



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“EFECTO ANTIMUTAGÉNICO DE *MANGIFERA INDICA* L. EN
SALMONELLA TYPHIMURIUM”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GABRIELA LÓPEZ CARAPIA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
2012**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de dato del jurado

1. Datos del alumno

López

Carapia

Gabriela

26153543

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

304140835

2. Datos del tutor

Dr.

Jesús Javier

Espinosa

Aguirre

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Sandra Luz

Gómez

Arroyo

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Patricia

Ramos

Morales

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Josefina

Cortés

Eslava

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

María Concepción

Moreno

Zenteno

7. Datos del trabajo escrito.

Efecto antimutagénico de *Mangifera indica*
L. en *Salmonella typhimurium*

64 p

2012

Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más, pero aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida.

Arthur Schnitzler (1862-1931) Dramaturgo austríaco.

La vida no se ha hecho para comprenderla, sino para vivirla.

Jorge Santayana (1863-1952) Filósofo y escritor español.

Alégrate de la vida porque ella te da la oportunidad de amar, de trabajar, de jugar y de mirar a las estrellas.

Henry Van Dyke (1852-1933) Escritor estadounidense.

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

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México la oportunidad que me ha dado al poder estudiar en esas bellas instalaciones, en las cuales me formé tanto en el ámbito intelectual, profesional, científico y personal, pues aquí conocí gran cantidad de gente que ha construido la esencia de mi persona.

A mí querida Facultad de Ciencias donde viví los mejores años de mi existencia, aquí me llené de alegrías, triunfos, tristezas, enojos, no solo en lo académico, si no también en lo deportivo y gracias a estos sucesos me forje un temperamento y carácter que me sirve para lo que resta de mi vida

Al Dr. J. Javier Espinosa Aguirre por confiar en mi capacidad para sacar adelante este trabajo, por apoyarme incondicionalmente, tenerme paciencia y estar siempre presente por cualquier duda que surgiese.

Al Dr. Rafael Camacho por ser una parte importante del laboratorio y encontrar en él un ejemplo a seguir por la amplia gama de conocimientos que posee y que fueron de gran ayuda para resolver los problemas los que me enfrente en el desarrollo de mi trabajo.

A la Biól. Sandra Luz Hernández Ojeda quien me apoyó en la asesoría técnica, con el manejo de los animales y el trabajo experimental; haciendo que mi estancia en el laboratorio fuera más amena. A Javier Belmont por su asesoría en los ensayos de actividad enzimática y las recomendaciones hechas basadas en su amplia experiencia profesional.

Un agradecimiento particular a la Dra. Patricia Ramos Morales, Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, Dra. Josefina Cortes Eslava y a María Concepción Moreno Zenteno por sus valiosas sugerencias en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio que llegaron a convertirse en unos grandes amigos con los que viví infinidad de experiencias, buenas, malas, divertidas o agobiante y que a pesar de ello nunca se perdió ese lado de enriquecimiento intelectual y laboral que me sirvió para estructurar este proyecto.

DEDICATORIAS

A mi madre y mi padre que siempre han estado para brindarme su cariño incondicional, su apoyo en las buenas y en las malas, dándome ánimos cuando lo necesitaba y por nunca dejarme caer; por esas platicas tan valiosas de las cuales saque consejos que me han servido a lo largo de mi vida, en verdad gracias por ser los mejores padres y darme todo lo que necesite, este es el resultado de sus esfuerzos.

A mi hermano con quien he compartido un sinfín de aventuras y que es mi más grande confidente, amigo y me enalteces, gracias Ale porque sin tus consejos y puntos de vista nunca hubiera terminado este trabajo.

A mi abuelita, tíos, tías, primos, y toda mi familia quienes me han demostrado su aliento de muchísimas formas, espero seguir siendo su orgullo y nunca defraudarlos, esto también es para ustedes, los quiero mucho y no olviden que siempre serán los pilares de mi éxito.

Para todos los amigos que cada que flaqueaba me centraban y no permitían que cambiara el curso de mi camino, en especial a mis mejores amigos Ivon, Tanya, Nayeli, Dulce, Teresa, Pau, Bere, Alfredo, Hugo, Palencia que siempre han estado sin pedir nada a cambio.

A mis amigos de la carrera con quienes compartí tantas anécdotas, en 4 años...que no hicimos, gracias por ser solo ustedes y ser mi segunda familia: Berenice, Alfredo, Karla, Isabel, Vanessa, Sussie, Manu, Mark, Gerardo y Sebastián a ti en particular te agradezco el tiempo que pasamos juntos, aprendimos, maduramos y compartimos tantas cosas, eres una gran persona y estaré aquí siempre para ti.

A mis amigos del museo Universum: Brenda, Fabián, Luis, Karen, Marisela, Ris, Julio, Sharon con quienes llevo tan poco tiempo de conocer y parecería que los conozco de años, el trabajo con ustedes ni se siente; en especial contigo Janet ya que has llegado a ser una parte muy importante de mi vida, tu amparo y motivación fue el último impulso que necesitaba para dar por terminado esta etapa de mi vida y lo tengo muy presente.

Finalmente a todas las personas que por azares del destino llegaron a ser parte importante de mi camino por esta vida, todos me han dejado una enseñanza y se agradece la molestia de toparse conmigo en este sendero.

INDICE	Páginas
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Antimutágenos	10
1.1.1 Mecanismos de acción	11
1.1.2 Citocromos P450 enzimas de fase I	13
1.1.2.1 Subfamilia 1 ^a	14
1.1.2.2 Subfamilia 2E	15
1.1.3 Activación, Inhibición e Inducción de los CYP's	16
1.1.3.1 Activación de los CYP's	16
1.1.3.2 Inhibición de los CYP's	17
1.1.3.3 Inducción de los CYP's	19
1.2 Pruebas para la detección de antimutágenos (Sistemas para detección)	20
1.2.1 Microbianos	20
1.2.2 Cultivos celulares	20
1.2.3 Animal completo	21
1.3 Prueba de Ames	21
2. ANTECEDENTES	22
2.1 El extracto acuoso de la corteza de <i>Mangifera indica</i> Linnaeus (MSBE)	23
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVO	28
6. MATERIAL Y METODOLOGÍA	29
6.1 Reactivos	29
6.2 Extracto herbal	29

6.3 Animales 6.4 Obtención de las fracciones S9 y microsómica	30
6.5 Ensayos de mutagenicidad	30
6.6 Determinación de las actividades de O-Desalquilación de alkoresorrufina (AROD)	31
6.7 Análisis de datos	32
7. RESULTADOS	32
7.1 Efecto mutagénico y antimutagénico del MSBE	32
7.2 Efecto mutagénico y antimutagénico de la mangiferina	36
7.3 Determinación del efecto del MSBE sobre la actividad de CYP	40
7.4 Determinación del efecto de la mangiferina sobre la actividad enzimática de CYP	37
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	41
10. PERSPECTIVAS	42
11. REFERENCIAS	42
12. APÉNDICE	59

RESUMEN

En la actualidad existen investigaciones cuyo tema de estudio es el efecto antimutagénico de extractos de plantas. Frecuentemente, dicho efecto es debido a la capacidad de los extractos para modular las enzimas de fase I (Citocromos P450) involucradas en el metabolismo de xenobióticos. Un ejemplo a estudiar es el extracto acuoso de la corteza del árbol del mango cuyo nombre científico es *Mangifera indica Linnaeus* (MSBE). Su composición está integrada por una mezcla de polifenoles, siendo la mangiferina el compuesto mayoritario. El objetivo de este estudio fué evaluar el efecto antimutagénico del MSBE y la mangiferina, en el sistema de *Salmonella thyphimurium* (prueba de Ames), además de explorar el mecanismo de antimutagénesis a través de la inhibición de la actividad de los citocromos P450 1A1 y 1A2. En primera instancia se probó la capacidad del extracto y la mangiferina para inhibir la mutagénesis del Benzoapireno (B[a]P) y la N-nitrosopirrolidina (NPYR) en presencia de fracciones microsómicas hepáticas obtenidas de ratas tratadas con β -naftoflavona y fenobarbital (inductor de CYP1A) y de ciclohexanol (inductor de CYP2E1), respectivamente. Los resultados revelaron que, el MSBE disminuye la mutagenicidad del B[a]P y la NPYR conforme aumenta su concentración, mientras que para la mangiferina, el efecto antimutagénico provocado fue menos pronunciado comparado con el observado con el extracto total y el B[a]P, siendo nulo dicho efecto con la NPYR. Esto sugiere que el MSBE inhibe el efecto mutagénico del B[a]P y la NPYR impidiendo la producción de los metabolitos responsables de la mutagenicidad. Para probar este mecanismo de antimutagenicidad, se determinó el efecto del MSBE y la mangiferina sobre la actividad de CYP1A1 y 1A2 usando sustratos específicos de estas enzimas. Encontramos que hubo una disminución en la actividad del CYP1A1 y un aumento en la actividad del CYP1A2 en presencia de MSBE, mientras que para la mangiferina se observó el mismo patrón. Estos resultados son la base para explorar el posible efecto quimioprotector del MSBE y la mangiferina en un modelo *in vivo*; tomando en cuenta que los CYP también metabolizan sustancia endógenas, se deberá incluir el estudio del posible efecto tóxico involucrado en la inhibición del CYP.

Palabras clave: Antimutágeno, Prueba de Ames, CYP1A, CYP2E1, MSBE, mangiferina, B[a]P, NPYR, Efecto antimutagénico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antimutágenos

Un antimutágeno es cualquier compuesto que reduce la frecuencia de mutaciones espontaneas o inducidas. Las acciones de dichas sustancias se pueden traducir en la disminución del daño al ADN de las células (1).

En los últimos años se ha observado que varios de los compuestos que protegen el ADN son de origen vegetal. En las primeras investigaciones, se observó que las vitaminas A, C y E protegen al ADN del daño inducido por radiación UV y por algunos compuestos químicos (2). Para 1970 se empezaron a realizar los primeros ensayos de detección donde se pusieron a prueba un gran número de extractos de plantas y especias usando pruebas de antimutagenicidad en sistemas bacterianos (3).

De estos avances se identificaron un sin fin de antimutágenos en los alimentos que consumimos diariamente. Entre estos compuestos se pueden citar a los carotenoides (como los carotenos y licopenos), flavonoides (como la cúrcuma, quercetina, vainillina), vitaminas, antioxidantes, minerales (tocoferoles, el ascorbato, el selenio), los isotiocianatos, los polifenoles (la epigallocatequina-3-galato (EGCG)), derivados de soja (por ejemplo, saponinas) y fitoestrógenos (genisteína) (4).

Debido a su actividad los antimutágenos se pueden separar en:

- Desmutágenos: son agentes que actúan en forma directa sobre el mutágeno, modificando su estructura química o bioquímica antes de que éste alcance la molécula blanco (5). Como ejemplo están los moduladores enzimáticos que provocan inactivación directa ya que impiden la formación o activación de los mutágenos a su forma mutagénica (6). Dentro de esta clasificación también se encuentran los antioxidantes.
- Bioantimutágenos: agentes que actúan directamente sobre el ADN a través de hacer más eficiente la reparación o los procesos de replicación, disminuyendo así la frecuencia de las mutaciones tanto inducidas como espontáneas (4). El efecto protector se le adjudica al incremento en la fidelidad de la replicación del ADN, aceleración de la tasa de reparación en la recombinación (7), la estimulación de la reparación libre de errores y por la inhibición de los sistemas de reparación propensos a error (8, 9). Estos compuestos actúan después de que se ha producido la lesión en el ADN y antes de que esta se fije.

1.1.1 Mecanismos de acción

Para el uso racional de los antimutágenos es importante no sólo evaluar su utilidad y eficacia sino también se debe indagar los mecanismos involucrados (10). Por lo tanto, para caracterizar la actividad antimutagénica de un compuesto se necesita conocer los rasgos esenciales de su modo de acción: si es un desmutágeno o un bioantimutágeno, si actúa de forma directa o indirecta, si su acción es específica para determinados tipos de mutágenos o no y si sólo actúa o no en procesos celulares específicos. A esto se une el hecho de que existen varios agentes que operan mediante múltiples mecanismos, con una alta eficacia y un amplio espectro de acción (10). Por ello, De Flora postuló que algunos inhibidores de la mutagénesis actúan impidiendo o modulando la cascada de eventos involucrados en los pasos previos al daño premutagénico o lesión primaria del ADN (11).

Siguiendo con este postulado, De Flora y Ramel publicaron un esquema con los diferentes mecanismos de los antimutágenos y anticarcinógenos (Figura 1) y una tabla con ejemplos de los modos de acción de diversos compuestos (Tabla 1) (12).

