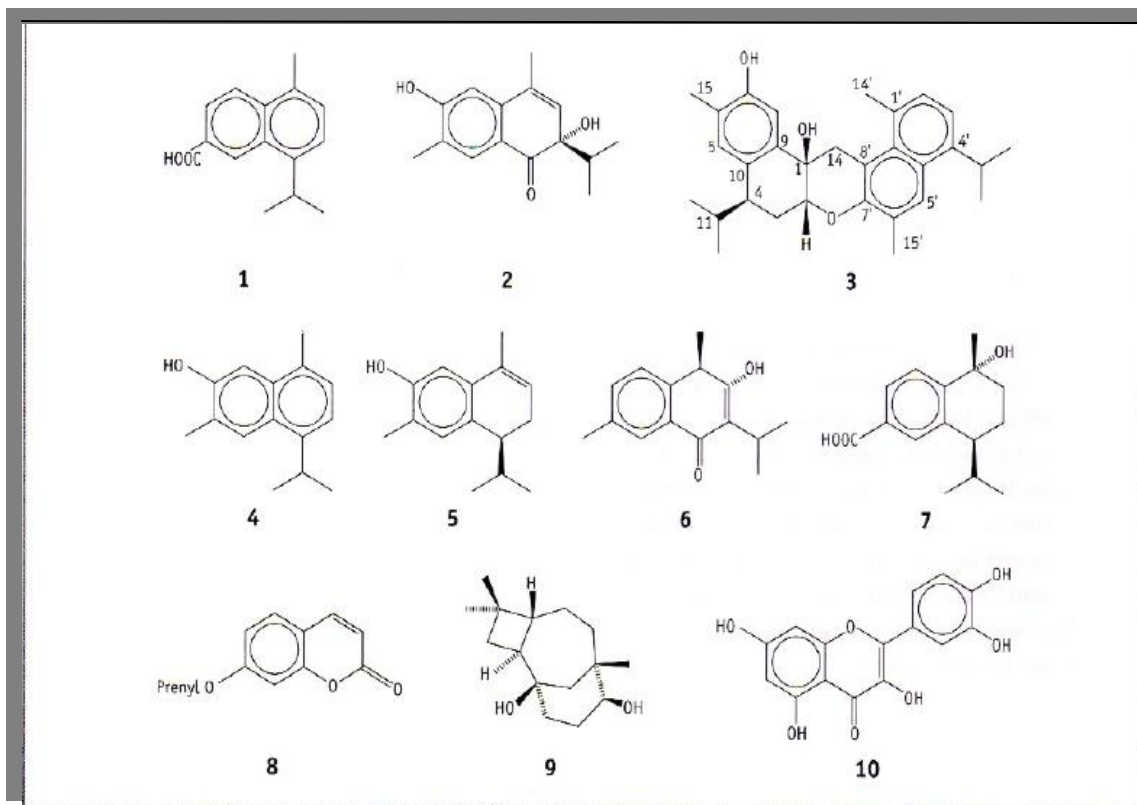


Figura 2. Metabolitos aislados de *Heterotheca inuloides* colectada en Cuetzalan datos obtenidos de Delgado 2001.

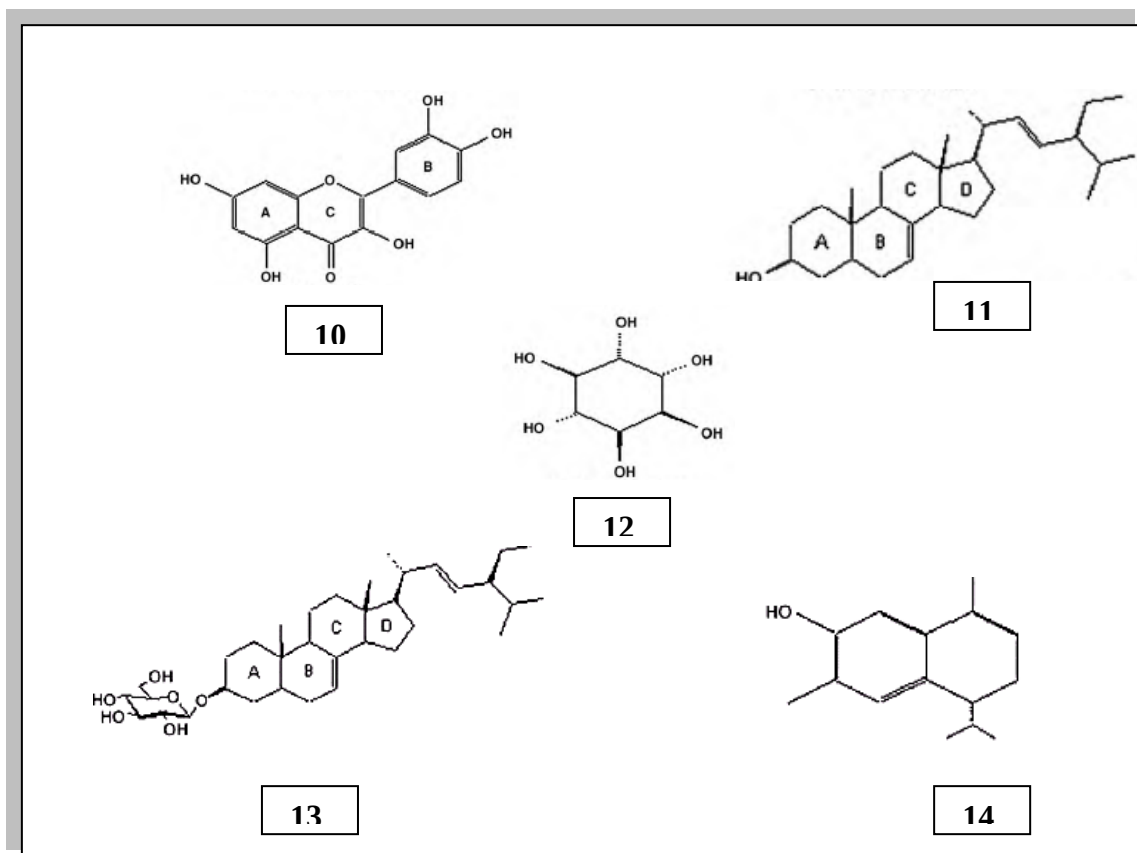


Figura 3. Metabolitos aislados de *Heterotheca inuloides* colectada en Zacapoaxtla datos obtenidos de Delgado 2001.

En la figura 2 se presentan 10 metabolitos secundarios aislados a partir de *Heterotheca inuloides* (colectada en Cuetzalan); las estructuras (1-7) son sesquiterpenos del tipo cadinano, el compuesto (9) es un sesquiterpenoide del tipo cariolano, en tanto que los compuestos 8 y 10 corresponden a una cumarina y un flavonoide respectivamente.

La evaluación de sus propiedades anti-inflamatorias indicó que varios compuestos tienen una actividad significativa especialmente el dicadalenol (estructura 3), el cariolandiol (estructura 9) y la quercetina (estructura 10) lo que demuestra que estos compuestos brindan la actividad biológica anti-inflamatoria de la planta.

Respecto de la figura 3, se presentan los metabolitos secundarios encontrados en el extracto metanólico y acetónico de las partes aéreas de la flor de *Heterotheca inuloides*, (Colectada en Zacapoaxtla Puebla) la quercetina (estructura 10), el espinasterol (estructura 11), el D-quiro-inositol (estructura 12), el espinasteril-3-O- β -D-glicopiranosido (estructura 13) y la 7-hidroxi-3,4 dihidrocadalenol (estructura 14), presenta una mayor actividad y poseen la capacidad de atrapar radicales libres. Es importante mencionar que el D-quiro-inositol y el espinasterol sólo fueron detectados en el extracto metanólico (Coballase- Urrutia 2010), sin embargo, el compuesto que se encontraba en mayores concentraciones fue la quercetina.

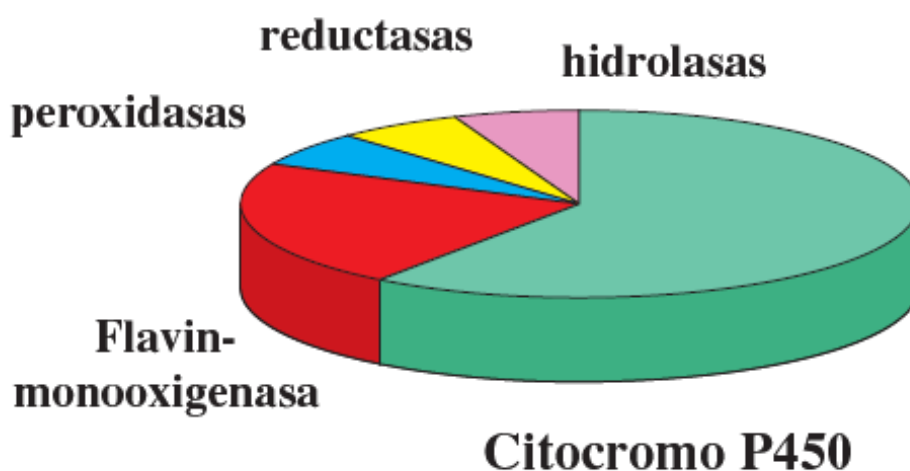
II.2 Citocromo P450

II.2.1 Generalidades

Un gran número de sustancias extrañas a nuestro organismo (xenobióticos) penetran por la piel, sangre o pulmones y pueden ocasionar trastornos inmediatos o a largo plazo, lo que se evita en gran medida por los sistemas enzimáticos que llevan a cabo su biotransformación. Un grupo muy importante de enzimas que participan en el metabolismo de xenobioticos es el citocromo P-450 (CYP-450) una superfamilia de hemoproteínas que actúan como mediadores primarios de las células en el metabolismo oxidativo conocido

como de Fase 1 (figura 4). La superfamilia está compuesta por más de 2000 isoenzimas presentes desde hace millones de años en todo el reino biológico incluyendo organismos tan sencillos como las bacterias hasta aquellos más complejos como son los mamíferos.

Figura 4. Participación relativa de diferentes enzimas de fase 1 en el metabolismo de xenobioticos.



Hoy en día, se tiene el conocimiento de que el sistema de monooxigenasas es un complejo multienzimático cuya oxidasa final es el citocromo P450, este sistema se encuentra presente en diferentes tejidos como el riñón, pulmón, cerebro, piel, intestino, corteza adrenal, testículos y placenta pero es particularmente activo en el hígado localizándose en las mitocondrias y el retículo endoplásmico de los hepatocitos.

La denominación de P-450 se debe a que absorben la luz ultravioleta en presencia del monóxido de carbono en una longitud de onda de 450 nm. La mayoría de los CYP están formados por 400 – 500 aminoácidos (50-60 kD) de los cuales cerca del 55% son de naturaleza apolar. La similitud en la secuencia de aminoácidos entre los diferentes CYPs puede ser muy baja (<20%), a pesar de ello se sabe que existe una elevada conservación en su estructura tridimensional la cual se compone principalmente por una combinación de regiones α -hélice y hojas β en la región que rodea el grupo hemo, el ligando axial para el hierro es un residuo de cisteína ubicado cerca del extremo carboxi-terminal de la proteína. Una característica de todas las isoformas de

CYP450 es que su grupo prostético (figura 5) es una protoporfirina IX que se encuentra unida a la proteína por unión no covalente entre el átomo de hierro y una cisteína, muchos agentes reaccionan con los grupos sulfidrilo o rompen las interacciones hidrofóbicas y convierten al CYP en una forma inactiva llamada P-420 (Figura 6).

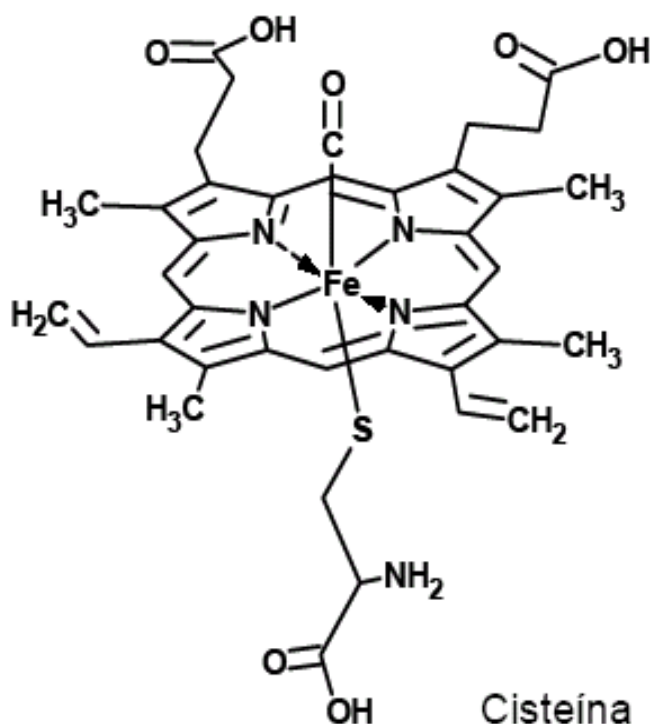


Figura 5. Estructura del complejo formado por la unión del CO, al hierro del grupo hemo del CYP, el cual proporciona la señal característica observada a 450nm llamada Pico de Soret.