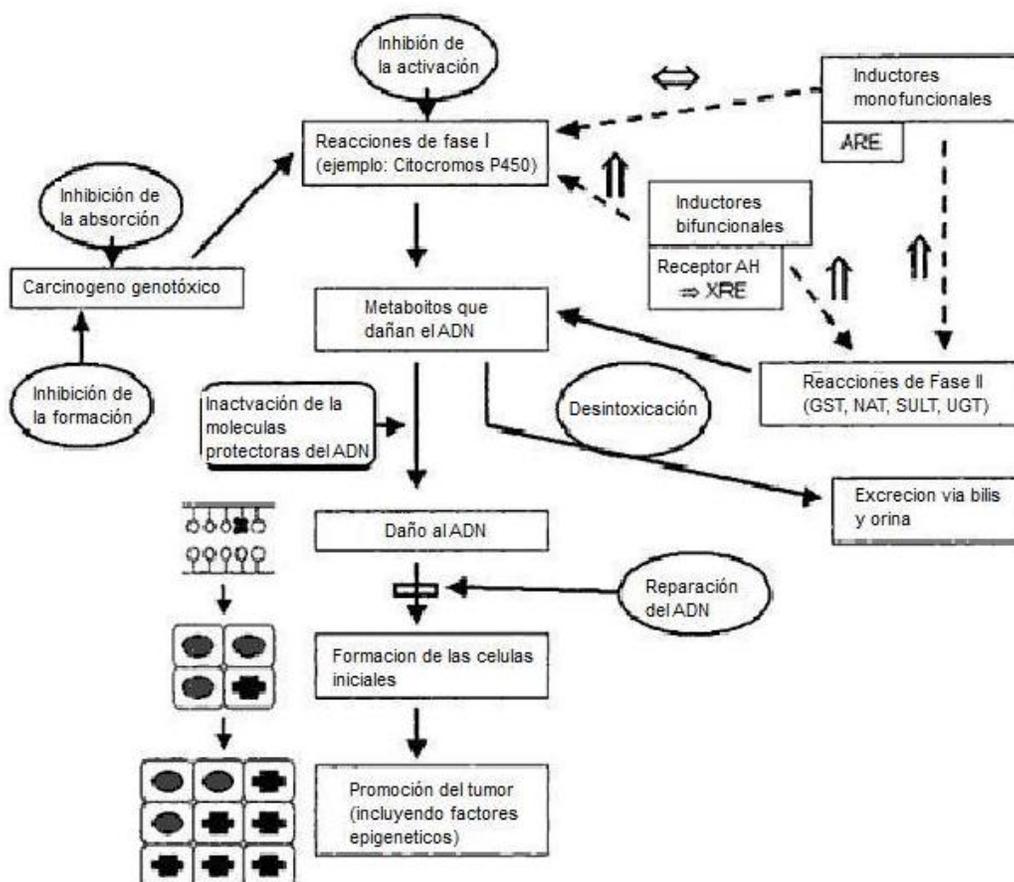


Figura 1. Visión general de los diferentes modos de acción, mediante los cuales los compuestos previenen daño al ADN (12)

Tabla 1. Mecanismos de los antimutágenos (12)

Modo de acción	Ejemplos
Inhibición de la formación de mutágenos	Inhibición de la formación de nitrosaminas endógenas por vitaminas y fenoles de origen vegetal.
Unión directa a los mutágenos	Unión de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las aminas aromáticas heterocíclicas por lactobacilos.
Inhibición de la captación celular	Los ácidos grasos de cadena corta interfieren con la absorción celular de la N-dimetilnitrosamina. La putresina impide la captación celular del paraquat.
Inhibición de la activación de los promutágenos	Inhibición de la α -C hidroxilación de las nitrosaminas por los metabolitos del glucosinalato.
Inactivación de las moléculas reactivas al ADN	Inducción de los metabolitos de PAH por los ácidos fenólicos.
Inducción de las enzimas desintoxicantes	La inducción de la glucuronosil-transferasa por isotiocianatos de verduras crucíferas. La inducción de la glutatión-S-transferasa por diterpenoides del café
Modificación de la reparación del ADN y su replicación	Ingredientes de las especies como la cinamaldehído, vanilina, etc.

Muchos de los antimutágenos conocidos actúan en diferentes niveles a la vez y esta característica complica la evaluación de los mecanismos de acción específicos en los seres humanos. Un ejemplo conocido es el kahweol y el cafetol (compuestos liposolubles conocidos como diterpenos) los cuales son componentes del café que tienen un gran impacto en una serie de enzimas que metabolizan fármacos y xenobióticos y de igual forma inducen la reparación del ADN (13, 14, 15).

Existe una gran cantidad de componentes en las plantas que inhiben las reacciones de activación o actúan a través de la inducción de enzimas desintoxicantes, por ejemplo la genisteína ha sido clasificada como un modulador de enzimas pertenecientes a los citocromos P450 (4).

1.1.2 Citocromos P450 enzimas de fase I

Para los mamíferos, los componentes de las plantas son xenobióticos y por lo tanto se eliminan del organismo a través de las reacciones mediadas por las enzimas de fase I y fase II. Varias de las reacciones de la fase I son catalizadas por los Citocromos P450 (CYP's) los cuales ayudan a hacer a las moléculas más polares para su excreción (16).

Los CYP's son una superfamilia de hemoproteínas que se encargan de oxigenar con un átomo de O₂ (mono-oxigenasas) a una gran cantidad de sustratos lipofílicos endógenos y exógenos, dando lugar a metabolitos intermedios que serán el sustrato de las enzimas de fase II (17). Las biotransformaciones oxidantes catalizadas por los CYP's incluyen hidroxilación aromática y de cadena lateral, desalquilación de N, O y S, oxidación de N, sulfoxidación, hidroxilación de N, desaminación, deshalogenación y desulfuración.

Los CYP's que metabolizan a los compuestos exógenos se localizan en la membrana del retículo endoplasmático unidos a ésta por la porción amino-terminal. Debido a esta propiedad, los xenobióticos metabolizados por los CYP's son generalmente hidrofóbicos y son transformados en moléculas hidrofílicas para facilitar su eliminación (18).

Por otro lado, estas enzimas son las responsables de activar algunos carcinógenos y pro fármacos llegando a formar compuestos intermedios inestables o reactivos que provocan una unión covalente con el DNA y contribuyen al proceso carcinogénico. Los productos o metabolitos pueden unirse a la porción hemo de los CYP inactivándolos. Los CYP's son los causantes de la "activación metabólica" que no es otra cosa que la conversión de un compuesto exógeno en metabolitos más tóxicos. Muchos carcinógenos como las aflatoxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y aminas heterocíclicas, son biológicamente inactivos en sí mismos y necesitan de la activación metabólica para convertirse en sustancias con capacidad de interactuar con el ADN y otras moléculas nucleofílicas (18).

También participan en la conversión metabólica de algunos sustratos a radicales libres (RL), los cuales son altamente reactivos. Muchos de los metabolitos que originan los CYP's son biológicamente activos y frecuentemente su expresión es modulada por los agentes que metabolizan (19).

Los compuestos como fármacos y plaguicidas son transformados principalmente en el hígado por las subfamilias CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C, CYP2E1 y CYP3A4 (20, 21).

Las familias de los CYP's 1, 2 y 3 son las responsables de metabolizar una amplia variedad de compuestos exógenos (xenobióticos), que además de ser sustratos actúan como agentes inductores (22). De hecho se sabe que los sustratos y/o inductores pueden actuar como inhibidores en concentraciones suficientemente altas (23). Entre las familias de interés para

este estudio se encuentran las subfamilias 1A y 2E cuyas características se mencionan a continuación:

1.1.2.1 Subfamilia 1A

Dos integrantes importantes de esta subfamilia son el CYP1A1 y el CYP1A2 (que presentan un 80% de similitud entre la rata y el ser humano). La regulación transcripcional de esta subfamilia es controlada por el receptor de hidrocarburos aromáticos policíclicos que se localiza en el citoplasma (AhR) y por el translocador nuclear del AhR (Arnt) que provoca la inducción masiva de estas enzimas. Una vez formado el complejo xenobiótico/receptor/translocador, es trasladado al núcleo uniéndose a la región reguladora del CYP1A favoreciendo la inducción de la proteína (24).

La conservación evolutiva observada en la subfamilia 1A sugiere que este CYP desempeña un papel importante en el metabolismo de compuestos carcinógenos ambientales (24). Las dioxinas y el B[a]P son sustratos para el CYP1A1 (25-30). El CYP1A1 no sólo se induce en hígado también en riñón y pulmón y es inducible principalmente por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA), mientras que el CYP1A2 está en mayor cantidad en el hígado y es inducible por aminas aromáticas (31, 32). Como enzima metabolizadora de fase I, la principal función atribuida a la enzima CYP1A1 es la de oxidar a los HAP's hidrofóbicos, como primer paso para su eliminación (33, 34).

El B[a]P que se encuentra en el humo del tabaco y en la carne asada, sufre dos reacciones de oxigenación sucesivas por el CYP1A1, que conduce a la formación de un compuesto altamente mutagénico y carcinogénico: el diol-epoxido-benzo[a]pireno (31).

La actividad del CYP1A1 puede también producir Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) ya que se ha demostrado que varias mono-oxigenasas liberan peróxido de hidrógeno durante su ciclo catalítico particularmente en presencia de los llamados sustratos no acoplados (28). Por lo tanto, se puede dar el caso de que una alta actividad del CYP1A1 pueda ser deletérea a causa de la generación de un estrés oxidante y la subsiguiente oxidación de macromoléculas biológicas (29).

Mientras que el CYP1A2 hidroxila o desmetila compuestos exógenos, también participa en el metabolismo endógeno como es la síntesis de estradiol 17 β y el uroporfirinógeno (30). A continuación se muestran algunos compuestos que inhiben o inducen al CYP1A2:

Tabla 2. Compuestos metabolizados, que inhiben o inducen al CYP1A2 (30)

	Moléculas metabolizadas	Inhibición de la actividad	Inducción de la actividad
CYP1A2	- Cafeína - Teofilina	- Fluvoxamina - Jugo de uva - Ranitidina - Lidocaína	- Cafeína - Brócoli - Coliflor - Humo de cigarro

La familia CYP1A activa metabólicamente una serie de procarcinógenos, lo que apoya la hipótesis de que su inhibición podría estar implicada en la prevención de las transformaciones malignas (32).

1.1.2.2 Subfamilia 2E

El CYP2E1 cataliza la activación de procarcinógenos y protoxinas como la N-nitrosodimetilamina y N-nitrosopirrolidina (34). Esta enzima llega a participar en la generación de radicales libres tales como el radical superóxido y el peróxido de hidrogeno, los cuales están asociados a su toxicidad. El CYP2E1 se expresa constitutivamente en una mayor concentración en hígado, mucosa nasal, pulmón, ovario, testículo, intestino delgado, colon y cordón umbilical (19). Esta isoenzima presenta una homología del 75% y 78% con relación a la secuencia de aminoácidos y nucleótidos entre la rata y el ser humano respectivamente. La expresión del CYP2E1 puede ser regulada por varios xenobióticos y muchos de ellos son sustratos que inducen su propio metabolismo y el de compuestos de muy diversa estructura química que cuentan con la característica general de poseer un peso molecular bajo (alcoholes, nitrosaminas, etc.). Su modo de regulación es complejo incluyendo eventos tanto transcripcionales como postrcripcionales. El CYP2E1 metaboliza una gran variedad de compuestos químicos con estructuras diferentes, en particular compuestos pequeños e hidrofóbicos, incluyendo carcinógenos potenciales (24).

El ciclohexanol (CH), es un alcohol cíclico capaz de modificar el metabolismo en los mamíferos, que según Brondeau *et al* (35) induce incremento en el contenido de CYP hepático. Este disolvente ha sido probado para inducir enzimas de CYP entre las cuales se encuentran las subfamilias de los CYP's 2E y 2B (36). La S9 de ratas tratadas con ciclohexanol puede biotransformar *in vitro* varias N-nitrosaminas como la N-nitrosodimetilamina (DMNA) o la N-nitrosopirrolidina (NPYR) produciendo metabolitos mutagénicos.