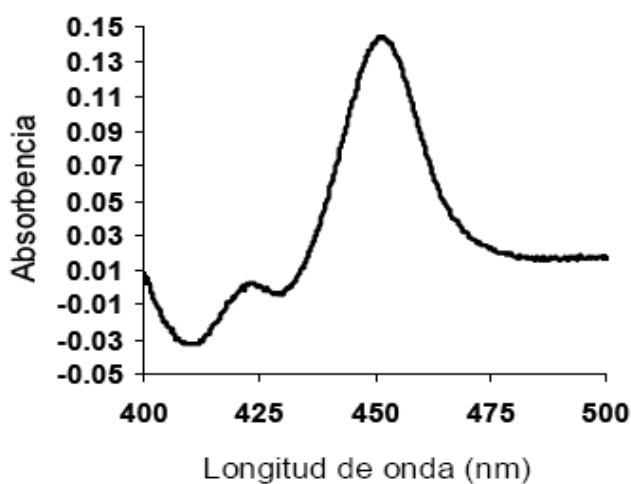


Figura 6. Espectro similar al obtenido por T. Omura y R. Sato (1964), en el que se observa un pico máximo de absorción a 450nm. En microsomas hepáticos de rata reducido con diotinita de sodio y burbujeado con CO. El pico observado a 420nm corresponde a CYP desnaturizado llamados CYP420.

Su nomenclatura las agrupa en familias y subfamilias de acuerdo al grado de similitud en la secuencia de aminoácidos. Las enzimas de una misma familia son homólogas en un 40% - 55% de la secuencia y las enzimas de la misma subfamilia en más del 55%. El primer número arábigo designa a la familia, la subfamilia se designa por una letra del alfabeto y el último número arábigo designa el gen que codifica una enzima específica.

II.2.2 Clasificación General

Esteroidogénicas

Son las encargadas de sintetizar esteroides para mantener la integridad de la membrana de los organismos unicelulares, o para que actúen como mediadores hormonales del desarrollo en organismos diferenciados.

Poseen especificidad de producto y están situadas en las mitocondrias principalmente; como ejemplo de este grupo se encuentran las familias 5, 7, 11, 17, 19, 21 y 27.

Xenobióticas

Evolucionaron de las esteroideogénicas y se encargan principalmente de metabolizar sustancias biológicas exógenas permitiendo su eliminación, se localizan principalmente en el retículo endoplásmico. A este grupo pertenecen las familias 1, 2, 3 y 4.

De acuerdo a sus funciones, se puede explicar que las esteroideogénicas convierten las sustancias que consumimos en constituyentes necesarios para mantener la integridad de la membrana celular y pared celular, es decir, se encargan de la producción de esteroides, ácidos biliares, colesterol, y prostaglandinas y, por lo tanto, su déficit es incompatible con la vida.

Mientras que las xenobióticas desintoxican las sustancias consumidas, como las toxinas, carcinógenos, fármacos y mutágenos, el déficit de estas enzimas no es incompatible con la vida ya que la mayoría de los xenobióticos que

ingresan son metabolizadas por una o más enzimas CYP-450 xenobióticas. Además de que los organismos pueden almacenar xenobióticos en concentraciones elevadas.

Clasificación en función de cómo acceden los electrones hasta el centro catalítico Clases I - IV

Clase I.- Las proteínas de esta clase utilizan una reductasa que contiene FAD (flavina adenina dinucleótido) como cofactor y una ferrosulfoproteína. En los organismos eucariontes los CYPs de clase I se encuentran asociados a la membrana interna de mitocondria, y entre sus funciones está la biosíntesis de hormonas esteroideas y vitamina D₃.

Clase II.- Los CYPs de esta clase utilizan una cadena de transporte de electrones y también utilizan una reductasa del citocromo que contiene FAD o FMN (flavina mononucleótido) como cofactor para la transferencia de electrones. Son los más abundantes en eucariontes y participan en las síntesis de moléculas señalizadoras, hormonas esteroideas y ácido retinoico.

Clase III.- Las proteínas de esta clase no necesitan un donador de electrones ya que son autosuficientes. Participan en la síntesis de prostaglandinas en mamíferos.

Clase IV.- En esta clase se encuentran los CYPs que reciben los electrones directamente del NADPH y sólo se han identificado en hongos.

II.2.3 Metabolismo Hepático de los Xenobióticos

La biotransformación de los xenobióticos es una función adquirida por los organismos superiores para hacer posible la eliminación de moléculas lipofílicas, evitando así su acumulación excesiva en distintos tejidos y su posible toxicidad.

El hígado es el órgano más activo en el metabolismo de moléculas tanto exógenas como endógenas (Donato M.T et al. 1992). El proceso de biotransformación consiste en la modificación química de las moléculas, mediante un conjunto de reacciones redox catalizadas por el sistema CYP. Estas reacciones están destinadas a aumentar la solubilidad de xenobióticos y a facilitar su conjugación con moléculas endógenas (Fig 7).

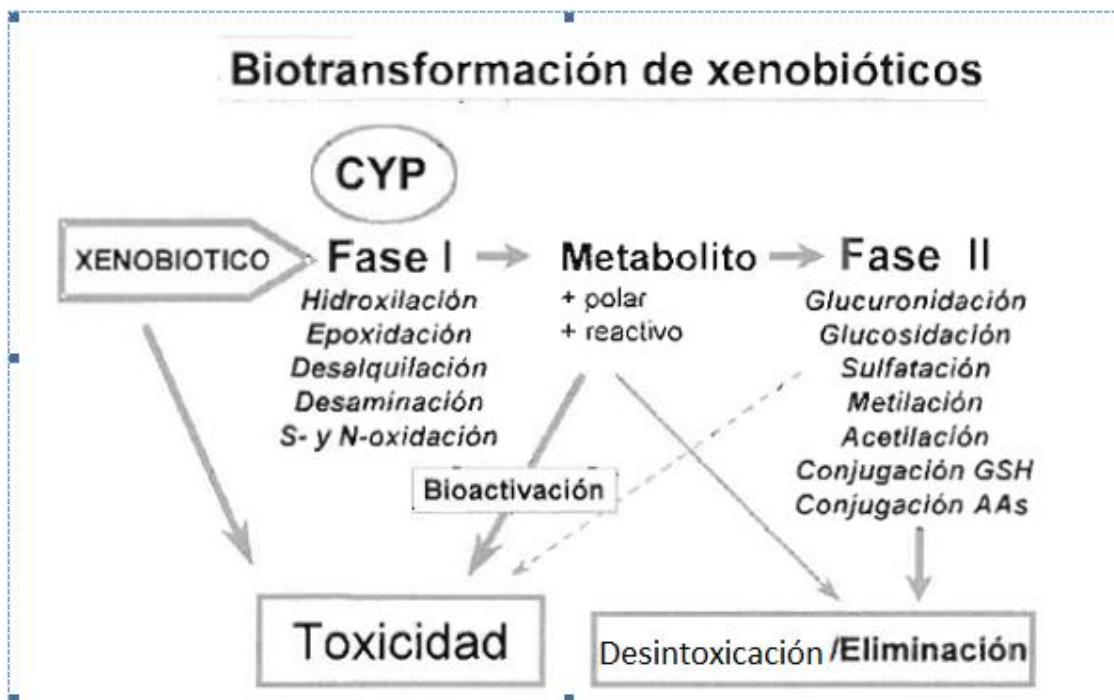


Fig. 7 Reacciones de biotransformación de xenobióticos

II.2.4 Ciclo catalítico del citocromo P-450

Las reacciones de oxidoreducción de compuestos exógenos mediadas por enzimas de citocromo CYP se llevan a cabo a través de un proceso sumamente complejo, siendo las familias 1, 2 y 3 principalmente las encargadas de la biotransformación de todos los xenobióticos. Debido a esto una de sus principales características es que presenta una baja especificidad, lo que permite que presenten la capacidad de metabolizar, un número casi ilimitado de sustratos, principalmente a través de reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis.

Las reacciones de oxidación catalizadas por el CYP son reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH (Fig. 8) tales como hidroxilaciones

aromáticas, alifáticas, desalquilación y epoxidación (Lewis 2001), para las que se utiliza oxígeno molecular (O_2). Estas enzimas incorporan uno de los átomos de oxígeno a un sustrato y el otro lo reducen a agua (H_2O). Este proceso incluye probablemente 9 pasos independientes y una serie de pasos intermediarios (Fig. 9).

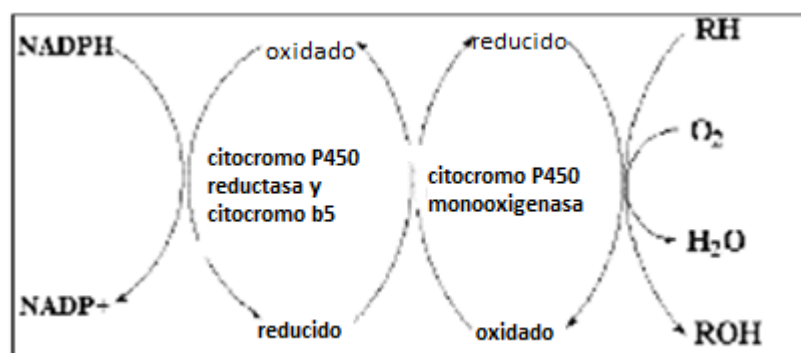


Figura 8. Esquema sintetizado del ciclo catalítico, el NADPH es el donador de e^- que llegan al citocromo P-450 reductasa desde el citocromo b5.

El ciclo catalítico se puede resumir en los siguientes pasos:

- 1.- El primer paso consiste en la unión del sustrato al centro catalítico de la enzima es decir al átomo de hierro hexacoordinado, lo que produce como consecuencia cambios en el estado de *spin* y en el potencial redox.
- 2.- La interacción también produce cambios conformacionales en el CYP lo que favorece su acoplamiento con la enzima CYP reductasa, por ello se produce la reducción del complejo [hemoproteína-sustrato] al estado ferroso (el grupo Fe^{3+} férrico del grupo hemo pasa a Fe^{2+} ferroso) gracias al aumento del potencial redox (aproximadamente 100 mV) generado en el paso anterior (Wang et al. 2006).
- 3.- El oxígeno molecular se une al hemo ferroso para formar un complejo superóxido.
- 4.- La entrada de un segundo electrón produce la formación de una especie activa de oxígeno generalmente el complejo hidroperóxido.
- 5.- A partir de este paso el mecanismo no se conoce con certeza, sin embargo apunta a que se realiza una protonación del dioxígeno ($O=O$) y el rompimiento de uniones $O-O$ produce una especie reactiva de oxígeno que puede ser una mezcla de compuestos hierro-oxo o hierro-peroxo el resultado final sería la liberación de uno de los átomos de oxígeno en forma de una molécula de agua.

6.- Finalmente el átomo de oxígeno del complejo hierro – oxo es transferido al sustrato para formar un producto oxidado con lo que el ciclo se completa.

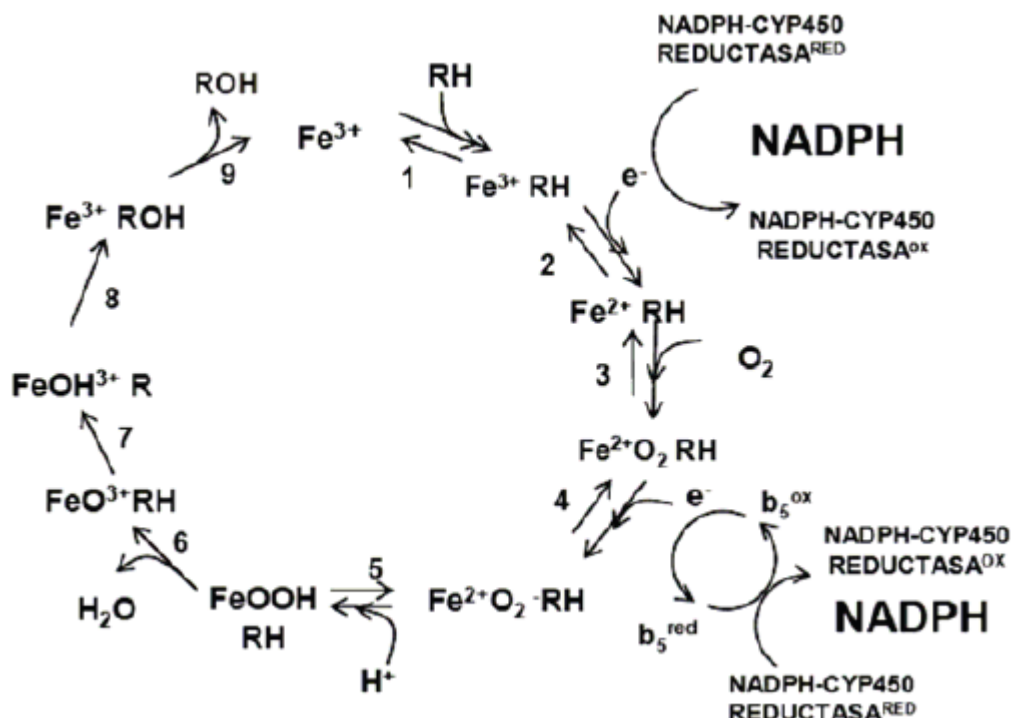


Fig. 9 Ciclo catalítico del CYP450, el mismo solo se ha confirmado con cristalografía y rayos X hasta el paso 5 por lo que se considera como un modelo cuyas condiciones limitantes son la entrada de oxígeno y el suministro de electrones (Guengerich 2000; Munro A. et al 2007).

II.2.5 Importancia de las familias 1, 2 y 3 en el Humano.

Familia CYP1

En esta familia se incluyen las subfamilias CYP1A y CYP1B constituidas por tres isoenzimas donde se incluyen CYP1A1, CYP1A2 y el CYP1B1.

Las tres isoenzimas de la familia 1 comparten una serie de características, en todas ellas el control transcripcional de la expresión de la enzima tiene lugar a través de la vía del receptor nuclear *Ahr* (*Aryl hidrocarbon receptor*) y los tres participan en la formación de procesos de activación de procarcinógenos.

La enzima CYP1A1 activa el benzo(a)pireno generando metabolitos intermediarios que pueden unirse al DNA y originar mutaciones y el CYP1A2 participa fundamentalmente en la activación de nitrosaminas.

El CYP1A1 es una enzima extrahepática su expresión constitutiva en hígado es muy baja, pero es muy inducible por ligandos del receptor *Ahr* (Kamataki et al., 1983) por lo que la exposición a estos compuestos aumenta en forma significativa sus niveles en tejidos como pulmón, placenta, o glándula mamaria.

El CYP1A2 parece estar restringido al hígado, donde constituye aproximadamente el 10% del contenido total de CYP y también es inducible por hidrocarburos aromáticos, fármacos y compuestos de naturaleza indólica. Entre los sustratos del CYP1A2 no sólo se encuentran procarcinógenicos, sino también moléculas con actividad farmacológica como paracetamol, cafeína, teofilina, olanzapina o propanodol (Guengerich *et al.* 1991, Johnson *et al.* 1980).

El CYP1B1 se expresa en forma constitutiva en el riñón, próstata, glándula mamaria y ovario pero no en hígado, participa en el metabolismo de estrógenos y de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Y se presume puede tener un papel como modulador de procesos de diferenciación.

Familia CYP2

Se trata de la familia constituida por el mayor número de miembros los cuales se organizan en más de 20 subfamilias. A diferencia de la familia CYP1 sus miembros no comparten vías comunes de regulación de la expresión y por tanto, la naturaleza química de los sustratos de estas enzimas es muy heterogénea.

Tres miembros de la subfamilia CYP2A han sido identificados en el hombre pero el de mayor relevancia es el CYP2A6 que se expresa en hígado y puede ser inducido por fármacos antiepilépticos. También ha demostrado tener

participación para activar procarcinógenos principalmente relacionados al consumo del tabaco.

La subfamilia 2B se forma por 8 miembros inducibles por fenobarbital, la isoforma que más se expresa en humanos es la 2B6 equivalente a la 2B1 de rata entre las cuales existe una similitud del 78%. (Miles 1988) Los compuestos de baja lipofilicidad y vida media corta en plasma son catalogados como pobres inductores CYPs 2B1/2 también lo inducen algunos fármacos como barbitúricos, succinimidas, benzodiacepinas y pesticidas como el DDT. Entre el CYP2B1 y CYP2B2 existe una homología del 97% pese a esto, su regulación y expresión son diferentes.

La subfamilia CYP2C incluye 4 genes de los cuales los de mayor importancia son el CYP2C9 y el CYP2C19. El primero se encuentra en hígado y cuyos sustratos son compuestos débilmente lipofílicos y se comportan como ácidos débiles, además es el encargado del metabolismo de algunos fármacos como antiinflamatorios e hipoglucemiantes. El segundo es el CYP2C19 que también se expresa en hígado y se caracteriza por presentar polimorfismos genéticos cuya expresión fenotípica conduce a la aparición de individuos considerados “metabolizadores lentos” la incidencia de este polimorfismo alcanza hasta un 20% en poblaciones japonesas por lo que se debe de tener especial cuidado en el metabolismo de fármacos como warfarina y omeprazol.

Dentro de la Subfamilia CYP2D el único identificado en el humano es el CYP2D6 el cual se expresa en hígado y no es inducible. Se conocen 3 fenotipos de esta enzima y los individuos que los presentan se comportan como metabolizadores lentos (alelos deficientes), metabolizadores rápidos (forma nativa o variantes alelicas sin consecuencias funcionales) y metabolizadores ultrarrápidos (múltiples copias de gen) lo cual afecta a diversos fármacos que actúan como antiarrítmicos, antidepresivos y neurolépticos. Sus sustratos son en general moléculas ligeramente hidrófilas con al menos un átomo de nitrógeno de carácter básico.

El CYP2E1 participa en el metabolismo de acetaminofen, cloroxazona, y algunos antisépticos fluorados. Su participación en el metabolismo se refleja en la formación de reactivos intermediarios y radicales libres como el superóxido y peróxido de hidrógeno.

Se expresa constitutivamente en una mayor concentración en hígado y su expresión se encuentra fuertemente influenciada por factores nutricionales (YOO J. S et al., 1991). Esta isoenzima presenta una homología del 75% y 78% con relación a la secuencia de aminoácidos y nucleótidos entre rata y humano.

Familia CYP3

Esta familia está presente en el humano como una subfamilia con cuatro genes: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43. Son enzimas con características funcionales muy similares debido a su alta homología en la secuencia de aminoácidos y constituyen el grupo de mayor importancia en el metabolismo de agentes terapéuticos.

El CYP3A4 es el más importante y abundante en el hígado de humano se expresa también en mucosa intestinal, su importancia radica en que un gran número de moléculas de interés clínico son sustratos del mismo, incluyendo agentes terapéuticos de gran relevancia como la eritromicina, midazolam, ciclosporina y lidocaina (Bertz. R.J. & Granneman, G.R. (1997), Finch, C.K., Chrisman, C.R., Baciewicz, A.M., & Self, T.H. (2002)).

III. Planteamiento del Problema

Recientemente se han reportado las propiedades biológicas de los extractos (metanólico y acetónico) del árnica los cuales demostraron tener una capacidad elevada para atrapar radicales libres y que incluso, generan un efecto hepatoprotector en el modelo animal (Coballase- Urrutia 2010). Sin embargo, algunos aspectos claves en el desarrollo de todo nuevo fármaco o mezcla compleja de origen natural usada con fines terapéuticos, son el conocimiento de su metabolismo y su eliminación, para evitar una eventual toxicidad, por lo que estos factores son importantes para la determinación de su eficacia. Con el objeto de contribuir a la evaluación de la posible toxicidad de

los extractos de árnica y de la quercetina, compuesto presente en *H. inuloides*, se propuso estudiar de manera particular si ambos extractos y el flavonoide generan un cambio en la actividad de algunos CYP que por su importancia, constituyen la primera línea de enzimas del metabolismo de compuestos exógenos.

Para ello, se midió la actividad de CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2B1, CYP 2B2 y CYP 2E1 en homogenizados de hígados de ratas tratadas previamente con cada uno de los extractos y sus testigos (hígado de ratas tratadas con aceite de oliva y amortiguador de fosfatos). Adicionalmente, con objeto de investigar la importancia biológica de la modulación de estas enzimas por los extractos, se evaluó la capacidad de los homogenizados hepáticos para “activar” mutágenos utilizando un ensayo bacteriano conocido como prueba de Ames.

IV. Hipótesis

Los extractos de *Heterotheca inuloides* y la quercetina participan en la modulación de la actividad hepática de algunas isoformas de CYP450 relevantes para el metabolismo de agentes tóxicos estudiados CYPs 1A1/2, CYPs 2B1/2 y CYP2E1.

V. Objetivo General

Determinar la actividad de CYPs presentes en el hígado de ratas Wistar machos tratados con los extractos metanólico, acetónico y quercetina de *Heterotheca inuloides*.

Objetivos Particulares

- a) Determinar si la exposición de ratas a los extractos acetónico, metanólico o a la quercetina afectan la actividad hepática de los citocromos P-450 1A1, 1A2, 2B1, 2B2 y 2E1.
- b) Explorar la capacidad de los homogenizados de hígado para “activar” mutágenos en la prueba de Ames y determinar su efecto biológico.

VI. Diseño Experimental

Se obtuvo la fracción microsomal de los hígados de 27 ratas machos (180-220 gramos de peso) de la cepa Wistar que fueron divididos en nueve grupos con tres ratas cada uno, se mantuvieron en cajas de acrílico en condiciones constantes de temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), aire filtrado e iluminación, y se les proporcionó una dieta comercial estándar y agua filtrada.

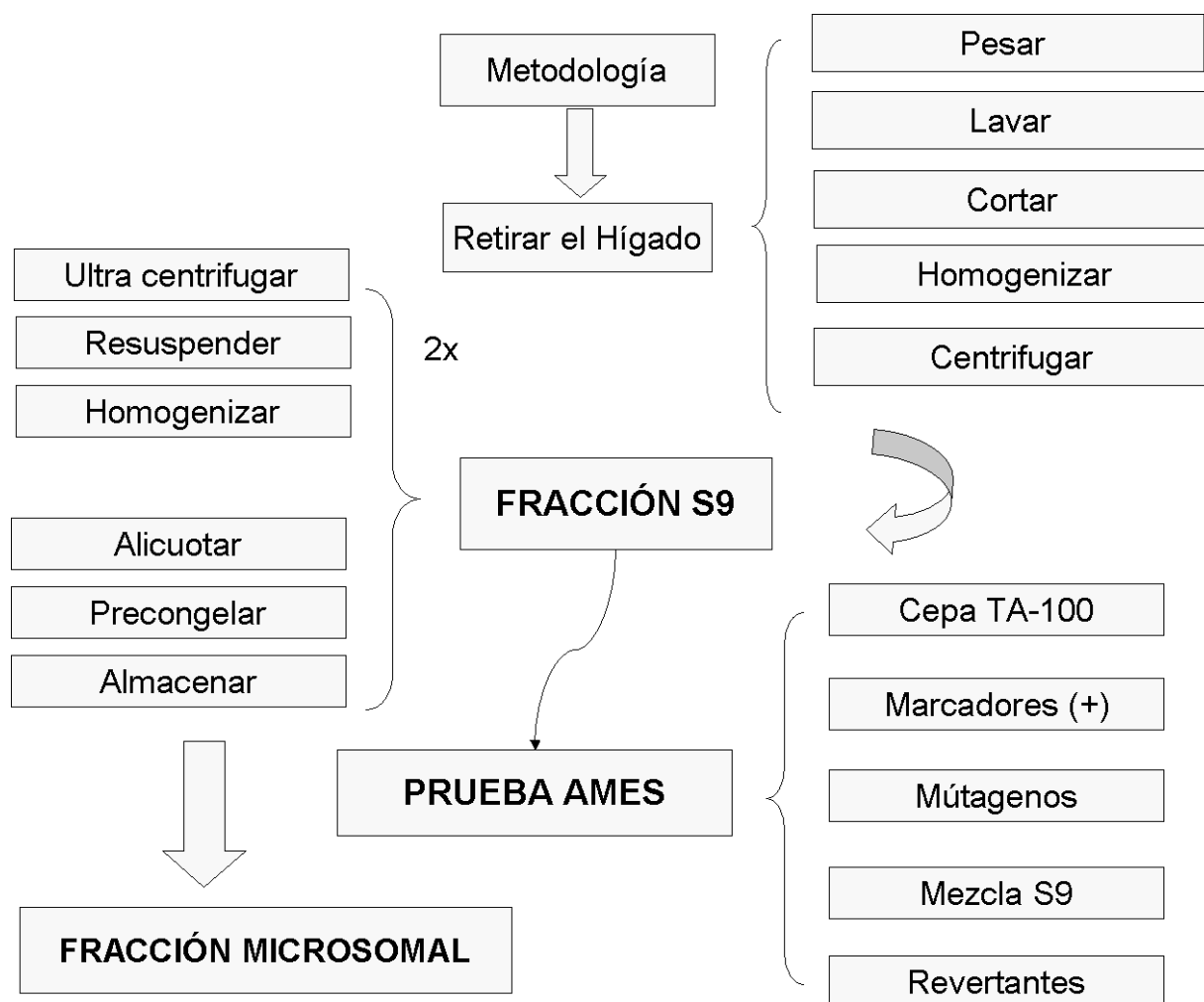
La duración de los tratamientos fue de seis días administrándose por vía oral el vehículo (0.1mL/Kg), el extracto metanólico o acetónico (100mg/Kg), o la quercetina (100mg/Kg) cada 24 horas. Los últimos tres días se administró CCl_4 (0.5mg/Kg) vía intraperitoneal a aquellos grupos que lo requirieron. Los animales fueron tratados de acuerdo a los siguientes grupos:

1. Aceite de Oliva (Control 1: vehículo utilizado para administrar Extracto Acetónico)
2. Extracto Acetónico
3. Extracto Acetónico + Tetracloruro CCl_4
4. Tetracloruro CCl_4
5. Amortiguador de Fosfatos (Control 2: vehículo utilizado para administrar el extracto metanólico)
6. Extracto Metanólico
7. Quercetina
8. Extracto Metanólico + Tetracloruro CCl_4
9. Quercetina + Tetracloruro CCl_4

La obtención de la fracción S-9 y de la fracción microsomal de los hígados de ratas está basado en el procedimiento descrito por Garner *et al.* (1972).