Por su parte, las especies reactivas de oxígeno (EROs) se pueden generar en todo el organismo a partir de fuentes endógenas, como son los productos de la respiración celular o

de la respuesta inflamatoria y también proceder de fuentes exógenas como consecuencia del metabolismo de los carcinógenos (el benceno, la aflatoxina, el B[a]P, etc.). En el caso concreto de las N-nitrosaminas, el metabolismo oxidante a través del CYP genera una variedad de especies radicales y no radicales, responsables de los efectos tóxicos de estos carcinógenos (37). El CYP requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato resultando en la formación de H₂O₂ y de O₂⁻. Así, un aumento en la actividad del CYP puede favorecer el consumo acelerado del oxígeno y aumentar la producción de las EROs. A continuación se muestran algunos compuestos que inhiben o inducen al CYP2E1:

Tabla 3. Compuesto metabolizados, que inhiben o inducen al CYP2E1 (30)

	Moléculas metabolizadas	Inhibición de la actividad	Inducción de la actividad
CYP2E1	- Acetanominofen - Anilina - Etanol - Clorzoxazona	- Clometiazol - Dimetilcarbamato - Disulfiram - Isoniazina	- Etanol - Isoniacida - Obesidad retinoide

1.1.3 Activación, Inhibición e Inducción de los CYP's

La modificación de la actividad de los CYP's es de gran preocupación, ya que podría provocar alteraciones en el metabolismo sustrato-fármaco de estas enzimas y por lo tanto alterarían la actividad biológica de este último, lo que conduciría a interacciones farmacológicas perjudiciales. La inhibición del metabolismo de los xenobioticos, debido a la competencia entre dos compuestos que son metabolizados por el mismo CYP, puede dar lugar al aumento de las concentraciones de uno o ambos que podrían dar efectos adversos graves. Por otro lado, la inducción enzimática, que es el aumento de la cantidad total de la enzima con la capacidad de metabolizar un xenobiótico, puede atenuar la acción de un fármaco como resultado de aumentar su eliminación y posteriormente conducir a la disminución de la concentración. Los efectos de los inductores son generalmente indirectos y en la mayoría de los casos no interactúan físicamente con la enzima cuando se causa la inducción (38).

1.1.3.1 Activación de los CYP's

Con el fin de estimular la velocidad de una reacción catalizada por enzimas, el compuesto estimulador debe causar un aumento en el paso limitante de la reacción catalítica global. Dada la multitud de enzimas y sustratos diferentes para los CYP, es probable que pueda haber limitantes de este estilo en las reacciones catalizadas por los CYP. Estos incluyen la

primer transferencia de electrones, la unión del sustrato, la unión de oxígeno, la segunda transferencia de electrones, la activación de oxígeno, la inserción del oxígeno activado en el sustrato y la liberación del producto (39). Los posibles mecanismos que incluyen efectos alostéricos en la unión del sustrato son los efectos sobre el potencial redox de los iones del grupo hemo, las alteraciones en las interacciones entre la reductasa y el CYP, el movimiento de los electrones de la enzima CYP a otro en los microsomas, alteraciones en la fluidez, la física o las características químicas de la membrana microsomal, o desestabilización del complejo enzima-producto (38).

Es interesante notar que algunos compuestos que inhiben el metabolismo microsómico de ciertos sustratos causan el estímulo marcado del metabolismo de otros. Ciertos sustratos sugeridos son los flavonoides que pueden ejercer sus efectos estimulantes sobre enzimas CYP específicas (38).

Los estudios detallados sobre CYP purificados en el sistema reconstituido han llevado a la sugerencia de que las influencias estimulantes diferentes de los xenobióticos en las enzimas CYP pueden ser debidas a la cooperatividad homotrópica o heterotrópica. La cooperatividad homotrópica es un efecto activador debido al propio sustrato, mientras que la cooperatividad heterotrópica se refiere a la situación en la que se incrementa la actividad para el metabolismo de un sustrato por la presencia de otro compuesto, a menudo referido como el efector (38).

1.1.3.2 Inhibición de los CYP's

De los pasos principales en el ciclo catalítico de los CYP's los susceptibles a la inhibición son 1) la unión del sustrato, 2) la unión de oxígeno molecular a la enzima en estado ferroso (Fe^{+2}) y 3) el paso catalítico en el que se transfiere el oxígeno activado desde el grupo hemo al sustrato (40). Estos inhibidores generalmente interfieren con la transferencia de electrones a los CYP's y por consiguiente no causan la inhibición por interacción directamente con el CYP, por lo tanto, son no específicos con respecto a las formas que inhiben CYP (38).

Los inhibidores de los CYP's se pueden dividir en tres categorías generales que difieren en sus mecanismos (40). Estos son: 1) compuestos que se unen de forma reversible, 2) compuestos que forman complejos cuasi-irreversibles con el hierro del grupo hemo protésico y 3) compuestos que se unen irreversiblemente al grupo hemo de la proteína, o que causan una unión covalente con el grupo hemo o su producto de degradación de la apoproteína. En general, los inhibidores que interfieren con el ciclo catalítico antes de la formación de activadores intermedios de oxígeno son inhibidores reversibles y los

compuestos que actúan durante o después de la formación del oxígeno activado intermedio generalmente son inhibidores irreversibles o cuasi-irreversibles (40, 41).

La inhibición reversible es la causa más común de las interacciones fármaco-fármaco, en el caso de los CYP's está es transitoria y las funciones metabólicas de la enzima regresarán a un estado normal al eliminar el inhibidor del organismo. A diferencia de los inhibidores irreversibles y cuasi-irreversibles que muestran inhibición dependiente de la dosis, del tiempo y del metabolismo de sustratos, los inhibidores reversibles sólo muestran inhibición dosis-dependiente (42). Los inhibidores reversibles relativamente potentes son los que contienen nitrógeno como los compuestos alifáticos y aromáticos.

En la inhibición reversible existe la inhibición competitiva en donde la unión del inhibidor impide la unificación del sustrato al sitio activo de la enzima. Dicho evento es debido a que el inhibidor comparte un cierto grado de similitud estructural con el sustrato (s) del CYP. La competencia del inhibidor contra el CYP para ocupar el sitio activo puede implicar simple competencia por la unión a un dominio lipófilo, a un enlace de hidrógeno o a enlaces iónicos con residuos de aminoácidos específicos en el sitio activo (40) y se observa cuando dos sustratos diferentes del mismo CYP están presentes. Esta inhibición se encuentra con relativa frecuencia en los estudios del metabolismo del fármaco utilizando preparados microsómicos o sistemas purificados de enzimas reconstituidos *in vitro* o *in vivo*. Dado que muchas de los CYP's tienen numerosos compuestos como sustratos, la competencia de varias drogas para el metabolismo de un CYP específico es una ocurrencia común que conduce a interacciones fármaco-fármaco en los pacientes en los que son administrados simultáneamente con varios medicamentos diferentes (38).

En la inhibición no competitiva, el inhibidor se une a la enzima en un lugar distinto al sitio activo y no tiene efecto sobre la unión del sustrato. Sin embargo, el complejo enzima-sustrato-inhibidor es incapaz de funcionar catalíticamente. En el caso de la inhibición incompetitiva, el inhibidor en lugar de unirse a la enzima libre, se une al complejo enzima-sustrato resultando en la formación de un complejo improductivo enzima-sustrato-inhibidor (38).

Una segunda categoría de inhibidores incluyen los compuestos que forman complejos cuasi-irreversible con el grupo hemo, estos requieren de activación catalítica dando como resultado intermedios transitorios que se coordinan muy estrechamente al grupo hemo en el sitio activo del CYP lo cual conduce a la inhibición (38). Los agentes que forman complejos de metabolitos intermedios con el grupo hemo del CYP son los compuestos alquil y las aminas (43).

Una última categoría de los inhibidores son aquellos compuestos que se unen irreversiblemente al grupo hemo o a la proteína, o que causan la unión covalente con el grupo hemo protésico o su producto de degradación de la apoproteína.

Las reacciones que dan como resultado los mecanismos de inactivación de los CYP's implican la producción de un complejo entre la enzima y el intermedio reactivo que puede entonces reaccionar con el CYP para crear un aducto covalente que darán la inactivación o se puede disociar resultando en la formación de productos y la regeneración de enzimas catalíticamente activas (38).

1.1.3.3 Inducción de los CYP's

La inducción de los CYP's puede mejorar la desintoxicación en especial cuando las concentraciones de sustrato son bajas, pero si el CYP inducido activa metabólicamente una toxina o carcinógeno puede aumentar su toxicidad o carcinogenicidad (44).

La función de un inductor es aumentar la actividad de una o más enzimas causando la elevación de las concentraciones intracelulares de estas enzimas, a menudo la amplificación del nivel de dichas proteínas es el resultado del incremento de la transcripción del gen asociado (aunque no siempre es el caso). En este tipo de casos por lo general se presenta una relación dosis-respuesta (38).

Cuando existe una modificación en los niveles basales de CYP debido a la exposición a un inductor, se presentan cambios en muchos procesos de síntesis y degradación u otros. La velocidad de síntesis de cualquier CYP es dependiente de la concentraciones de ARNm presentes. Y estas concentraciones reflejan la velocidad de transcripción del gen, así como la velocidad de degradación de ARNm (38).

Ya que la inducción de los CYP aumenta la capacidad de desintoxicación metabólica y la eliminación del cuerpo, se considera una parte importante del sistema de defensa contra la exposición a xenobióticos. Esto puede tener una variedad de consecuencias farmacológicas, incluyendo alteraciones en la eficacia de los medicamentos, las interacciones fármaco-fármaco y el aumento en la activación metabólica de procarcinógenos (38).

Los CYP que son conocidos por ser inducibles son el CYP1A1 / 2, 2A6, 2C9, 2C19, 2E1, y 3A4 (45). Debido a su importante papel en la activación metabólica de una variedad de medicamentos, productos químicos carcinógenos y otras sustancias tóxicas, la regulación de estas familias ha sido objeto de intensa investigación y estos estudios han demostrado la implicación de mecanismos de inducción múltiples (45). La inducción en los roedores ha demostrado efectos en prácticamente todos los niveles, incluido el aumento en la transcripción, la estabilización del ARNm, la acentuación de la eficiencia de la traducción y

después la estabilización de la proteína (45, 46). La inducción provoca un cambio en el nivel de las enzimas implicadas en el metabolismo de un sustrato de prueba, pero no en las identidades o las propiedades de los CYP (38).

1.2 Pruebas para la detección de antimutágenos (Sistemas para detección)

Los ensayos de mutagenicidad y antimutagenicidad son herramientas que permiten conocer estas propiedades en muchos compuestos y extractos naturales. En los últimos años se han desarrollado ensayos a corto y largo plazo que bien pueden involucrar microorganismos, virus, plantas, líneas celulares, así como sistemas que involucran al animal completo. Estos ejemplos de modelos son usados debido a la información disponible que se tiene sobre su genoma, sus mutaciones y sus procesos. Algunos organismos que se usan en el estudio de desmutagénesis y antimutagénesis (debido a que poseen las características anteriores) son virus, bacterias (*E. coli*, *Salmonella thyphimurium*), levaduras (*Saccharomyces cerevisie*), células de plantas (*Allium cepa*, *Vicia sativa*) y cultivos de sistemas celulares animales (47). De ellos los que más nos interesan son los microbianos, cultivos celulares y animales completos ya que en ellos se puede estudiar en específico los CYP`s de nuestro interés.

1.2.1 Microbianos

Dentro de estas pruebas, el ensayo bacteriano más conocido es el desarrollado por el Dr. Bruce N. Ames (48), el cual usa como modelo a *Salmonella thyphimurium*. Dicho método se ha utilizado ampliamente en la identificación de los efectos mutagénicos y antimutagénicos de muchos compuestos naturales incluyendo extractos de plantas.

Las cepas de *S. thyphimurium* mas usadas para la detección de mutágenos y antimutágenos son la TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537, TA1538 y algunas otras cepas mutantes (48, 49). Para hacer el sistema más similar a lo que ocurre en el organismo de mamíferos, se ha incluido la activación metabólica agregándoles enzimas como los CYP`s para imitar la biotransformación que puede llevarse a cabo en los animales cuando se ingieren los productos químicos.

1.2.2 Cultivos celulares

Existen otro tipo de modelos que han sido desarrollados para la identificación de compuestos protectores, como el uso de células genéticamente modificadas que expresan enzimas de fase I y II con las cuales se pueden estudiar los mecanismos de protección (50,

51). Por otro lado, existen genes que codifican para estas enzimas que han sido transfectados exitosamente, sin embargo, un inconveniente es que no se encuentran en forma inducida. Otro enfoque prometedor es el uso de células de hepatoma humano que mantiene la actividad de enzimas de fase I y II, en ellas, las enzimas presentes en forma inducible son CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, aril hidrocarburo hidroxilasa (AHH), UPDGT, y GST, por lo tanto, estas son herramientas útiles para la identificación de los compuestos protectores (52, 53). Otros ejemplos son la línea de células hepáticas Hep3B yHepG2 (54).

1.2.3 Animal completo

En los estudios de mutagenicidad y antimutagenicidad *in vivo* con roedores, las técnicas que más se usan son los ensayos de micronúcleos en médula ósea y las pruebas de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica. El uso de estos métodos se ve obstaculizado por el hecho de que son bastante insensibles a los efectos de las nitrosaminas y las aminos heterocíclicas aromáticas (AHA), por lo que no permiten realizar mediciones en los órganos que son los objetivos (55, 56, 57). Otro ensayo usado es la elución alcalina el cual permite realizar mediciones en gran variedad de órganos internos, sin embargo, la infraestructura requerida es extensa y compleja. Actualmente se están empleando ensayos cometa *in vivo* utilizando varios órganos internos y el uso de animales transgénicos en donde la detección de genes mutados permite la medición en múltiples órganos. Sin embargo, tiene la desventaja de que es caro (58, 59).

Cuando se han hecho comparaciones entre los resultados obtenidos en pruebas bacterianas respecto a los encontrados *in vivo* con roedores, es evidente que muchos de los componentes que son efectivos *in vitro* no lo son *in vivo* (60). Se concluye que en pruebas *in vitro* solo se pueden observar mecanismos que incluyen el metabolismo directo del mutágeno en estudio.

1.3 Prueba de Ames

El ensayo se basa en la reversión del genotipo his^- (auxótrofo) a his^+ (protótrofo) presente en diferentes cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* incapaces de sintetizar el aminoácido esencial histidina, por tanto, sin la posibilidad de la formación de colonias. Sin embargo, si se inducen nuevos cambios genéticos en el sitio de las mutaciones preexistentes, o en genes relacionados, se puede restaurar la funcionalidad del gen y por lo tanto permitirle la síntesis de histidina. Estas colonias mutadas pueden crecer en ausencia de histidina y formar colonias, por esta razón el ensayo también se conoce como “ensayo de mutación reversa” (61, 62).

Las cepas tienen otras características (Tabla 4.) que hacen a los microorganismos más sensibles a los mutágenos.

Tabla 4. Características de las cepas empleadas en el presente trabajo.

CEPA	GENOTIPO	EVENTO MUTACIONAL
TA98	<i>hisD3052, rfa, Δ(uvrB, chl y bio), pKM101 (Ap^r)</i>	Corrimiento de marco de lectura
TA100	<i>his G46, rfa, Δ(uvrB, chl y bio), pKM101 (Ap^r)</i>	Sustitución de pares de bases

Existen muchos agentes químicos que necesitan ser metabolizados o biotransformados por enzimas especiales para llegar a producir mutaciones (26) debido a que *S. thyphimurium* no cuenta con dichos sistemas, se tienen que utilizar homogeneizados de hígado de mamífero (fracción S9) para proporcionar las condiciones metabólicas *in vitro* requeridas por algunos compuestos químicos. Los mamíferos usados para este fin son previamente tratados con inductores (sustancias que incrementan la concentración de enzimas) de los CYP's necesarios para el metabolismo de compuestos xenobióticos. De esta forma los compuestos son transformados en intermediarios electrofílicos que pueden interactuar con macromoléculas celulares incrementando los efectos de toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad (62).

2. ANTECEDENTES

Desde el surgimiento de las civilizaciones humanas, las plantas han sido explotadas debido a sus propiedades benéficas para la salud. En la actualidad, continúan siendo ampliamente utilizadas por sus propiedades curativas y/o preventivas en la medicina tradicional (63). Adicionalmente, las plantas han sido una fuente de bioproductos útiles tanto en el tratamiento de enfermedades como en su prevención.

Los antimutágenos naturales presentes en la dieta, constituyen una opción importante como agentes quimiopreventivos contra el cáncer y otros padecimientos de riesgo, ya que la mayoría de los inhibidores de la mutagénesis provenientes de otras fuentes pueden causar efectos adversos (63).

Entre los compuestos más estudiados con la finalidad de buscar agentes quimiopreventivos, están los polifenoles que agrupan a los flavonoides (flavonoles, las flavononas, las

isoflavonas), las antocianinas, los taninos y los lignanos, muchos de los cuales se encuentran presentes en frutas, vegetales y bebidas muy populares como el té y el vino.

Los polifenoles desempeñan un importante papel en la nutrición y se ha planteado que estos compuestos tienen propiedades antioxidantes, antimutagénicas y anticarcinogénicas. Se sabe que también inhiben la producción de bisulfitos en el órgano digestivo, además de proteger y estabilizar el genoma. Sin embargo, algunos de ellos resultan mutagénicos y/o pro-oxidantes ya que intervienen en vías bioquímicas esenciales que involucran topoisomerasas y la traducción de señales (64, 65). Ciertos polifenoles pueden influir directamente modulando la expresión génica de enzimas que participan en la reparación libre de error del ADN (66). La actividad antioxidante en estos compuestos se ha asociado a su habilidad para eliminar los radicales libres y de inhibir los CYP's o enzimas con actividad oxidante como las ciclooxigenasas y las lipooxigenasas (66).

Entre los extractos en los que se ha encontrado en su composición polifenoles y se ha observado un efecto antimutagénico se tienen al de *Myrtus communis* (67), *Teucrium differs*, *Kalopanax picus* (68), el jugo de la uva (69), entre otros.

Diversos estudios han evidenciado la inducción o inhibición de enzimas que metabolizan drogas por constituyentes de extractos herbales (70, 71), consecuentemente esto incrementa los reportes de interacciones significativas ente fármaco-extracto (72).

2.1 El extracto acuoso de la corteza de *Mangifera indica* Linnaeus (MSBE)

En la actualidad, se han hecho estudios que tratan de entender las propiedades presentes en los extractos herbales utilizados dentro de la medicina tradicional. Ejemplo de ello son los trabajos realizados con el extracto acuoso de la corteza de *Mangifera indica* Linnaeus (MSBE), la cual es una variedad de mango (Anacardiaceae) que crece en regiones tropicales y subtropicales del mundo y que actualmente es usado en una gran cantidad de remedios (73).

Este extracto es consumido principalmente en Cuba y se conoce comercialmente con el nombre de Vimang®. Su uso es muy común pero actualmente se co-administra con diferentes drogas convencionales o es usado por pacientes que sufren de estrés elevado como producto nutracéutico (74, 75). El MSBE es un polvo pardo homogéneo, con un tamaño de partícula entre 30 y 60 µm, que funde con descomposición entre 215 y 218 °C. Su composición química (Tabla 4) medida por técnicas de espectroquímica han revelado que es una combinación de polifenoles (76), donde la mangiferina (MF) (una xantona glicosilada) es el compuesto mayoritario (77). Entre otros de los compuestos que integran a

este extracto también existe una gran cantidad de terpenoides, azúcares libres, ácidos grasos, polialcoholes y microelementos, que en conjunto forman el ingrediente activo (76).

Tabla 4 Composición del ingrediente activo de las formulaciones del MSBE (76)

Componente	Contenido (%)		
1. Polifenoles	40-60	3.2 Glucosa	1-3
1.1 Mangiferina	25-30	3.3 Arabinosa	1-3
1.2 (+) Catequina	7-10	4. Polialcoholes	2-5
1.3 (-) Epicatequina	4-7	4.1 Sorbitol	2-4
1.4 Ácido gálico, propil éster	2-5	4.2 Mioinositol	1-2
1.5 Ácido gálico, metil éster	2-5	4.3 Xilitol	0,5-1,0
1.6 Ácido benzoico, propil éster	2-5	5. Ácidos grasos	1-5
1.7 Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	1-3	5.1 Mirístico	0,1-3,0
1.8 Ácido benzoico	1-2	5.2 Palmítico	0,3-0,4
1.9 Ácido gálico	1-2	5.3 Linoleico	0,15-0,35
2. Terpenoides	10-20	5.4 Oleico	0,2-0,4
2.1 Ácido mangiferónico	10-15	5.5 Estearico	0,1-0,2
2.2 Beta-elemento	2-5	5.6 Eicosatrienoico	0,1-0,3
2.3 Alfa-guaieno	2-5	6. Microelementos	1-3
2.4 Aromandreno	2-5	6.1 Potasio	0,8-1,0
2.5 Hinesol	1-3	6.2 Calcio	0,2-0,4
2.6 Cicloartanoles	1-3	6.3 Magnesio	0,1-0,2
2.7 Ledol	1-2	6.4 Hierro	0,1-0,2
2.8 Taraxerol	1-2	6.5 Cobre	< 0,01
3. Azúcares libres	3-6	6.6 Zinc	< 0,01
3.1 Galactosa	2-5	6.7 Selenio	0,03-0,08

Entre las propiedades que se le atribuyen es posible mencionar que es un anti-inflamatorio, regenerativo, analgésico, antígenotóxico y modulador inmune en diferentes modelos experimentales, además se ha mostrado que tiene efecto antioxidante potente tanto *in vitro* como *in vivo* (78-88). También manifiesta protección después de la inducción de la activación de células T en seres humanos (89, 90), inhibe la generación y migración de eosinófilos (91), la inhibición y producción de IgG (92) y efecto antialérgico (93, 94).

Los estudios actuales de este extracto se están enfocando en los efectos benéficos o adversos que surgen de la exposición a este producto en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, centrándose en las propiedades antígenotóxicas, antioxidantes y antimutagénicas que se le atribuyen.

En los estudios hechos *in vitro* se encontró que el MSBE presenta efecto sobre la frecuencia de roturas de la cadena del ADN en leucocitos murinos tratados con bleomicina,

observando que el extracto protege del daño genotóxico inducido por dicho compuesto. Su acción parece estar más vinculada con su actividad antioxidante al captar radicales libres, y no con la inducción de la actividad de enzimas antioxidantes o desintoxicadoras (88).

En otro trabajo donde se buscó la actividad antioxidante del MSBE se concluyó que éste muestra una capacidad fuerte contra el estrés oxidante inducido por t-butilo, que es un inductor de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS). En los hepatocitos en cultivo pre-tratados con MSBE antes del tratamiento con t-butil-hidroperóxido se observó una marcada inhibición de la peroxidación lipídica y la preservación de los niveles intracelulares de GSH, tanto de la dosis y tiempo dependiente. Por lo que se plantea que el MSBE tiene efectos antioxidantes y es secuestrador de EROs (78, 79, 80).

Por otro lado, Remírez et al. (87) demostraron que el MSBE no fue citotóxico para hepatocitos aislados de rata hasta 100 µg / mL. Los resultados apuntan a un potencial citotóxico muy bajo de Vimang, pues se produjo un efecto después de 24 h de exposición a concentraciones muy altas del extracto y citotoxicidad muy moderada sólo después de un tiempo de exposición a concentraciones más altas (500 y 1000 µg / mL).

Siguiendo con los trabajos anteriores, en otra publicación se analizó el efecto hepatoprotector del MSBE sobre el daño oxidante inducido por sustancias tóxicas (terc-butil hidroperóxido, etanol, tetracloruro de carbono y lipopolisacárido) en cultivos de hepatocitos de rata. Los resultados muestran que el MSBE exhibió un alto efecto citoprotector. También se analizaron las propiedades antioxidantes del MSBE contra la peroxidación lipídica y el agotamiento de GSH inducida por terc-butil hidroperóxido. Los resultados indica que se inhibió la peroxidación lipídica y se aumentó el nivel de GSH reducido por el agente tóxico. En conclusión se vio que el MSBE mostró actividad hepatoprotectora contra el daño inducido en toda la serie experimental, este efecto hepatoprotector encontrado podría estar asociado con las propiedades antioxidantes observadas (95).

Para el caso de la actividad genotóxica, el MSBE se evaluó en la prueba de Ames, prueba cometa y micronúcleos. Donde los resultados mostraron mutagenicidad (Ames) y actividad clastogénica (micronúcleos) negativa (96). Lo observado permiten afirmar que el MSBE no aumenta la frecuencia de mutaciones reversas en la prueba de Ames, en presencia o no de activación metabólica, en el ensayo cometa el extracto no indujo roturas de cadena simple o de los sitios álcali-lábiles en los linfocitos de sangre periférica y en la prueba de micronúcleos (*in vitro e in vivo*) el MSBE no aumentó la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas de linfocitos ni en células de médula ósea (96). También se encontró que el MSBE cuenta con actividad antiproliferativa observada al no encontrar citotoxicidad en hígado (ensayo cometa) en comparación a un efecto similar observado en hueso, lo que sugiere que probablemente este efecto está relacionado con la actividad proliferativa del

extracto. Los resultados son consistentes con los reportes previos de citotoxicidad *in vitro* en ensayos de micronúcleos de linfocitos (96).

En cuanto a la actividad de desintoxicación se sabe que los CYP's son los encargados de esto y es de sumo interés conocer el efecto potencial del MSBE, en el sistema P450 en particular pues son los responsable del sistema de metabolismo oxidante de xenobióticos (97). Las consecuencias directas de cualquier efecto inductor o inhibidor en enzimas que metabolizan drogas podría ser la aparición de una respuesta farmacológica alterada, efectos tóxicos o interacciones droga-droga (98). Por ello, Rodeiro et al. (97) hicieron estudios *in vitro* y encontraron que el MSBE reduce en más del 60% la actividad de la 7-metoxiresorufina-O-demetilasa (MROD; CYP1A2) lo que reportaría una modulación en la actividad de los CYP's o puede ser debido a una reducción de los niveles de CYP1A2 inducidas por Vimang o una interacción directa de cualquier componente (s) del extracto con la función catalítica de la enzima. La marcada disminución de la actividad del CYP1A2 dependiente de la concentración de Vimang observada en los hepatocitos poco incubados con el extracto se explica por interferencia directa en el nivel de actividad. Sin embargo, una baja regulación de la enzima no se puede descartar.