VII. Metodologías

VII. 1 Diagrama de Flujo



Se siguen los pasos mostrados en el diagrama y se realizan como se muestra en la metodología.

VII. 2 Preparación y Obtención de la Fracción S9

Material:

- Material quirúrgico estéril (tijeras, pinzas, bisturí)
- Plancha quirúrgica
- Frascos de vidrio de 100mL estériles.
- Alcohol etílico al 70%
- Mechero
- Balanza digital Ohaus Scot-Pro
- Motor para homogenizado Potter-Elvehjem
- Homogenizador mecánico con pistilo de teflón

- Homogenizador Politron de 50 mL
- Solución de KCl 0.15M estéril (1L)
- Rotor de centrifuga SS-34 o Sorval RC2-B
- 12 vasos de precipitados de 250mL
- 12 tubos eppendorf
- 12 tubos de centrifuga
- Pipetas de 10mL
- Propipetas

Toda la metodología se debe de realizar bajo condiciones de esterilidad y manteniendo la temperatura en un intervalo de 0 - 4 °C.

Metodología

Las ratas fueron sacrificadas 48 horas después de la última administración de los agentes de prueba por dislocación cervical, se retiró el hígado utilizando material estéril y se humedeció con unas gotas de una solución de KCl 0.15 M, después se pesó (el peso de los hígados húmedos en promedio es de 10 a 15 gramos) y transfirió a un vaso de precipitados que tiene 3mL de solución de KCl x gramo de hígado y se lavó con la misma solución de KCl 0.15 M.

Utilizando unas tijeras se cortó el tejido en pedazos muy pequeños y se homogenizó en 2 partes para facilitar este proceso y garantizar que la temperatura del homogenizado no fuera mayor a 4°C. El homogenizado se centrífugo a 10000 rpm y el sobrenadante (fracción S9) se distribuyó a razón de 2 mL en tubos eppendorff. Las alícuotas se congelaron en hielo seco, y se almacenaron en un ultracongelador a -80°C.

VII. 3 Preparación y obtención de la Fracción microsomal

- Amortiguador de fosfatos 0.1M pH (7.4) 0.25M de sacarosa 4°C (1L)
- Amortiguador de fosfatos 0.1M pH(7.4) 1mM EDTA, 20% glicerol (500mL) (Amortiguador 2)

- Rotor Beckman Ti80
- Motor para homogenizado Potter-Elvehjem
- Homogenizador mecánico con pistilo de teflón
- Homogenizador Politrón de 20 mL
- Hielo seco

Se descongeló la fracción S9 y se ultracentrifugó durante 60 min. a 32,500 rpm. a 4°C , desechándose el sobrenadante, al botón se le agregó amortiguador 1 para resuspender y se homogenizó utilizando el tubo y pistilo para 20mL.

Para finalizar se volvió a ultracentrifugar bajo las mismas condiciones, el sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en amortiguador 2 y se homogenizó nuevamente. Esta es la fracción microsomal de la cual se hacen alícuotas en tubos eppendorff y se almacena a –80°C.

VII. 4 Cuantificación de Proteína por el Método de Bradford

La concentración de proteínas microsomales y de las proteínas de la fracción S-9 se determinó mediante el Bio Rad Protein Assay de acuerdo con el método de Bradford (1976).

Este procedimiento permite determinar la concentración de proteínas a partir del cambio de color correspondiente a varias concentraciones de una curva de control de proteína (BSA en el intervalo 0.2 - 0.9µg/mL).

La absorbancia máxima de la solución ácida de commassie azul brillante ocurre entre 455-595 nm.

VII. 5 Determinación de la actividad enzimática de familias CYP 1A, 2B y 2E

Los ensayos de actividad enzimática de los CYPs, involucran principalmente la cuantificación del metabolito resultante de la reacción entre los CYPs con derivados alquilados de resorufina. El CYP 2E1 se determina mediante una reacción de hidroxilación utilizando como sustrato el 4-nitrofenol (tabla1).

Tabla 1. CYPs involucrados en la oxidación de sustratos modelo.

Enzima P450*	Sustrato	Reacción	Metabolito producido	Actividad
CYP1A1	Etoxi- resorufina	Desalquilación	Resorufina	etoxiresorufin-O- deetilasa
CYP1A2	Metoxi- resorufina		Resorufina	metoxiresorufin- O-demetilasa
CYP2B1	Pentoxi- resorufina		Resorufina	pentoxiresorufin- O-depentilasa
CYP2B2	Benziloxi- resorufina		Resorufina	benziloxiresorufin- O-debenzilasa
CYP2E1	4-nitrofenol	Hidroxilación	4-nitrocatecol	nitrofenol- hidroxilasa

*Enzima P450 de mayor contribución en la reacción.

La metodología para la determinación de la actividad enzimática de los CYP450 CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2B1, CYP 2B2, en microsomas hepáticos de rata involucra la reacción de desalquilación de los derivados de la resorufina.

Para medir la actividad de los citocromos CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, se realizó una reacción de desalquilación y se cuantificó el metabolito resultante, la resorufina, en el fluorómetro VersaFluor; el ejemplo de esta reacción para el CYP 1A1 es:

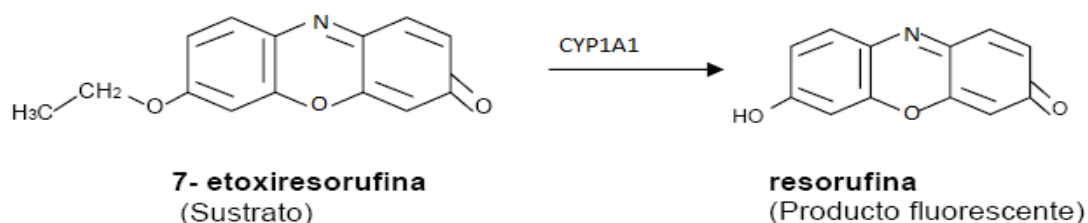


Fig. 10 Reacción catalizada por CYP1A1, donde la etoxiresorufina se utiliza como sustrato para su desalquilación y formación de resorufina el metabolito que se mide por su fluorescencia.

Para medir las actividades de los diferentes citocromos se aprovecha su capacidad de metabolizar diversos sustratos, es decir aprovechando que la resorufina puede funcionalizarse y producir varias alcoxi-resorufinas que son sustratos con una mayor afinidad a los citocromos de estudio. Es así que se puede elaborar un ensayo donde cada una de las isoenzimas (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2B1, CYP 2B2) tiene una alta afinidad a determinado sustrato y dado que el producto de las reacciones es la resorufina se puede establecer una técnica experimental semejante (Tabla 2).

CYP	Método	Sustrato	Producto
1A1	Fluorométrico	Etoxirresorufina	Resorufina
1A2		Metoxirresorufina	
2B1		Pentoxirresorufina	
2B2		Benziloxirresorufina	

Tabla 2.- Afinidad de diversos citocromos a los compuestos alquilados de la resorufina.

Material

- Amortiguador de actividad (amortiguador Tris- base 50mM-MgCl₂ (hexahidratado) 25mM pH 7.6
- Resorufina
- DMSO
- Etoxirresorufina
- Metoxirresorufina
- Pentoxirresorufina
- Benziloxirresorufina
- Agua Deionizada
- Hielo
- Bloques de thermoblock
- Gradillas para tubos de ensayo y para tubos eppendorf
- Micropipetas de 2, 20, 200 y 1000 μ L
- Vasos de Precipitados
- Incubadora
- Termómetro

- Timer
- Fluorómetro Versa Fluor™ Biorad.

Metodología

Se preparó una curva de calibración con resorufina utilizando las siguientes concentraciones 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 pmol/mL. (Anexo).

La reacción se llevó a cabo en una celda para fluorómetro en la cual se mezcló: el amortiguador Tris-base 50mM y $MgCl_2$ 25mM (950-970 μL) a pH 7.6, el sustrato disuelto en DMSO (20 μL de etoxiresorufina 50 μM , 10 μL de metoxiresorufina 0.5mM, 10 μL de pentoxiresorufina 1mM o 20 μL de benziloxiresorufina 1mM) y 10 μL de NADPH 50 mM disuelto en amortiguador. Todo esto se incubó a 37°C durante 3 minutos. Una vez terminado este tiempo, se agregó el volumen equivalente a 200 μg de proteína microsomal hepática.

La cinética de aparición de la resorufina se evaluó cada 15 segundos durante tres minutos en fluorómetro VersaFluor™ de Bio Rad. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 530nm y la de emisión de 590nm.

Protocolo para evaluar la actividad de CYP2E1 en microsomas hepáticos de rata por hidroxilación del 4-nitrofenol (Método Colorimétrico).

Para medir la actividad del CYP 2E1, se realizó una reacción de hidroxilación del 4-nitrofenol (Koop 1986), el ensayo está basado en la capacidad del CYP 2E1 para metabolizar al 4-nitrofenol en 4-nitrocatecol (figura 9), la formación del metabolito se monitorea por ensayo colorimétrico utilizando un espectrofotómetro modelo CamSpec -M350 y con este equipo se evalúa la actividad de esta enzima.

Reacción

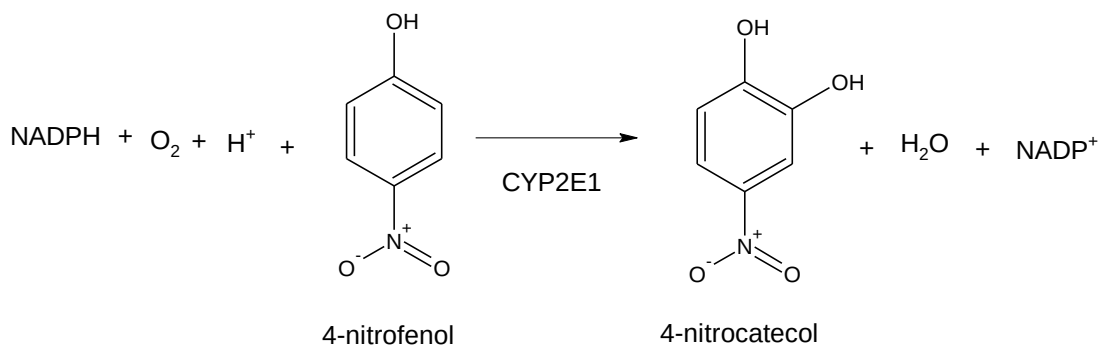


Fig. 11- Reacción de hidroxilación del 4-nitrofenol a 4-nitrocatecol catalizada por el CYP 2E1

Material

- Amortiguador de ensayo: Fosfatos 0.1M pH=7.2
- Solución stock de sustrato: 4-nitrofenol 2mM disuelto en amortiguador de ensayo.
- Estándar del metabolito: 4-nitrocatecol 2mM disuelto en amortiguador de ensayo.
- Cofactor: NADPH 50mM disuelto en amortiguador de ensayo.
- Enzimas: Microsomas hepáticos de rata disueltos a una concentración final de 0.5mg/mL (mantener en hielo)
- Ácido Perclórico 1.5 M
- NaOH 10M
- Tubos eppendorf de 3mL y 2mL, micropipetas de 20, 200 y 1000 μ L con sus puntas.
- Vortex
- Centrifuga
- Espectrofotómetro.

Procedimiento

Reacción y preparación de la muestra

<i>Condición</i>	<i>Cantidad</i>
<i>[Proteína]</i>	<i>0.2 (mg/mL)</i>
<i>[4-nitrofenol]</i>	<i>0.1 mM</i>
<i>[NADPH]</i>	<i>50 mM</i>
<i>Vol. Final (fosfatos 0.1M pH=7.2, 1mM ac. ascórbico)</i>	<i>1mL</i>
<i>Tiempo de reacción</i>	<i>10 min</i>

Tabla 3. Cantidades de cada reactivo involucrado en la actividad de CYP2E1

En un tubo de eppendorf de 3mL se colocó la mezcla de reacción que contenía 50µL de microsomas y 930 µL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M y 50µL del stock de 4-nitrofenol a pH 7.4. La mezcla de reacción se incubó en los thermoblock a 37°C durante 5min y se inició con la adición de 20µL del stock de NADPH, la adición se hizo a cada una de las muestras y en intervalos de 1min, la reacción se deja durante 10min en baño María y protegidos de la luz. Se preparó un tubo que contenía 4-nitrofenol 0.1mM (conc. Final) pero que no contenía proteína (blanco) y que también fue incubado. Pasados los 10 min. de incubación, la reacción se detuvo agregando 200µL de HClO₄ 1.5M; las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 5min. Se tomó 1mL de sobrenadante, al cual se añadió 100µL de NaOH 10M y se homogenizó, después se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 510nm.