Siguiendo esta línea Rodeiro et al. (99) demostraron que usando cultivos de hepatocitos, el MSBE presenta un efecto inhibidor de la actividad enzimática del CYP1A1 y CYP1A2, un efecto inductor de la actividad en los CYP2B1 mientras que los CYP3A1 y CYP2C6 no presentaron algún cambio. El hecho de que se observara una marcada inhibición de los CYP1A2 y 2E podría explicar las propiedades atribuidas a la quimioprotección, ya que estas enzimas participan en la bioactivación de mutágenos y cancerígenos (99).

Obtenidos los datos anteriores *in vitro* se continuó con experimentos donde se obtuvieron datos como los de González et al (100) en los que se evaluó el desarrollo de toxicidad durante la organogénesis, daño primario en ADN y actividad clastogénica y/o disrupción en el aparato mitótico, sitios lábiles alcalinos en células del hígado y en micronúcleos en eritrocitos policromáticos en huesos. Lo que demostró que no es teratogénico (debajo de 2000 mg/kg tuvo resultados negativos en todos los casos).

En otro trabajo, se evaluó la toxicidad del MSBE en ratas y ratones vía oral, dérmica e intraperitoneal, se probó que no fue irritante, ni tóxico en administraciones agudas y subcrónicas, lo que se encontró fue letalidad hasta los 2000 mg/kg vía oral y dérmica, 200 mg/kg vía intraperitoneal en administraciones subcrónicas, mientras que la LD50 vía oral aguda es de 5000 mg/kg (101).

En estudios previos se observó que el MSBE reduce las oxidaciones catalizadas por CYP1A2 y afectando otros P450 (96) y también se sabe que la correspondiente inhibición *in vitro* del P450, no conduce necesariamente a los correspondientes efectos *in vivo* (98),

por lo que se usaron enzimas P450 humanas (102) y ante ello se encontró que MSBE disminuye la actividad de CYP1A1/2 y 3A4 de humanos, lo que sugiere que este extracto inhibe las enzimas humanas P450 involucradas en el metabolismo de las drogas y pueden reducir la interacción potencial del extracto-droga. En este mismo trabajo se mostró la inhibición del CYP1A1/2 usando microsomas de hígado humano. Observando esto se puede comparar con los estudios previos en hepatocitos de rata en los que se notó que el MSBE reduce la oxidación catalizada por el CYP1A2, sin afectar a otros P450 (102).

Muchos estudios han evidenciado la inducción o inhibición de enzimas que metabolizan drogas por los constituyentes herbales (103, 104), consecuentemente estos son reportes que confirman la relevancia de las interacciones extracto-droga o enzima-fármaco (105) pues al ser un producto consumido con otros fármacos es indispensable probar si afecta de alguna forma el metabolismo o las interacciones mencionadas dentro de las células. Se sabe que el CYP1A activa metabólicamente un número de procarcinógenos lo que sugiere la hipótesis de que su inhibición puede estar involucrada en la prevención de transformaciones malignas (106) mediante la reducción de la formación de carcinógenos a través de la inhibición de la CYP1A1/2 (107-111). Por otro lado, la asociación de la exposición dietética a los flavonoides puede contribuir a la variación interindividual en la farmacocinética y las respuestas farmacológicas observadas para los medicamentos como la fenacetina, cafeína, teofilina y propranolol, que son sustratos de CYP1A2 (112, 113), así como para fármacos que son sustratos de otros P450.

La inhibición de P450 por el MSBE se puede atribuir al alto contenido de compuestos polifenólicos (cerca del 45%) donde la mangiferina es el principal polifenol bioactivo (76). Respecto a este compuesto se ha encontrado que puede ser el responsable de proteger contra la formación de aductos en el ADN y en consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos (96). También es un potente hepatoprotector, efecto atribuido su actividad antioxidante (95). Produce una inhibición dos veces más alta de la actividad de CYP2B1 y CYP1A2 y de la inhibición de la actividad de CYP3A1, 2C6, 2E1, por lo que estos datos nos muestran que la mangiferina participa en las propiedades benéficas del extracto.

Por lo tanto, es posible decir que los polifenoles que integran este compuesto pueden ser los responsables de su capacidad antimutagénica, debido a que estos elementos cuentan con un alto potencial para inhibir o modular las enzimas de fase I *in vitro* (96).

De hecho Muto *et al.* (114) mostró que las catequinas inhiben los P450 humanos como el CYP1A1/2. Algunas catequinas (ejemplo (+)-catequina, (-)-epicatequinas) han sido identificadas en el MSBE. Esto sugiere que el efecto del MSBE en P450 puede no solo ser atribuido a la acción de un simple compuesto, sino mas bien a la combinación de la acción de diferentes constituyentes y/o metabolitos (99). Este es el primer estudio sobre los

posibles efectos de este extracto en los CYP's y los resultados obtenidos podría estar relacionado con su alto contenido de flavonoides, moléculas que se reconoce que tiene la capacidad de incapacitar a los inhibidores de CYP1A1/2 (115). El consumo de estos extractos puede conducir a una interacción extracto-droga con consecuencias clínicas. Además de que la inhibición de CYP1A2 puede estar asociada con el incremento de riesgo carcinogénico.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el estudio del efecto protector y antimutagénico de los constituyentes aislados de algunos extractos de plantas ha cobrado gran relevancia debido a las evidencias que atribuyen dichas propiedades a la capacidad que tienen para atrapar radicales libres (116), o bien, a su facultad de inhibir o modular las enzimas de fase I conocidas como CYP's involucradas en el metabolismo de xenobióticos (96). En este sentido, las plantas han mostrado estas facultades debido a los componentes activos que presentan en su configuración; entre estos bien se pueden mencionar los polifenoles que se comportan como inhibidores de los CYP dentro de los organismos. Es por ello que siguiendo con la línea de investigación se pretende probar el potencial antimutagénico del MSBE y la mangiferina (polifenol mayoritario) en la Prueba de Ames usando S9 de ratas tratadas con compuestos que inducen los CYP's (que Rodeiro *et al.* (99, 102) observaron se modificaban en presencia del MSBE y/o la mangiferina en hepatocitos y CYP's humanos), y adicionalmente usando mutágenos que se sabe provocan algún tipo de mutación se observará si de alguna manera el extracto protege del daño. Adicionalmente se explorará si es la inhibición de la actividad de los CYP's la responsable de dicha propiedad.

4. HIPOTESIS

El MSBE y la Mangiferina presentan un efecto antimutagénico en la prueba de Ames

5. OBJETIVO

- Probar la capacidad antimutagénica del MSBE y de su componente mayoritario (la mangiferina) mediante la prueba de Ames, usando las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella thyphimurium* y los mutágenos B[a]P y NPYR, respectivamente.
- Explorar el posible mecanismo de antimutagénesis a través de la inhibición de la actividad de los citocromos P450 1A1 y 1A2

6. MATERIAL Y METODOLOGIA

6.1 Reactivos

Nicotinamida adenina dicleotido fosfato (β -NADP), benzo[a]pireno (B[a]P), N-nitrosopirrolidina (NPYR), glucosa-6 fosfato (C6P), nicotinamida adenina dicleotido fosfato en su forma reducida (NADPH), resorufina, etoxiresorufina (EROD), metoxiresorufina (MROD), se adquirieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis MO, USA). El ciclohexanol (CH), cloruro de potasio (KCl) y cloruro de magnesio ($MgCl_2$) se obtuvieron de J.T. Baker Inc (Phillipsburg, NJ, USA). El dimetilsulfóxido (DMSO) lo proporcionó Merck Kga, Darmstadt, Germany.

6.2 Extracto herbal

Los compuestos usados en este trabajo fueron donados por la Dra. Idania Rodeiro del Instituto de Ecología y Sistemática del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, La Habana, Cuba.

La corteza de mango (*Mangifera Indica L.*) fue recogida de un campo de cultivo ubicado en la región de Pinar del Río, Cuba. Los especímenes de referencia (Código: 41722) están depositados en el Herbario de la Académica de Ciencias del Instituto de Ecología y Sistemática del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, La Habana, Cuba. El extracto de la corteza del tallo de *M. indica* (MSBE) fue preparado por cocción durante 1 h, se concentró por evaporación y se secó para obtener un polvo fino color marrón, que funde a 210-215 °C, con descomposición. La mangiferina (1, 3, 6,7 – tetrahidroxi xantona -C2- β -D-glucósido) fue aislada por medio de una extracción con metanol al 90% de pureza y liofilizado para fines de conservación. La composición química de estos productos se obtuvo utilizando métodos cromatográficos, espectrometría de masas y espectrofotometría UV-vis (76). Los extractos fueron disueltos en DMSO o agua destilada para los estudios.

6.3 Animales

Se utilizaron 6 ratas machos de la cepa Wistar de peso corporal entre 200 y 250 g, con las cuales se formaron dos grupos de tratamiento compuestos de la siguiente forma; al primer grupo integrado por cinco animales se les administró CH en el agua de bebida (25% v/v) *at libitum* por 5 días para la inducir en el hígado los citocromos 2E1 (117) y el segundo grupo

compuesto por un solo individuo fue el control al cual se les dispuso de agua simple por los 5 días que duró el tratamiento. El sacrificio se realizó por dislocación cervical.

6.4 Obtención de las fracciones S9 y microsómica

Para la obtención de la fracción S9 se siguió el método de Maron y Ames (118). Una vez sacrificados los animales se les extrajo el hígado y se lavaron con agua estéril de tal forma que se eliminara la mayor cantidad de hemoglobina, posteriormente se pusieron en una solución KCl 0.15 M (4 °C) a una proporción de 3 mL/g de peso de hígado el cual se corta en trozos pequeños y se homogeneizan los hígados para después centrifugar a 9,000 g durante 10 minutos con lo que se obtuvo la fracción S9 que se almacenó en alícuotas a -70° C. El hígado de la rata control se procesó de igual forma.

La obtención de los microsomas se realizó de la siguiente manera; de la fracción S9 ya obtenida se tomó una parte y se volvió a centrifugar a 100 000 x g por 1 h a 4 °C, se recuperó el botón y se homogeneizó en un amortiguador fosfato-potasio (100 mM pH 7.4, 4 °C) con sacarosa 0.32 M, se volvió a centrifugar a las mismas condiciones y finalmente se recuperó el botón, el cual se homogeneizó en un amortiguador fosfato-potasio 100 mM pH 7.4 (EDTA 1 mM + DTT 0.1mM + glicerol 20% v/v). La fracción microsómica resultante se almacenó en alícuotas a -70 °C. La concentración de proteína se midió por el método de Bradford (119) utilizando el reactivo para ensayo de proteína de BioRad.

Con la fracción S9 se realizaron ensayos de mutagenicidad y antimutagenicidad según el método de Maron y Ames (118) y con la fracción microsómica se hicieron pruebas de inhibición de la actividad enzimática (O-desalquilación de alkoxi-resorufinas (AROD)).

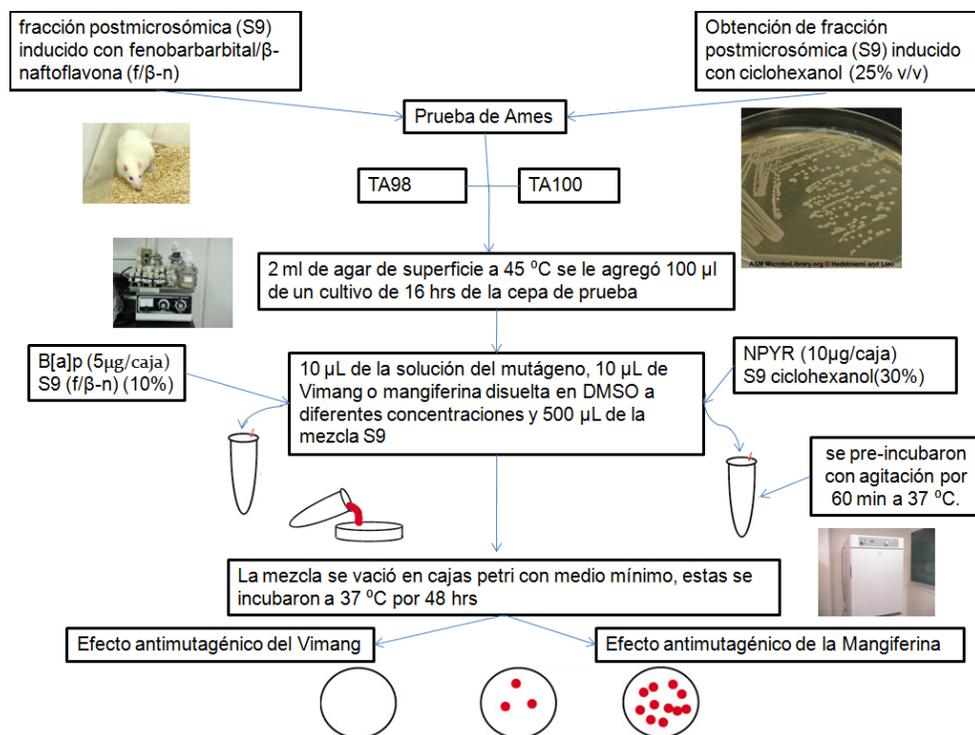
6.5 Ensayos de mutagenicidad

Las cepas de *S. thyphimurium* que se usaron para estas pruebas fueron la TA98 y la TA100, donadas por el Dr. B.N. Ames de la Universidad de California de Berkeley, C.A, USA. Los promutágenos analizados fueron B[a]P (metabolizado por CYP1A) y NPYR (metabolizado por CYP2E1), respectivamente.

Se siguió el método de Maron y Ames (118) con ciertas modificaciones; a un tubo estéril con 2 ml de agar de superficie a 45 °C se le agregó 0.1mL del cultivo incubado por 16 h de las cepas mencionadas, 0.01 mL de la solución de mutágeno (B[a]P [5µg/caja] o NPYR [10µg/caja]), 0.1 mL de MSBE o mangiferina disuelta en DMSO (TA98) o en agua (TA100) a diferentes concentraciones (200, 500, 750 µg/caja) y 0.5 mL de la mezcla S9 (10% del inducido con fenobarbital/ β -naftoflavona proporcionada por el Dr. Javier Espinosa o 30% del inducido con ciclohexanol de la fracción S9, MgCl₂ 8 mM, KCl 33 mM, NADP 4 mM, glucosa-6-fosfato 5 mM y amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7.4).

La mezcla se vació en cajas petri con medio mínimo de Vogel-Bonner y después de solidificar el medio se incubaron a 37 °C por 48 h. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se observó el crecimiento de las colonias, después de dicho tiempo se contaron las revertantes.

Para la NPYR se realizó una modificación de acuerdo a Yahagi *et al.* (120) que consistió en pre incubar durante 60 minutos la mezcla de reacción a 37 °C, antes de ser incorporada al medio mínimo. La incubación se hizo en un amortiguador de fosfatos con un pH 6.5.



Por último, se graficó el número de revertantes tanto para el MSBE como para la mangiferina y se calculó el porcentaje de inhibición de la mutagenicidad con la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - (N_t / N_c)) * 100$$

Donde N_t = el número de colonias revertantes observadas por tratamiento (extracto con mutágeno) y N_c = el número de colonias en el tratamiento sólo con el mutágeno.

También se obtuvo la pendiente que es la potencia antimutagénica expresándose como el número de mutantes por µg de antimutágeno.

6.6 Determinación de las actividades de O-Desalquilación de alkoressorrufina (AROD) (121, 122).

Para cuantificar la actividad de los citocromos 1A se utilizó la capacidad de O-desalquilación de estas enzimas usando los sustratos etoxi-resorrufina (EROD) y metoxi-resorrufina (MEROD) para el CYP1A1 y CYP1A2, respectivamente. Las reacciones resultantes dieron como producto resorrufina la cual es posible cuantificar por fluorescencia.

En primer lugar se realizó una curva patrón de resorrufina en donde se evaluaron las siguientes concentraciones: 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 pmoles/mL, que sirvieron para determinar las concentraciones de producto formado.

Las reacciones enzimáticas se hicieron de la siguiente forma: en una celda de cuarzo para fluorimetría se mezcló la solución amortiguadora de Tris-HCL 50mM y MgCl₂ 25mM a pH 7.6, el sustrato específico (10 µL de EROD 50 µM o 20 µL MROD 0.5 mM) disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO), la proteína microsómica (10 µL a 0.05mg o 10 µL a 0.1mg respectivamente) y el inhibidor (MSBE o mangiferina), dando un volumen final de 1mL. La mezcla se incubó a 37°C durante 3 minutos y se inició la reacción agregando NADPH 500µM (10µL de una solución 50 mM en amortiguador Tris-HCl a pH 7.6). La cinética de aparición de resorrufina se evaluó cada 10 segundos durante 3 min a 37 °C en un fluorometro Versa Fluor de Bio Rad. La medición se hizo a una longitud de onda de excitación de 530 nm y 285 nm de emisión (123). Se realizaron por triplicado y los resultados se expresan en pmoles de resorrufina/min/mg de proteína.

Previamente se probó que la turbidez o alguna propiedad de los inhibidores no interfirieran con la fluorescencia de la resorrufina, pues esto podría modificar los resultados, por ello, se elaboraron curvas patrón de resorrufina en presencia de cada inhibidor. Los resultados (Apéndice) muestran que MSBE no afecta la curva patrón de resorrufina, por lo tanto no interfiere en los resultados, mientras que la mangiferina sí modifica la curva patrón en concentraciones muy altas, sin embargo al analizar los resultados éstos fueron significativos aun quitando la interferencia.

6.7 Análisis de datos

Para comparar los datos entre grupos y entre tratamientos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y un test de rangos múltiples Dunnett utilizando el programa STATGRAPHICS Plus.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto mutagénico y antimutagénico del MSBE

Lo primero que se hizo fue investigar si el MSBE por si solo es mutagénico en alguna de las concentraciones probadas y en cualquiera de las cepas utilizadas, con o sin su respectiva S9 (Figuras 2-5). Los resultados muestran que, a las concentraciones utilizadas, el MSBE no provocó un aumento en el número de revertantes de las cepas TA98 o TA100 en presencia o ausencia del S9.

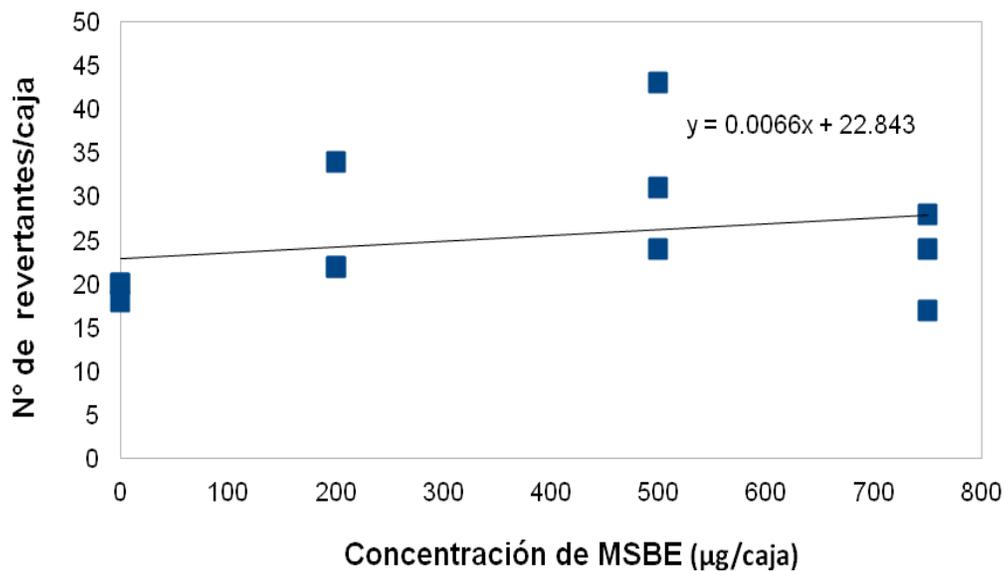


Figura 2. Efecto mutagénico del MSBE en la cepa TA98 de *Salmonella thyphimurium*, sin activación metabólica

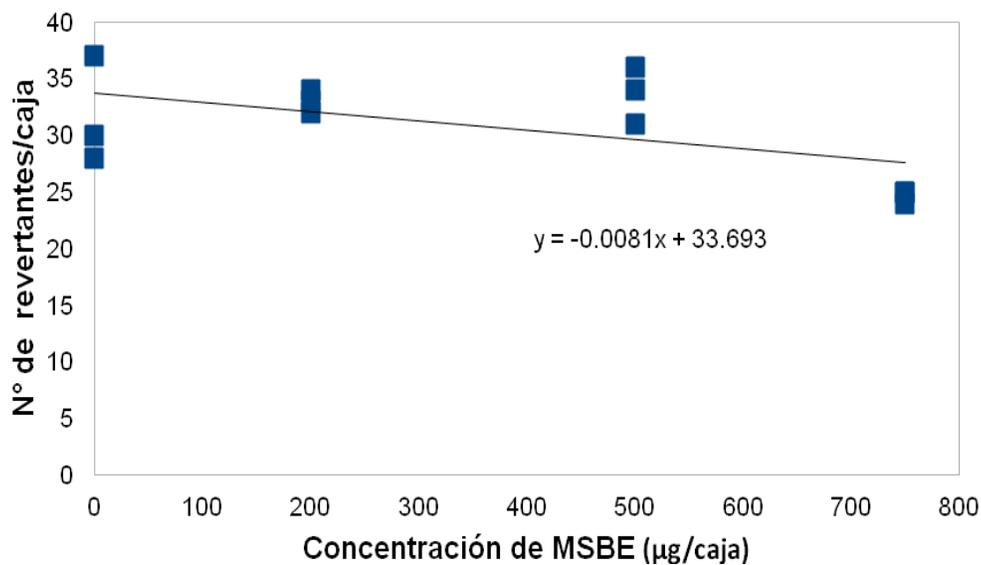


Figura 3. Efecto mutagénico del MSBE en la cepa TA98 de *Salmonella thyphimurium*, con activación metabólica

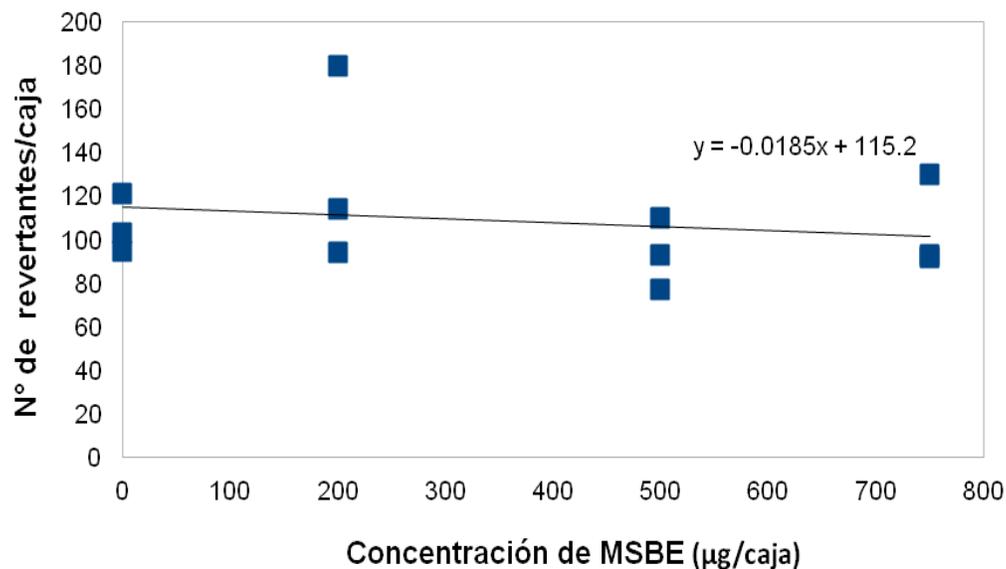


Figura 4. Efecto mutagénico del MSBE en la cepa TA100 de *Salmonella thyphimurium*, sin activación metabólica

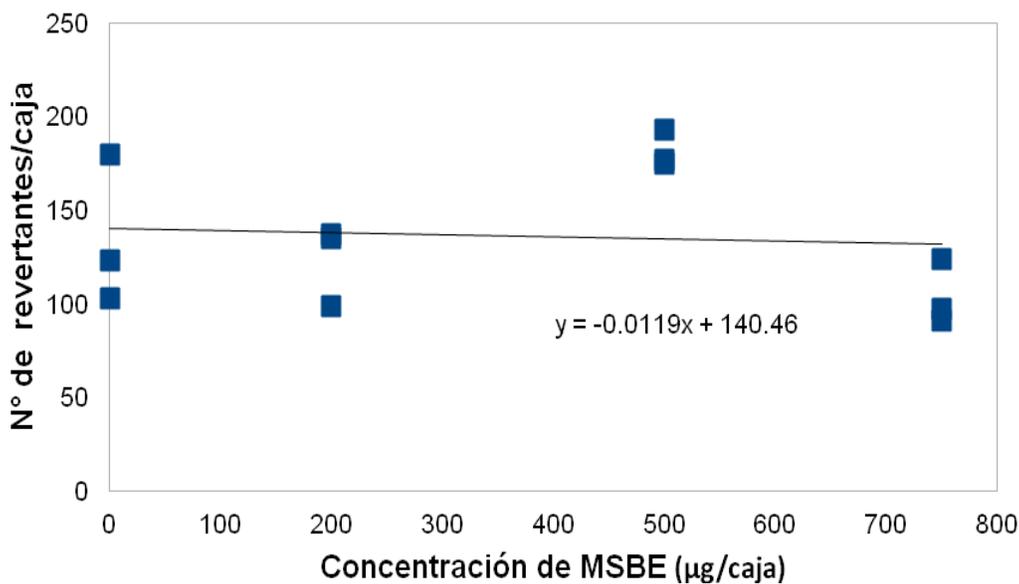


Figura 5. Efecto mutagénico del MSBE en la cepa TA100 de *Salmonella thyphimurium*, con activación metabólica

Tomando en cuenta los resultados negativos obtenidos en el primer experimento, el siguiente paso fue investigar el efecto antimutagénico de diferentes concentraciones de MSBE al momento de exponer a la cepa al B[a]P o la NPYR. Los resultados muestran que en los dos casos se recobraron menos mutantes conforme aumentó la concentración del MSBE (Figuras 6 y 7).