VII. 6 Prueba de Ames

Es un método desarrollado por el Dr. Bruce N Ames para determinar la frecuencia de mutaciones inducidas en *Salmonella typhimurium*.

Las bacterias mutantes (auxótrofas his⁻), a diferencia de las silvestres (prototrofas his⁺) requieren histidina-biotina para crecer y la base de la prueba consiste en “revertir” el fenotipo mediante la inducción de una mutación en el operón de la histidina, lo que confiere a las “revertantes” la capacidad de crecer en medios carentes del aminoácido o con cantidades limitantes.

Material

- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.4
- Glucosa-6 fosfato, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP)
- Fracción S9 de hígado de rata obtenida de los animales tratados con aceite de oliva, amortiguador de fosfatos, extracto metanólico y extracto acetónico)

- La cepa de *Salmonella typhimurium* que se usó para esta prueba de mutagenicidad fue la TA-100 (fue donada por el Dr. B.N. Ames de la Universidad de California Berkeley, C.A, USA)
- Benzo[a]pireno
- 3-Metilcolantreno

Metodología

A un tubo estéril con 2 ml de agar de superficie (48° C) se agregó en el siguiente orden: 0.1 ml de cultivo de la cepa TA100 de 16 horas de incubación a 37°C y agitación (125 RPM), 5 µg de benzo(a)pireno disuelto DMSO, 0.5 ml de las mezclas S9 (obtenida de animales que recibieron los diferentes tratamientos). La mezcla se agitó y se vació en cajas Petri con medio de agar de superficie de Vogel-Bonner. La incubación de las cajas se realizó a 37° C por 48 hr. Se contó manualmente el número de colonias revertantes en cada caja. Para los experimentos con 3-metilcolantreno se siguió el mismo esquema, y se utilizó como mutágeno el 3-metilcolantreno 10µg/caja (disuelto en DMSO) con la única diferencia que esta vez se estandarizó la proteína contenida en cada una de las fracciones S-9.

VII.7 Análisis Estadístico

Para comparar los datos entre grupos y entre los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis de comparación Tukey utilizándose el programa SPSS inc.

VIII. Resultados

Tabla 4. Concentración de proteína en microsomas hepáticos.

<i>Tratamiento Administrado</i>	<i>Número de tratamiento</i>	<i>promedio (mg/ml)</i>	<i>Volumen de proteína</i>	<i>Volumen de Amortiguador</i>
<i>Aceite de Oliva</i>	1	15,63	63,97	36,02
<i>Extracto Acetónico</i>	2	15,50	64,51	35,48
<i>Extracto Acetónico + CCl₄</i>	3	10,65	93,84	6,15
<i>CCl₄</i>	4	11,84	84,41	15,58
<i>Amortiguador de Fosfatos</i>	5	17,40	57,45	42,54
<i>Extracto Metanólico</i>	6	17,46	57,24	42,75
<i>Quercetina</i>	7	14,66	68,19	31,80
<i>Extracto Metanólico + CCl₄</i>	8	10,24	97,636	2,36
<i>Quercetina + CCl₄</i>	9	12,73	78,54	21,45

Tabla 4.- Concentración de proteína en mg/mL de cada tratamiento y los volúmenes utilizados para estandarizar la cantidad de proteína en 200µg.

Tabla 5. Concentración de Proteínas en la Fracción S9

<i>Tratamiento Administrado</i>	<i>Número Tratamiento</i>	<i>promedio (mg/ml)</i>	<i>Volumen de proteína</i>	<i>Volumen de Amortiguador</i>
<i>Amortiguador de Fosfatos</i>	1	33,28	0.5 mL	4.5 mL
<i>Extracto Metanólico</i>	2	24,53	1.35mL	3.65 mL
<i>Aceite de Maíz</i>	3	11,65	2.85 mL	2.15mL
<i>Extracto Acetónico</i>	4	24,18	1.37 mL	3.63 mL

Tabla 5.- Cantidad de proteína de la Fracción S9 en mg/mL y los volúmenes que se utilizaron para estandarizar la cantidad de proteína.

VIII. 1 Resultados de la actividad enzimática

Actividad de Citocromo P450 1A1.

Método: Fluorométrico

Sustrato: Etoxiresorufina

Curva Patrón

CURVA PATRÓN RESORUFINA	
<i>p</i> moles	Lectura Promedio
5	78,66
10	158,33
25	395,66
50	768,66
100	1549,33
250	3899,33
500	7641,33

Tabla 6.- Concentración en picomoles del estándar y promedio de las 3 lecturas tomadas en el fluorómetro

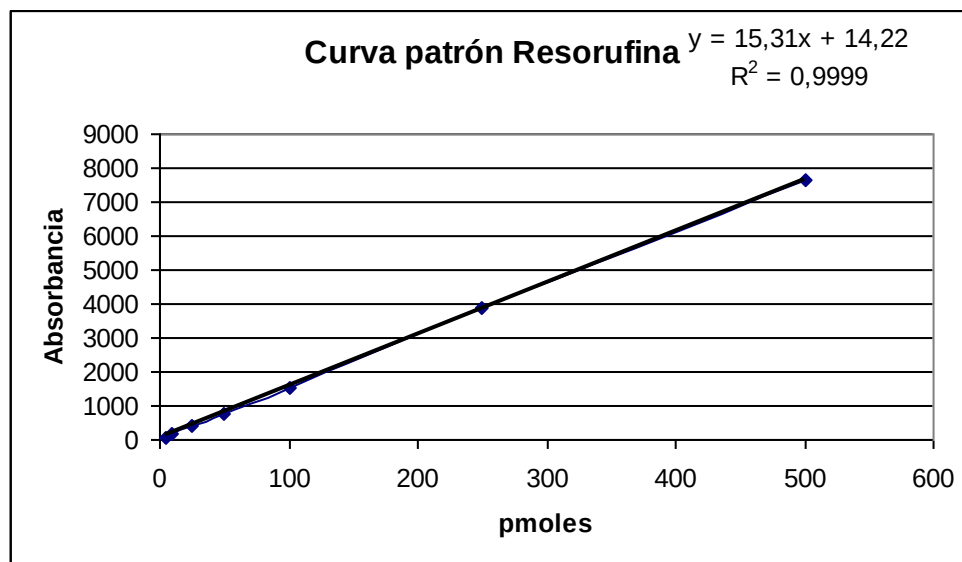
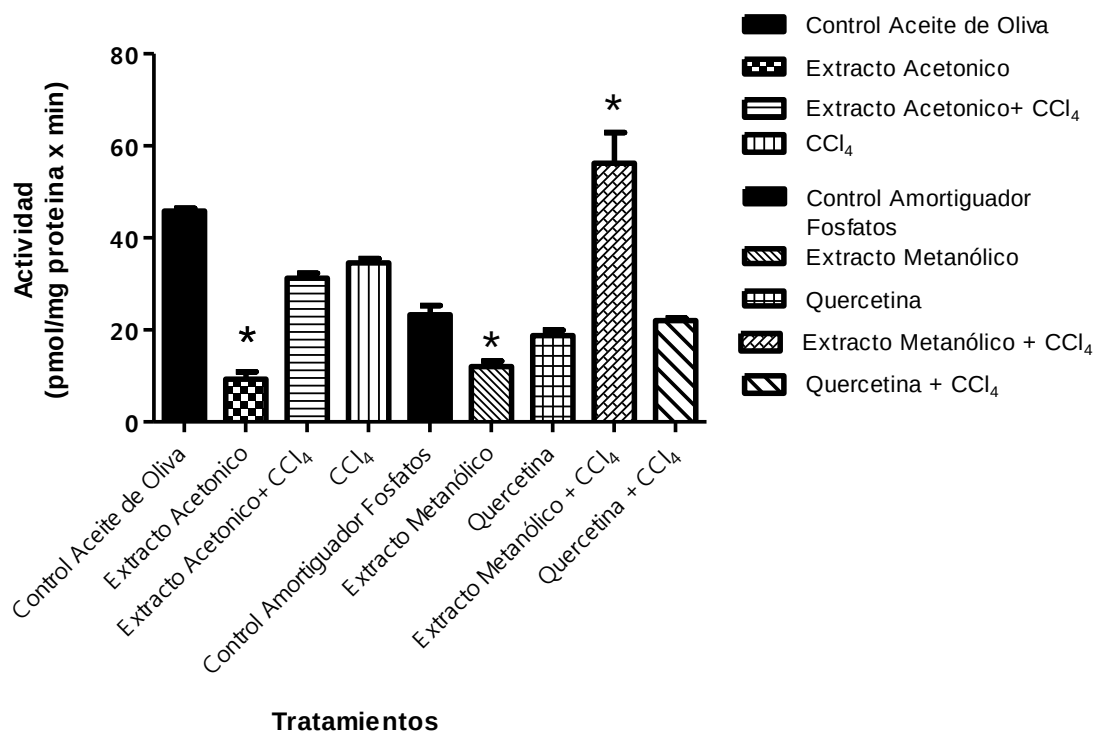


Fig. 11- Diferentes concentraciones de la resorufina (estándar) 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 pmol Vs Filtro de λ .

**Efecto de diferentes extractos de
Heterotheca inuloides sobre la actividad del CYP 1A1**



Actividad del Citocromo P450 1A2

Método: Fluorométrico

Sustrato: Metoxiresorufina

CURVA PATRON RESORUFINA	
Pmoles	Lectura Promedio
1	19.00
2	36.00
3	56.33
4	74.00
5	94.33
10	175.66
25	438.33
50	857.00

Tabla 7.- Concentración en picomoles del estándar de resorufina

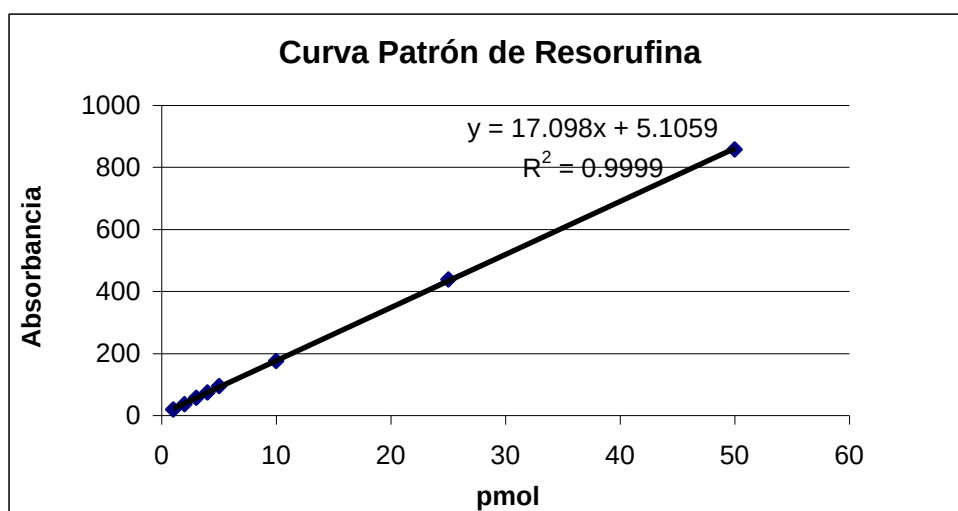
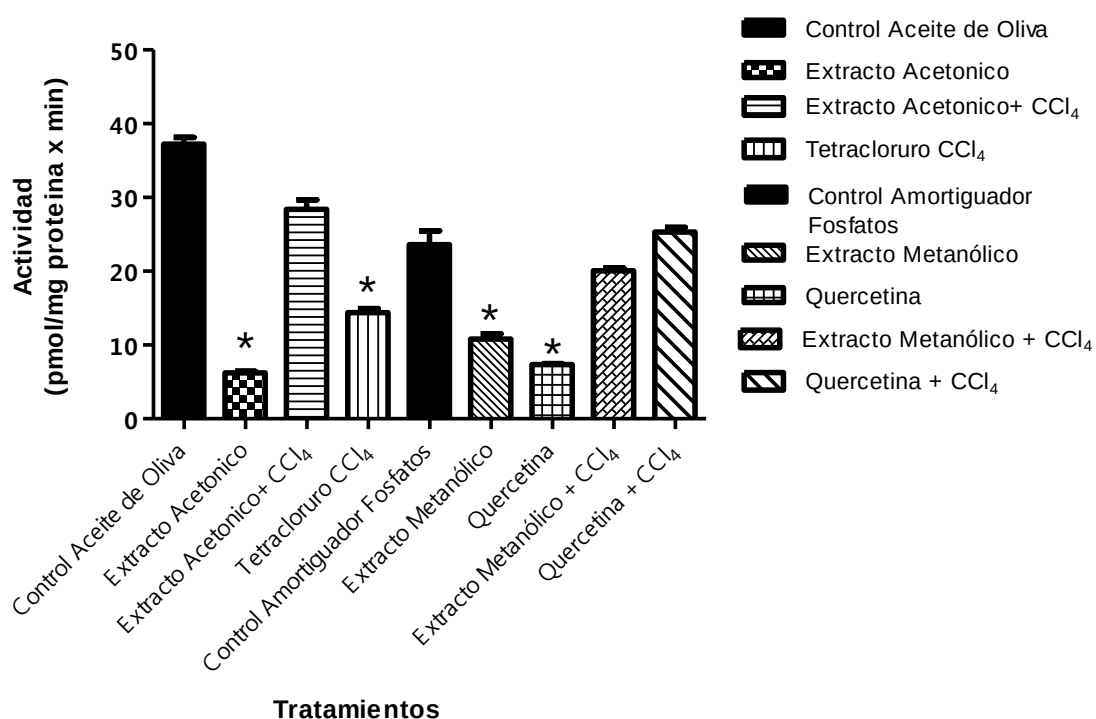


Fig. 13- Gráfica de las diferentes concentraciones de la resorufina (estándar) 1, 2, 3, 5, 25 y 50 pmol Vs Filtro de λ .