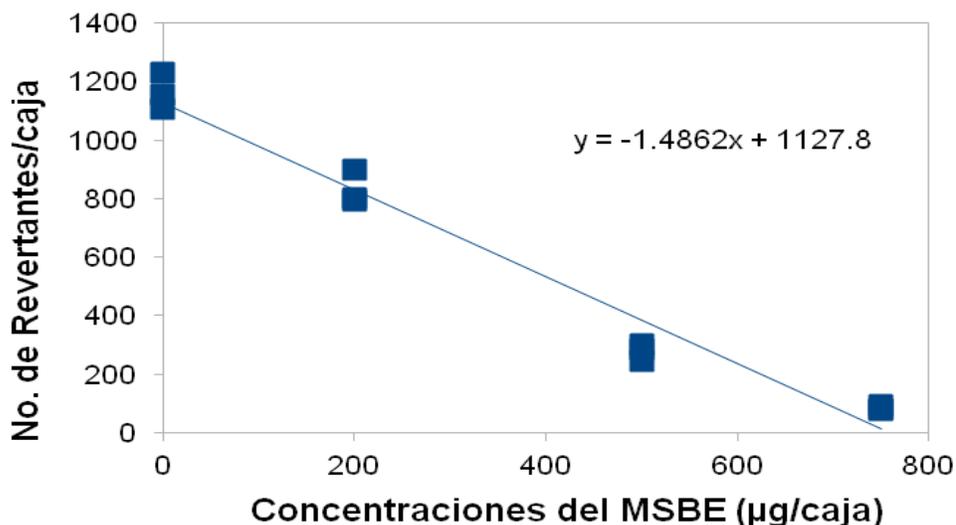


Figura 6. Efecto antimutagénico del MSBE en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*, usando como mutágeno B[a]P (5µg/10µL).

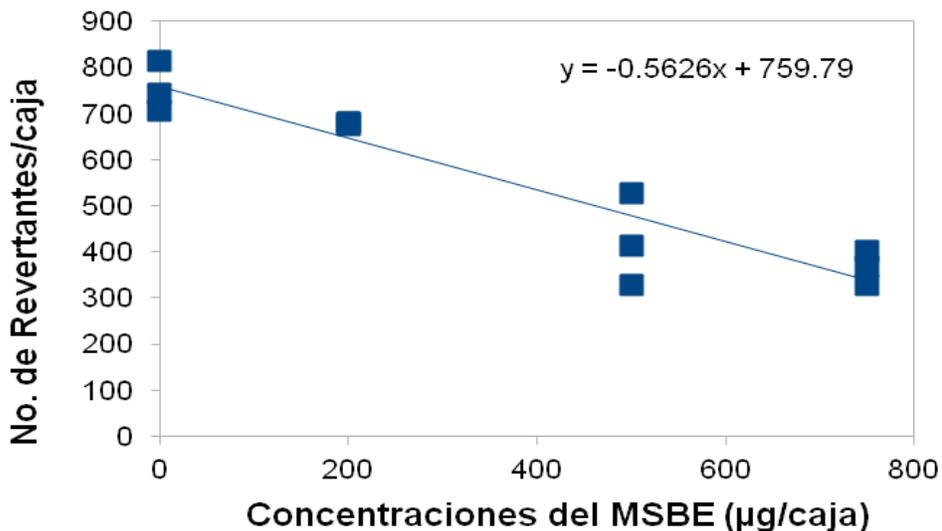


Figura 7. Efecto antimutagénico del MSBE en la TA100 de *Salmonella typhimurium*, usando como mutágeno NYPR (10µg/10µL)

Para una mejor comprensión de los resultados, estos se colocaron en una tabla (Tabla 5) y posteriormente se obtuvo el porcentaje de inhibición de cada tratamiento (Tabla 6) en donde se puede observar que a concentraciones altas del MSBE éste disminuye más de un 50% la cantidad de colonias mutantes.

Tabla 5. Resultados observados con el extracto de *Mangiferina indica* L. (MSBE) en la prueba de Ames. (Media \pm DS).

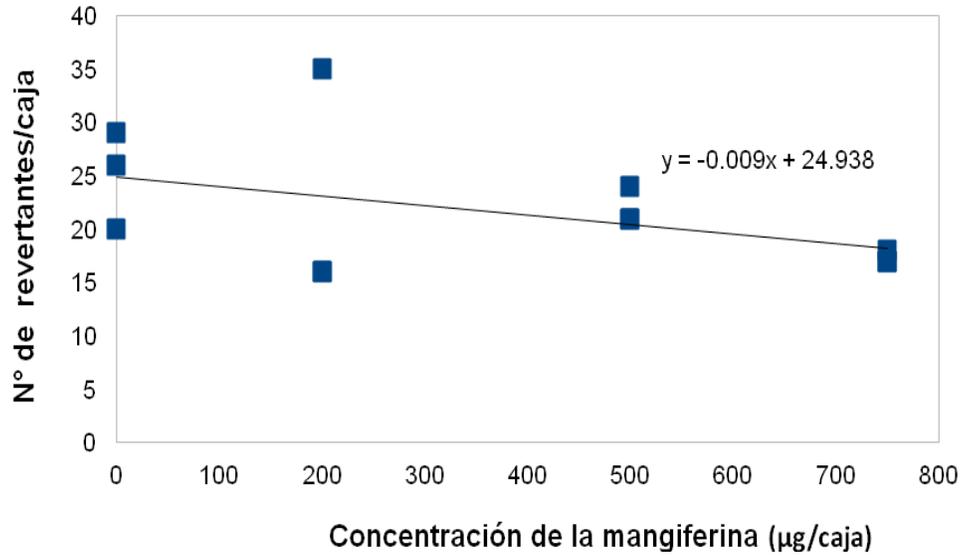
Cepa	S9	Control	MSBE			B[a]P (5 μ g/caja)	NPYR (10 μ g/ caja)
			200	500	750		
TA98	-	31.67 \pm 4.73	33.00 \pm 1.00	33.67 \pm 2.52	24.67 \pm 0.58		
	+	34.67 \pm 7.02	831 \pm 59.86	278.33 \pm 29.57	84 \pm 9.64	1163 \pm 62.98	
TA100	-	106.33 \pm 13.32	123.67 \pm 21.39	181.67 \pm 9.87	104 \pm 17.58		
	+	135.33 \pm 39.95	679 \pm 2.65	423 \pm 99.95	366.33 \pm 36.07		755 \pm 54.99

Tabla 6. Porcentaje de inhibición por tratamiento

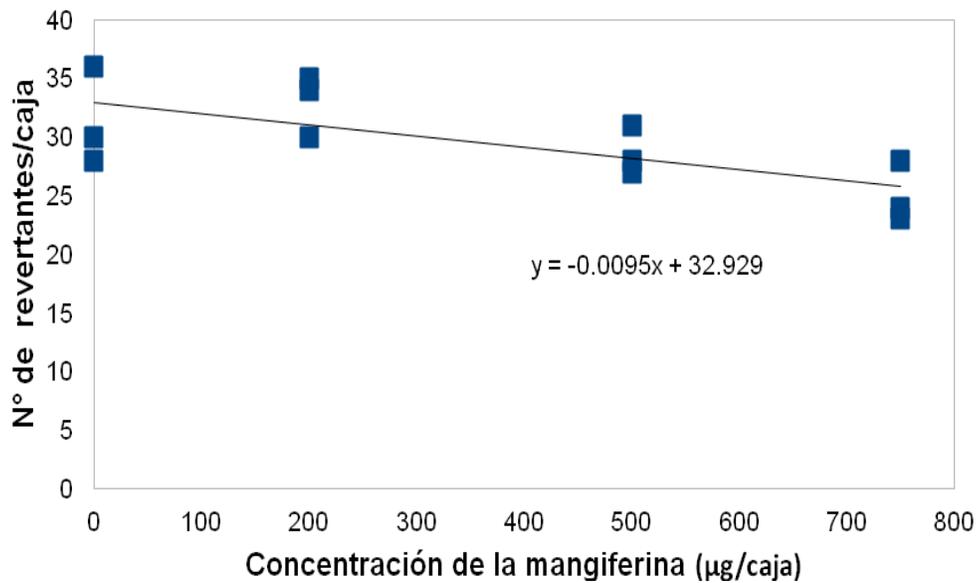
Tratamiento	% de Inhibición	
	B[a]P	NPYR
MSBE 200	28.54	10.06
MSBE 500	76.06	43.97
MSBE 750	92.77	51.47

7.2 Efecto mutagénico y antimutagénico de la mangiferina

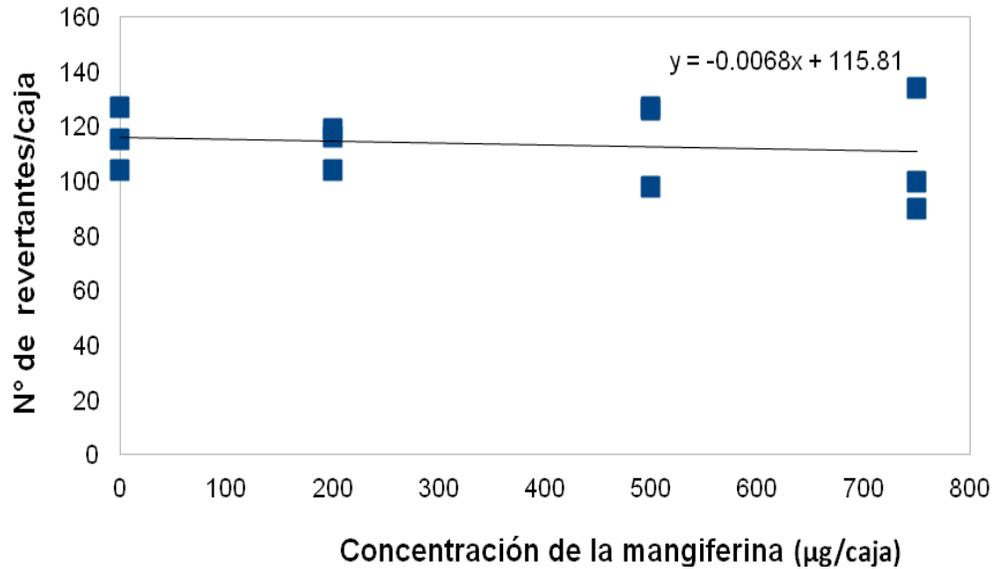
Al igual que con el MSBE, en el caso de la mangiferina primero se probó si a las concentraciones usadas tenían un efecto mutagénico para las cepas de prueba. Los resultados muestran que, a las concentraciones utilizadas, la mangiferina no provocó aumento en el número de revertantes de las cepas TA98 o TA100 en presencia o ausencia del S9 (Figuras 8-11).