**Efecto de diferentes extractos de
Heterotheca inuloides sobre la actividad del CYP 1A2**



Actividad del Citocromo P450 2B1

Método: Fluorométrico

Sustrato: Pentoxiresorufina

CURVA PATRON RESORUFINA	
<i>p</i> moles	Lectura Promedio
5	97.33
10	190.33
25	489.66
50	957.66
100	1854.00
250	4765.66
500	8956.33

Tabla8.- Concentración en picomoles del estándar de resorufina

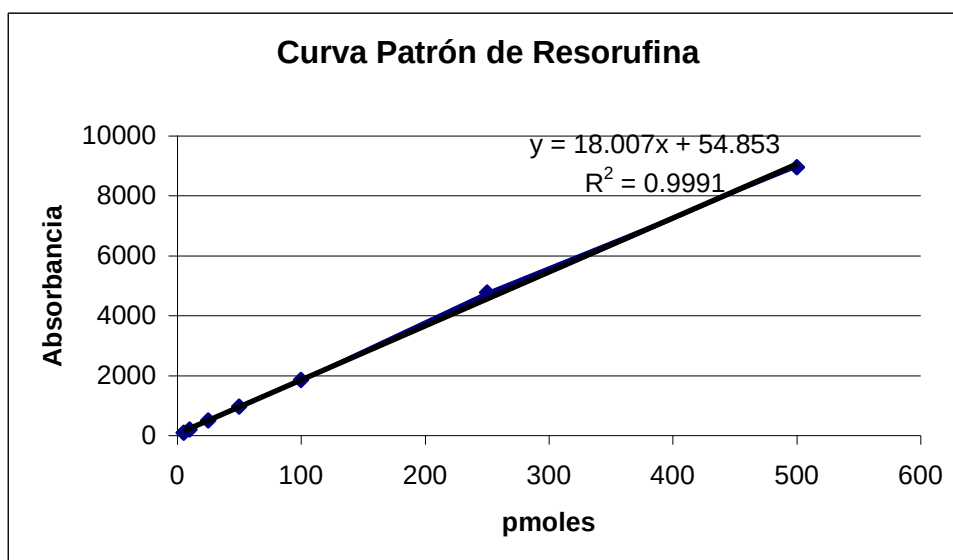
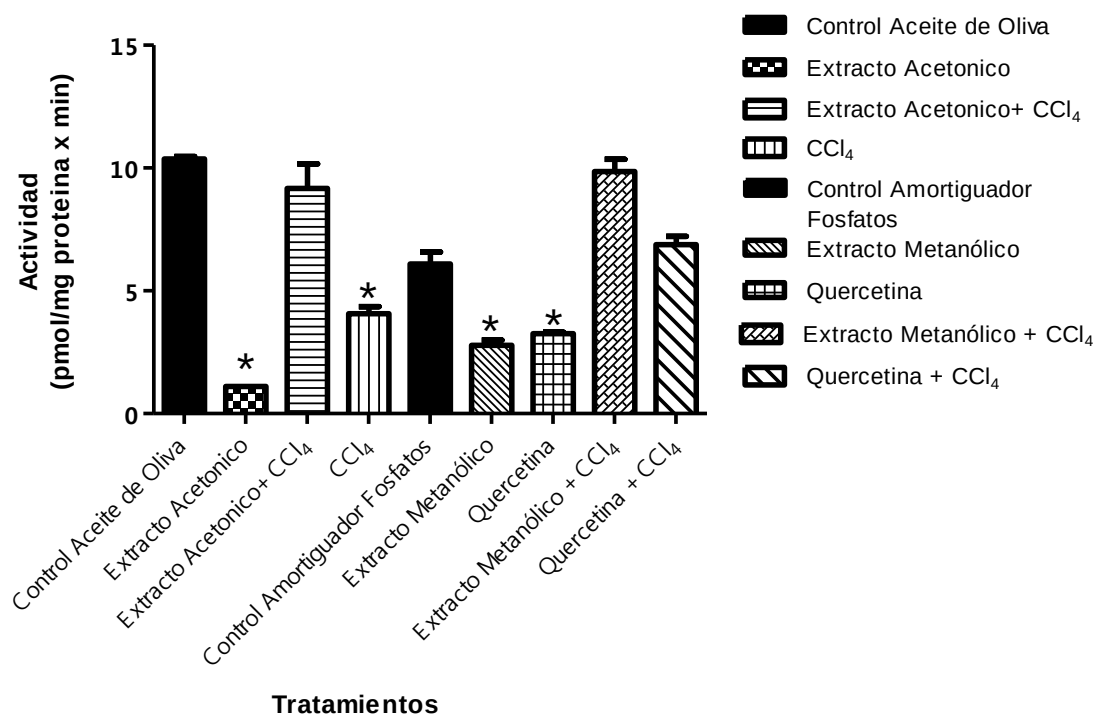


Fig. 15- Gráfica de las diferentes concentraciones de la resorufina (estándar) 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 pmol Vs Filtro de λ .

**Efecto de diferentes extractos de
Heterotheca inuloides sobre la actividad del CYP 2B1**



Actividad Citocromo P450 2B2

Método: Fluorométrico

Sustrato: Benziloxiresorufina

CURVA PATRON RESORUFINA	
Pmoles	Lectura Promedio
5	112.66
10	228.00
25	573.66
50	1141.66
100	2228.66
250	5633.33
500	11186.66

Tabla 9.- Concentración en picomoles del estándar de resorufina

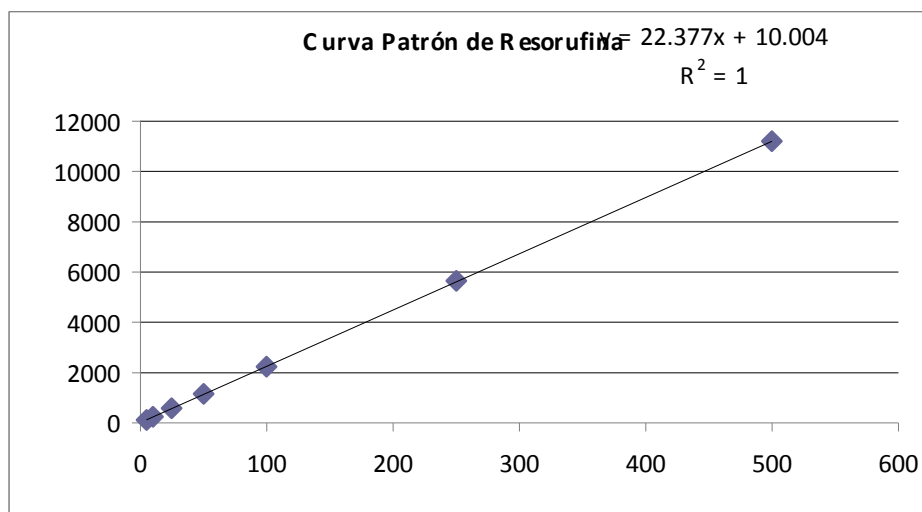
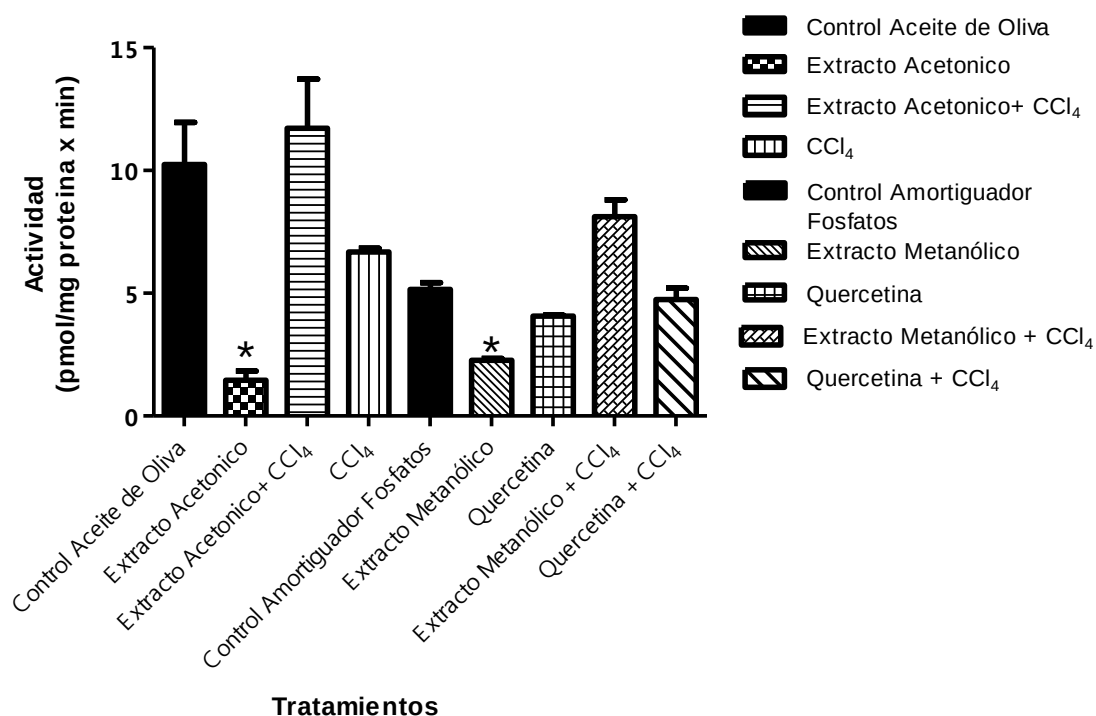


Fig. 17- Gráfica de las diferentes concentraciones de la resorufina (estándar) 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 pmol Vs Filtro de λ

Efecto de diferentes extractos de *Heterotheca inuloides* sobre la actividad del CYP 2B2



Actividad del Citocromo P450 2E1

Método: Colorimétrico

Sustrato: 4-Nitrofenol

Curva de Nitrocatecol	
Punto	[4-NC] (nmol/mL)
0	0
1	2
2	4
3	8
4	12
5	16
6	20

Tabla 10.- Concentración en nanomoles del estándar de nitrocatecol promedio de las 3 lecturas tomadas en el fluorómetro de doble az.

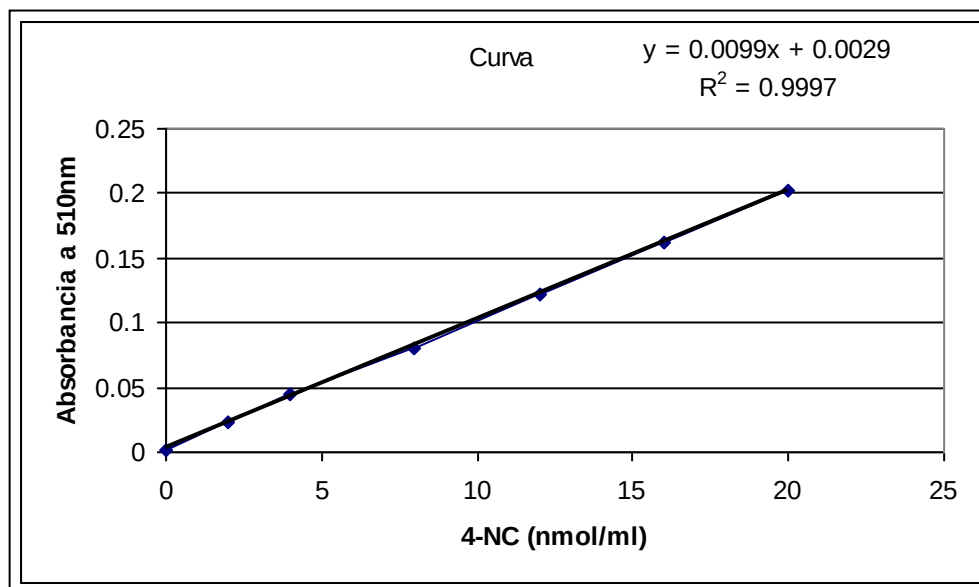
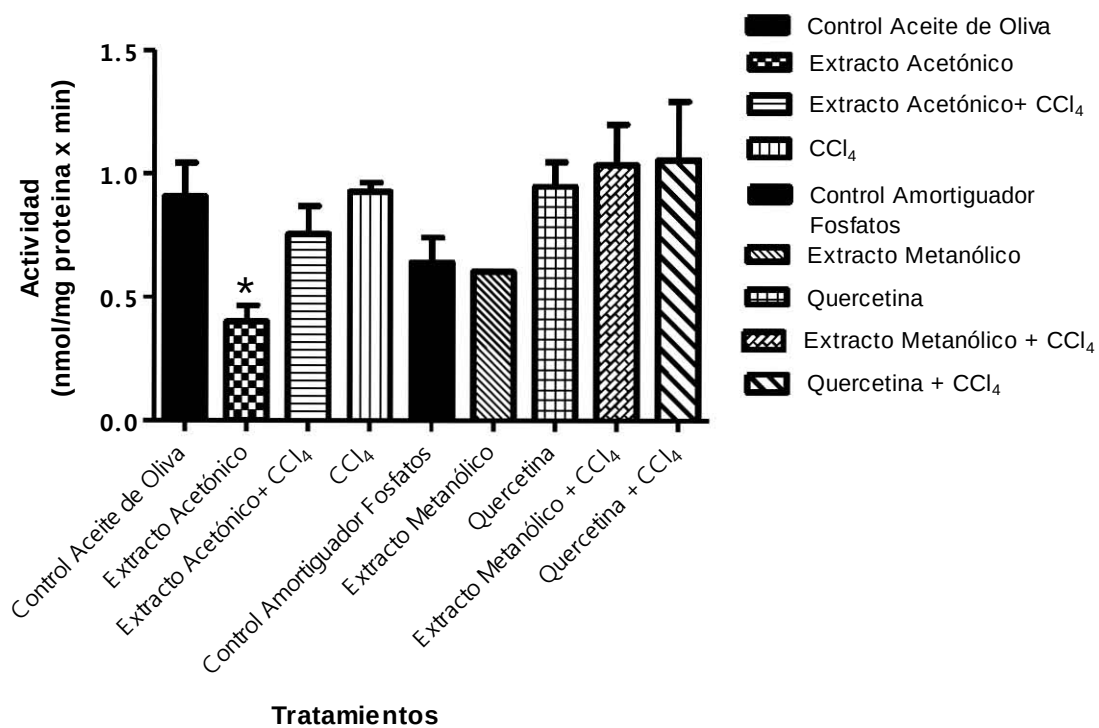


Fig. 19- Gráfica de las diferentes concentraciones del nitrocatecol (estándar) 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 nanomol Vs Absorbancia medida en el espectrofotometro.

**Efecto de diferentes extractos de
Heterotheca inuloides sobre la actividad del CYP 2E1**



VIII. 2 Resultados Ensayo Ames

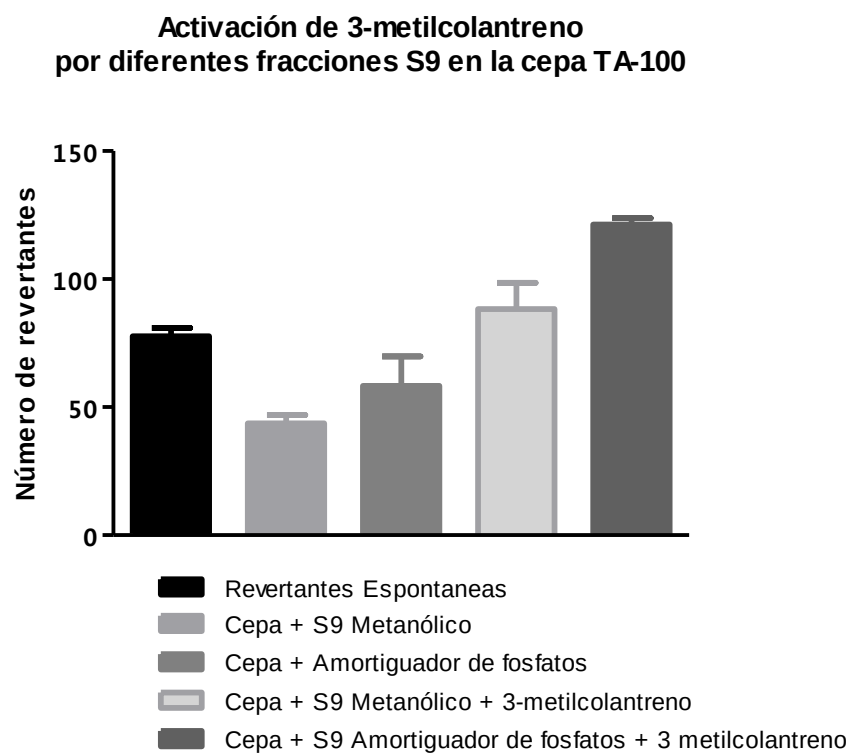


Figura 21 -Activación del 3-Metilcolantreno debida al metabolismo del CYP 1A1 en *Salmonella typhimurium* cepa TA-100. Reversión Inducida por la activación del 3-Metilcolantreno utilizando la fracción S-9 hepático de las ratas control tratadas con amortiguador de fosfatos y de la fracción S-9 hepático de las ratas tratadas con el extracto metanólico.

**Activación de 3-metilcolantreno
por diferentes fracciones S9 en la cepa TA-100**

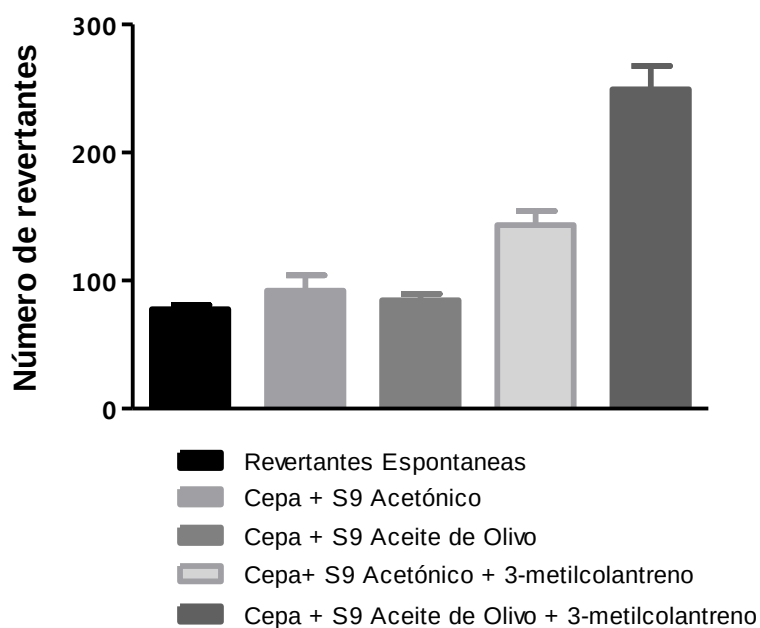
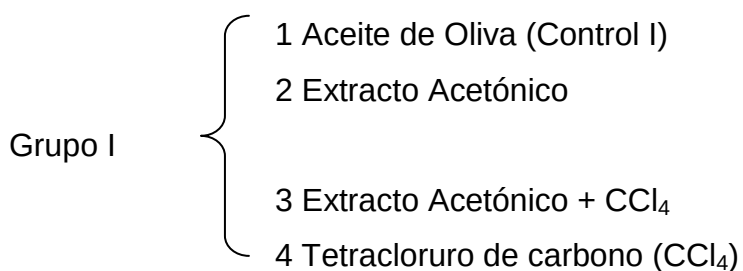
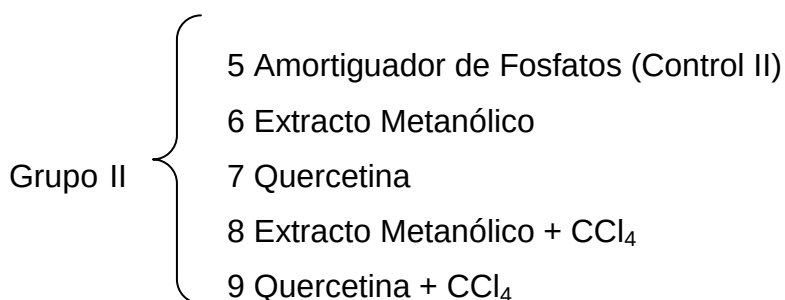


Figura 22 -Activación del 3-Metilcolantreno debida al metabolismo del CYP 1A1 en *Salmonella typhimurium* cepa TA-100. Reversión Inducida por la activación del 3-Metilcolantreno utilizando la fracción S-9 hepático de ratas control tratadas con aceite de maíz y de la fracción S-9 hepático de las ratas tratadas con extracto acetónico.

IX. Análisis de Resultados

Para entender mejor los resultados mostrados gráficamente, es necesario explicar que los 9 tratamientos se dividen en 2 grupos.





De esta forma se analizan los resultados de actividad separando cada grupo y comparándolo con su respectivo control.

CYP1A1

Como se puede observar en la figura 12, el hígado de animales que recibieron tratamiento con aceite de oliva presentó una actividad de 45.80 pmol de resorufina /mg de proteína x min, lo que se puede tomar como la actividad normal. Por otra lado, la actividad hepática del grupo que recibió el extracto acetónico fue de 9.28 pmol de resorufina /mg de proteína x min, lo que muestra una disminución en la actividad del CYP1A1 de 5 veces. Para los tratamientos con CCl₄ 34.58 pmol de resorufina /mg de proteína x min y extracto acetónico + CCl₄ 33.23 pmol de resorufina /mg de proteína x min, se observa que tienen una actividad similar a la actividad control. En el grupo II la actividad de microsomas hepáticos de animales tratados con amortiguador de fosfatos (control II) mostró un valor de 23.30 pmol de resorufina /mg de proteína x min, actividad normal del hígado debida al vehículo utilizado, en comparación la actividad hepática del grupo que recibió el tratamiento con extracto metanólico 12.00 pmol de resorufina /mg de proteína x min, disminuyó la actividad a la mitad del valor normal.

El comportamiento observado para los tratamientos de ambos extractos es inhibitorio pero dicha modulación es normal ya que se han reportado informes en donde se sabe que tanto los flavonoides de los extractos como la quercetina por si sola disminuye la actividad del CYP1A1 (Chatuphonprasert W, Kondo 2010). La inhibición debida al tratamiento con la quercetina no fue significativa, sin embargo, se puede observar que el valor está por debajo de la actividad

normal (Control 23.30 pmol de resorufina /mg de proteína x min > Quercetina 18.74 pmol de resorufina /mg de proteína x min). Un último efecto importante es el observado en la actividad medida al hígado de ratas tratadas con el extracto metanólico + CCl₄ ya que su actividad obtuvo un valor de 56.25 pmol de resorufina /mg de proteína x min, lo cual indicó un aumento del doble de actividad de CYP1A1 con este tratamiento.

CYP1A2

En la figura 14 se muestra que la actividad control (hígado de animales que recibieron el tratamiento con aceite de oliva) presentó un valor de 37.22 pmol de resorufina /mg de proteína x min y se consideró como actividad normal, en comparación con las actividades obtenidas del grupo que recibió el tratamiento de extracto acetónico 6.22 (pmol de resorufina /mg de proteína x min y el grupo que recibió el tratamiento con CCl₄ 14.38 pmol de resorufina /mg de proteína x min, se observó una disminución de 6 veces la actividad para el extracto acetónico y 2.5 veces para el CCl₄ en comparación con la actividad normal*. Por otra parte para el hígado de animales que recibieron tratamiento con extracto acetónico + CCl₄ la actividad fue de 28.39 pmol de resorufina /mg de proteína x min pero esta disminución de actividad no es estadísticamente significativa.

En cuanto al grupo II el valor de la actividad control que se midió a partir de hígado de ratas tratadas con amortiguador de fosfatos fue de 23.61 pmol de resorufina /mg de proteína x min que en comparación con las actividades medidas en los hígados tratados con extracto metanólico 10.79 pmol de resorufina /mg de proteína x min, y quercetina 7.20 pmol de resorufina /mg de proteína x min, mostraron una disminución de la actividad normal en CYP1A2 de 2 veces para extracto metanólico y 3 veces para la quercetina. Los valores de actividad registrados por los hígados de ratas tratadas con extracto metanólico + CCl₄ 20.05 pmol de resorufina /mg de proteína x min y quercetina + CCl₄ 25.30 pmol de resorufina /mg de proteína x min mostraron no tener cambios importantes respecto a la actividad control.

CYP2B1

La actividad de este citocromo es menor que la de las isoformas CYP1A1 y CYP1A2 ya que se encuentra en menor proporción en hígado y debido a ello, es normal que sus niveles de actividad desciendan (figura 16). La actividad normal de hígado debida al tratamiento de aceite de oliva (control) para este citocromo es de 10.37 pmol de resorufina /mg de proteína x min, que en comparación con la actividad medida en el hígado tratado con el extracto acetónico denotó que la actividad desciende a la novena parte de la actividad normal, 1.11* pmol de resorufina /mg de proteína x min, de igual forma se observa una disminución causada por el grupo de animales tratados sólo con CCl₄ 4.06 pmol de resorufina /mg de proteína x min, pero la actividad que se reportó cuando se midió el grupo tratado con extracto acetónico + CCl₄ 9.16 pmol de resorufina /mg de proteína x min se asemeja a la actividad normal.

Para el grupo II, la actividad medida en los hígados de animales tratados con amortiguador de fosfatos manifestó actividad de 6.09 pmol de resorufina /mg de proteína x min y el tratamiento con extracto metanólico provocó una disminución en la actividad en hígado de estos animales hasta la tercera parte de la actividad normal 2.78 pmol de resorufina /mg de proteína x min, el tratamiento con la quercetina presenta el mismo efecto que el extracto metanólico, pero reduce la actividad a la mitad 3.25 pmol de resorufina /mg de proteína x min es decir, el efecto de inhibición es menor.

CYP2B2

Esta isoforma se comporta de manera muy parecida a lo observado en CYP2B1, y sus valores de actividad se pueden distinguir en la figura 18. Para el grupo I el valor de actividad medida en hígado de animales tratados con aceite de oliva (control I) fue de 10.24 pmol de resorufina /mg de proteína x min que en comparación con las actividades de los hígados de animales tratados con extracto acetónico, cuya actividad fue de 1.45 pmol de resorufina /mg de proteína x min y de los hígados tratados con CCl₄, que reportaron una actividad de 6.68 pmol de resorufina /mg de proteína x min se observó una disminución de actividad importante, pero únicamente fue significativa para el

efecto reportado con el tratamiento de extracto acetónico. La actividad mostrada cuando se trata con el extracto acetónico + CCl_4 11.71 pmol de resorufina /mg de proteína x min, fue muy similar al valor de la actividad medida en hígados de animales control I.

En cuanto al grupo II la actividad control II hígado de animales tratados con amortiguador de fosfatos fue de 5.15 pmol de resorufina /mg de proteína x min y solo se observó una disminución de la actividad significativa que se observó en los hígados de animales tratados con extracto metanólico 2.27 pmol de resorufina /mg de proteína x min. Las actividades medidas en los hígados de los animales que fueron tratados con quercetina, quercetina + CCl_4 , y extracto metanólico + CCl_4 fueron muy similares a lo observado en la actividad del control II.

CYP2E1

La actividad de este citocromo es muy importante ya que se sabe que el CCl_4 es metabolizado por este citocromo y que se encuentra de forma constitutiva en hígado.

Como se observa en la figura 20 la actividad normal (debida únicamente al vehículo utilizado aceite de oliva) de este CYP se encuentra en un valor de 0.90 nmol / mg de proteína x min y que la única diferencia de actividad que fue estadísticamente significativa fue la encontrada en los microsomas hepáticos de animales tratados con extracto acetónico y se trato de una disminución de actividad con un valor de 0.40 nmol / mg de proteína x min la mitad de la actividad normal, la actividad más elevada para el grupo I fue la encontrada en los hígados de animales tratados sólo con CCl_4 0.92 nmol de resorufina /mg de proteína x min.

Las actividades para el grupo II son similares a los del grupo I, ya que la menor actividad fue la que se midió en hígados de animales tratados con extracto metanólico 0.60 nmol / mg de proteína x min y la actividad medida en los hígados de los animales aumenta cuando los tratamientos llevan CCl_4

como en extracto metanólico + CCl_4 1.03 nmol / mg de proteína x min y quercetina + CCl_4 nmol / mg de proteína x min.

X. Discusión y Conclusiones

Los resultados obtenidos de la actividad enzimática muestran que los extractos metanólico y acetónico provocan una disminución en la actividad de microsomas de hígado de rata en todas las isoformas de CYPs estudiadas, con respecto a la actividad encontrada en hígado de los animales control. Siendo estadísticamente significativa en todos los citocromos estudiados para el extracto acetónico y con una única excepción el CYP2E1 para el extracto metanólico. La quercetina muestra tener un efecto inhibitorio importante en los CYPs 1A2 y 2B1 donde los valores de inhibición son equiparables a los obtenidos por los extractos y esta tendencia de inhibición se conserva aunque no con la misma importancia en los CYPs 1A1 y 2B2.

Estos resultados fueron corroborados para la isoforma CYP1A1 con experimentos en los que se explora la capacidad de enzimas hepáticas para metabolizar un compuesto mutagénico a metabolitos que interaccionan con el ADN produciendo mutaciones en bacterias (prueba de AMES). El hígado de ratas tratadas con los extractos acetónico y metanólico mostraron una capacidad disminuida para “activar” el 3-metilcolantreno a metabolitos mutagénicos (Figuras 22 y 21).

Los datos obtenidos muestran que aunque los extractos pueden proteger del efecto de radicales libres, la actividad de los citocromos estudiados también puede verse afectada.

XI. Anexos

Curva patrón de Resorufina

Para poder estimar la concentración de resorufina formada durante las diferentes reacciones de los derivados de alquilo de resorufina y los CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2B1 y CYP 2B2 se construye una curva estándar de resorufina.

1.- Se disuelve 940 μ g de resorufina en 999 μ L de DMSO esta primera disolución tiene una concentración aproximada de 4000 pmoles/ μ L (Solución 1)

2.- Se toma una alícuota de 5 μ L de la solución 1 y se disuelve en 995 μ L de DMSO con lo cual se tiene una solución 2 con una concentración aproximada de 20 pmoles/ μ L.

3.- Se toma una alícuota de 400 μ L de la solución 2 y se hace otra dilución en 400 μ L de DMSO esta es nuestra solución 3 y tiene una concentración de 10 pmoles/ μ L.

4.- Por último se toma una alícuota de 80 μ L de la solución 3 y se disuelve en 720 μ L de DMSO para tener una concentración final de aproximadamente 1 pmol/ μ L.

Tubo	Concentración pmoles	μ L de solución agregado	Tipo de solución	Buffer μ L
1	5	5	4	995
2	10	10		990
3	25	25		975
4	50	5	3	995
5	100	10		990
6	250	25		975
7	500	25	2	975

Tabla 4.- Muestra la cantidad de reactivos necesarios para preparar la curva patrón de resorufina.

5.- Cada uno de los puntos de la curva se realiza por triplicado y se mide en el fluorómetro Bio Rad .

Curva patrón de 4-nitrocatecol.

Para poder estimar la concentración de 4-nitrocatecol formado durante la reacción con CYP2E1, es necesario realizar una curva patrón de este compuesto. Para este propósito se sigue el siguiente protocolo:

1.- Preparar una solución stock de 4-nitrocatecol 2mM disuelto en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1M pH 7.2 (Amortiguador 1).

2.-A partir de la solución stock se prepara una solución 100µM de 4-nitrocatecol (100µL del stock 2mM + 1900µL de amortiguador de fosfatos de potasio 0.1M pH 7.2) y a partir de esta solución se construye la curva patrón.

3.-La curva patrón recomendada es 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 nmol/mL usando como disolvente el Buffer 2 para un volumen final de 1mL. Es importante mencionar que los puntos de la curva se realizan por triplicado.

4.-Una vez preparada la curva patrón, se trata como si fuera una muestra es decir se incuba por 10min, se le agregan 200µL de HClO₄ 1.5M, se colocan en hielo, se centrifugan los tubos a 12000rpm por 5min, se recupera el sobrenadante, se agrega NaOH 10M, se homogeniza y se registra el valor de absorbencia a 510nm.

XII. Referencias Bibliográficas

Almaguer G.J.A. 2001. Programa de Trabajo 2001-2006 de la Dirección de Medicina Tradicional. Coordinación de Salud para los Pueblos Indígenas. Secretaría de Salud. México, D.F. Manuscrito. 12 págs.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein- dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., García-Cruz, M.E., Ramírez-Morales, A., Sánchez-González, D.J., Martínez-Martínez, C.M., Camacho-Carranza, R., Espinosa-Aguirre, J.J., 2010. Hepatoprotective effect of acetonic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, doi:10.1016/j.etp.2010.02.012.

Delgado G., Del Socorro Olivares M., Chávez M., Ramírez-Apan T., Linares E., Bye R., et al. 2001. Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *J. Nat. Prod.* 64:861-64.

Donato, M. T., Gómez- Lechón, M. J y Castell. J. V (1992), In vitro alternatives to animal pharmaco-toxicology Eds Farmaindustria Barcelona pp. 149-178

Garner, RC., E.C Millerand J.A Miller (1972) Liver microsomal metabolism of aflatoxin to a reactive derivate toxic to *Salmonella typhimurium* TA-1530 *Cancer Res.*, 32 2058-2066

Gené R.M., Segura L., Adzer T., Marin E. Iglesias J. 1998. *Heterotheca inuloides*: Antiinflammatory and analgesic effect. *J Ethnopharmacol.* 157-162.

Gonzalez FJ, Nebert DW. Evolution of the P450 gene superfamily:animal-plans "warfare",molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 1990; 6:182-6.

Guengerich F P, Shimada T. 1991 Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4: 391-407

Guengerich, F., Rat-limiting steps in cytochrome P-450 catalysis. *Biol Chem*, (2000). 383: p.1553-1564.

Guengerich FP. Human cytochrome P450 enzymes. Life Sci 1992; 50:1471-8.
Haraguchi H., Saito T., Ishikawa H., Sánchez Y., Ogura T., Kubo I. 1996.
Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. J.
Pharm. Pharmacol. 48:4441-443.

Haraguchi H., Ishikawa H., Sánchez Y., Ogura T., Kubo Y., Kubo I. 1997.
Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*. Bioorg. Med.Chem.865-871.
Jerga C., Merfort I., Willuhn G. 1990. Flavonoid aglycones from flowers of
Heterotheca inuloides. Planta Med. 56: 122-123.

Johnson E F, Levitt A S, Muller-Eberhard U, Torgeirsson S S. 1980. Divergent
pathways of carcinogens metabolism: metabolism of 2 acetylaminofluorene by
multiple forms of cytochrome P-450. Cancer. res. 40: 4456-460.

Kamataki T, Maeda K, Yamazoe Y, Nagai T, Kato R, 1983 Sex difference of
cytochrome P-450 in the rat: purification, characterization, and quantitation of
constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and
female rats. Arch Biochem Biophys. 225: 758-770

Koop DR. 1986 Hidroxylation of p-nitrofenol by rabbit ethanol-inducible
cytochrome P450 isoenzyme 3A. Mol. Pharmacol. 29: 399-404

Kubo I., Muroi H., Chaudhuri S. K., Sánchez Y., Ogura T., Saito T., Ishikawa H.,
Araguchi H. 1994. Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. Plant. Med.
60:218-221.

Kubo I., Chaudhuri S. K., Kubo Y., Sánchez Y., Ogura T., Saito T., et al. 1996.
Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. Planta
Med. 62:427-430.

Lewis D.F (2001) Guide to cytochromes P450: structure and function.
Taylor and Francis, London.

Linares, M. E., Bye, R.; Flores, B. Tes Curativos de México, 2nd ed.;
Cuadernos del Instituto de Biología 7, Universidad Nacional Autónoma de
México, 1990.

Martínez M. 1984. Catalogo de Nombres vulgares y científicos de plantas
Mexicanas. Fondo de Cultura Económica: México. 1984; pp 145-46.

Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México ; Editorial Botas; México, D. F., 1989.

Muriel P. and Mourelle M. 1990. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄ liver damage. J. Appl. Toxicol. 10:275–279.
Munro A. W, Girvan H. M., MacLean K. Variations on a (t)heme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the Cythocrome P450 superfamily Nat Prod Rep, Vol. 24, pag 585-609 (2007)

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, et al: The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. DNA Cell Biol 1993; 12:1-51.

Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. J Biol Chem 239:2370-2378.

Pietra, F. (2002) Biodiversity and natural product Diversity Pergamon. Tetrahedron Organic Series Volumen 21.

Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants. 2000. J. Nat. Prod. 63:1035-1042.

Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 20:933–956.

Segura L., Freixa B., Ringbom T., Vila R., Perera P., Adzet T., et al. 2000. Antiinflammatory activity of dicloromethane extract of *Heterotheca inuloides* in vivo and in vitro. Planta Med. 66:553-555.

Villaseñor Ríos J. L. y F. J. Espinosa García. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.

Yoo J. S, Ning S. M, Pantuk C. B, Pantuk E. J, Yang C. S, 1991 Regulation of hepatic microsomal cytochrome P450E1 levels by dietary lipids and carbohydrates in rat , J Nutr. 121: 959-1002.