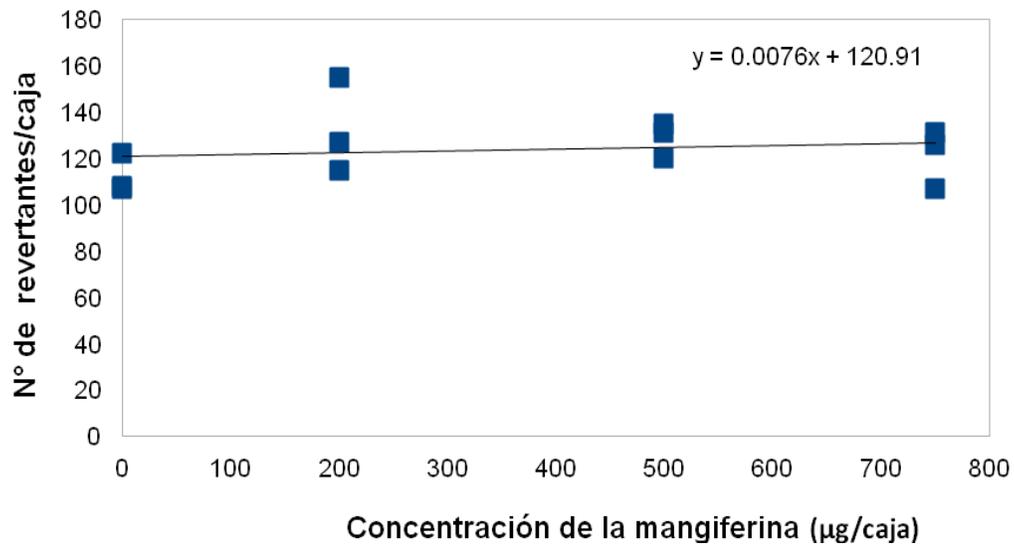
Figuras 8. Efecto mutagénico de la mangiferina en la cepa TA98 de *Salmonella thyphimurium*, sin activación metabólica.



Figuras 9. Efecto mutagénico de la mangiferina en la cepa TA98 de *Salmonella thyphimurium*, con activación metabólica.



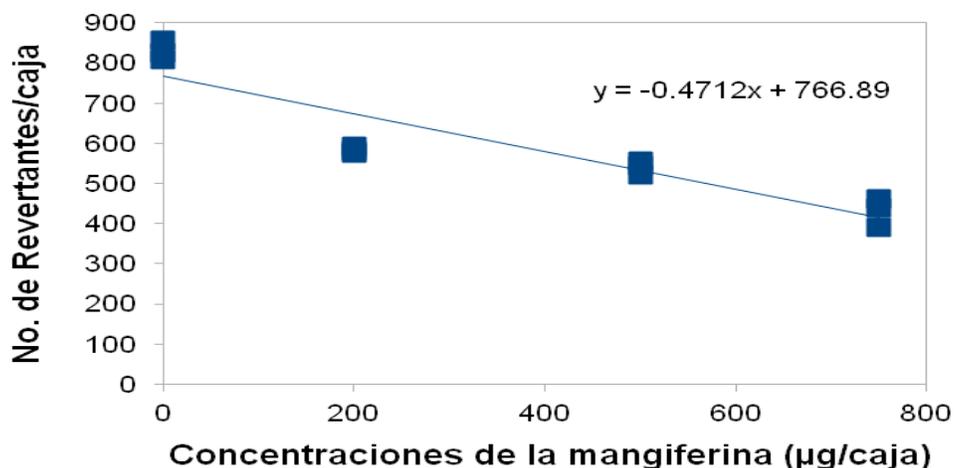
Figuras 10. Efecto mutagénico de la mangiferina en la cepa TA100 de *Salmonella thyphimurium*, sin activación metabólica.



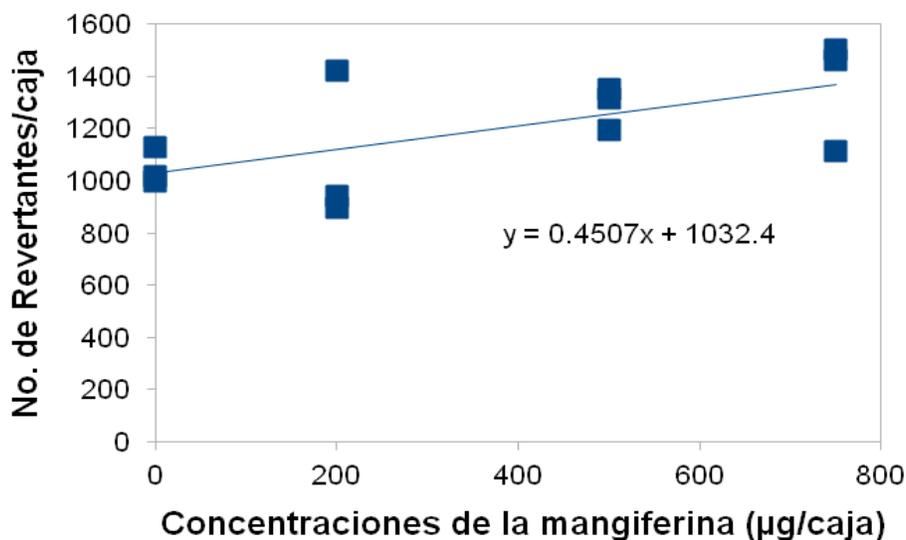
Figuras 11. Efecto mutagénico de la mangiferina en la cepa TA100 de *Salmonella thyphimurium*, con activación metabólica.

Puesto que la mangiferina no presentó efecto mutagénico, se procedió a realizar los ensayos de antimutagenicidad utilizando los mismos mutágenos usados con el MSBE. Se observó con el B[a]P una disminución en el número de colonias revertantes proporcional a la

concentración de la mangiferina, aunque en este caso la disminución no fue tan pronunciada como con el MSBE (Figura 12). Por otro lado, usando la NPYR no se obtuvo una disminución del número de mutantes, sino un ligero aumento (Figura 13).



Figuras 12. Efecto antimutagénico de la mangiferina en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*, usando como mutágeno B[a]P (5µg/10µL).



Figuras 13. Efecto antimutagénico de la mangiferina en la TA100 de *Salmonella typhimurium*, usando como mutágeno NYPR (10µg/10µL)

Para observar mejor los resultados obtenidos en cada experimento con la mangiferina, estos se colocaron en una tabla (Tabla 7) y posteriormente se sacó el porcentaje de inhibición por tratamiento (Tabla 8). Se observa que el porcentaje de inhibición con el B[a]P no llega a más del 50% de inhibición a la concentración más elevada, por otro lado, no se observó antimutagénesis cuando se usó NPYR como mutágeno.

Tabla 7. Resultados observados con la Mangiferina en la prueba de Ames. (Media \pm DS).

Cepa	S9	Control	Mangiferina			B[a]P (5 μ g/caja)	NPYR (10 μ g/ caja)
			200	500	750		
TA98	-	25.00 \pm 4.58	33 \pm 2.65	28.67 \pm 2.08	25 \pm 2.65		
	+	31.33 \pm 4.16	582.33 \pm 9.07	540.67 \pm 17.90	431.33 \pm 35.80	830 \pm 24.25	
TA100	-	115.33 \pm 1.50	132.33 \pm 20.53	128.67 \pm 7.77	121.33 \pm 12.66		
	+	112.33 \pm 8.39	1085.33 \pm 290.66	1286.67 \pm 80.56	1361 \pm 213.98		1050 \pm 70

Tabla 8. Porcentaje de inhibición por tratamiento

Tratamiento	% de Inhibición	
	B[a]P	NPYR
Mangiferina 200	29.83	-3.36
Mangiferina 500	34.85	-22.54
Mangiferina 750	48.03	-29.61

7.3 Determinación del efecto del MSBE sobre la actividad de CYP

Observando los resultados obtenidos en la prueba de Ames, el siguiente punto a investigar fue conocer si la inhibición de los CYP's es el posible mecanismo de acción por el cual el MSBE tiene la propiedad de tener efecto antimutagénico.

Para ello, se analizó la inhibición de la actividad de los CYP1A1 y 1A2 con diferentes concentraciones de MSBE usando el método de EROD y MROD, respectivamente los cuales son sustratos de estos CYP's.

Los resultados muestran que la cantidad de resorrufina producida en presencia de varias concentraciones de MSBE se vio afectada. En el caso del ensayo con CYP1A1 se encontró que la resorrufina fue disminuyendo conforme aumentaba la concentración del MSBE (Figura 14), mientras que en el ensayo con los CYP1A2 se muestra un aumento en la cantidad de resorrufina conforme se aumentaron las concentraciones de MSBE hasta 10 μg (Figura 15).

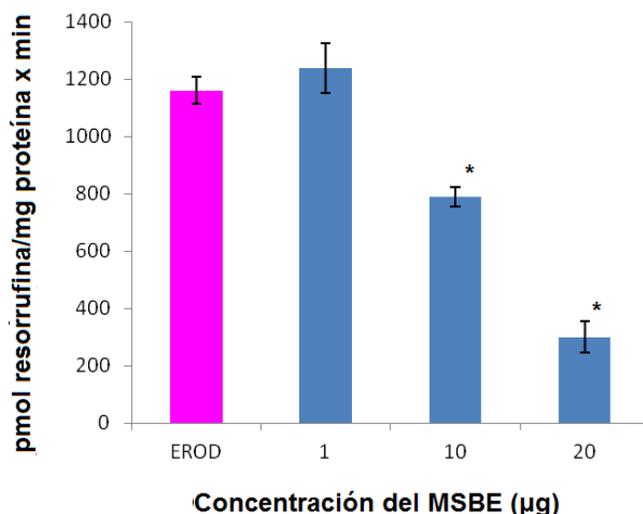


Figura 14. Efecto del MSBE sobre la actividad de CYP1A1. *Diferencia significativa respecto al control

Para la inhibición de la actividad de CYP1A1 por el MSBE se realizó un ANOVA de una vía que mostró diferencias significativas entre los grupos. El análisis post hoc de Dunnet mostró que las diferencias significativas eran entre el grupo control y el que tenía MSBE a concentración de 10 μg asimismo hubo diferencias significativas entre el control y el que tenía un concentración de 20 μg . No hubo diferencias entre el control y la concentración de 1 μg de MSBE (Figura 14).

Por otro lado, para la inhibición de la actividad del CYP1A2 se realizó una ANOVA de una vía que mostró diferencias significativas entre los grupos. Posteriormente, se hizo un análisis post hoc de Dunnet que mostró diferencias significativas del control respecto a las concentraciones de [1, 10 y 20 μg] de MSBE (Figura 15).

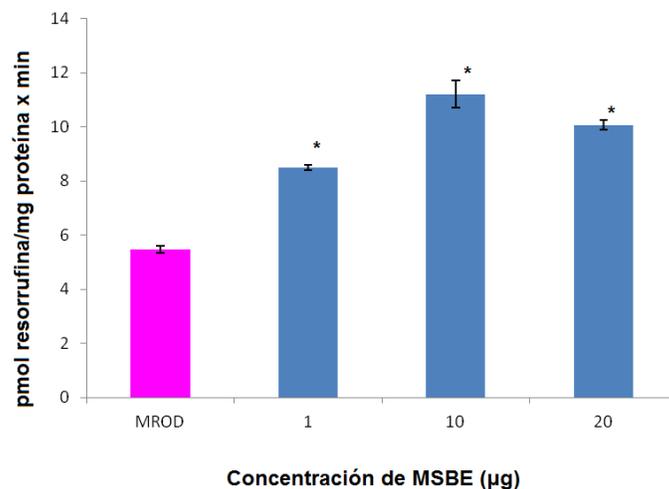


Figura 15. Efecto del MSBE sobre la actividad de CYP1A2. *Diferencia significativa respecto al control.

7.4 Determinación del efecto de la mangiferina sobre la actividad enzimática de CYP

De la misma forma, se exploró el efecto de la mangiferina sobre la producción de la resorruina por estos citocromos. Los resultados muestran que en el caso de la actividad de CYP1A1, a mayor concentración de mangiferina, menor cantidad de resorruina producida (Figura 16). Por otro lado, cuando se midió la actividad de CYP1A2 en presencia de la mangiferina, se observó elevación en la cantidad de resorruina conforme se aumentaba la concentración hasta 100 mM. Con la más alta no se registró incremento (Figura 17).

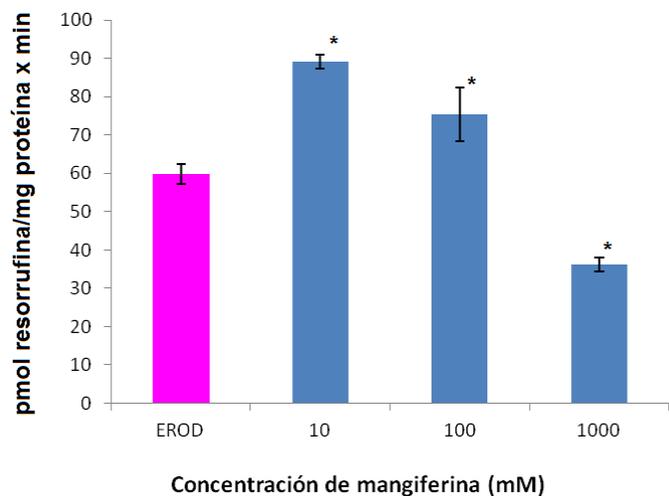


Figura 16. Efecto de la mangiferina sobre la actividad de CYP1A1. *Diferencia significativa respecto al control.

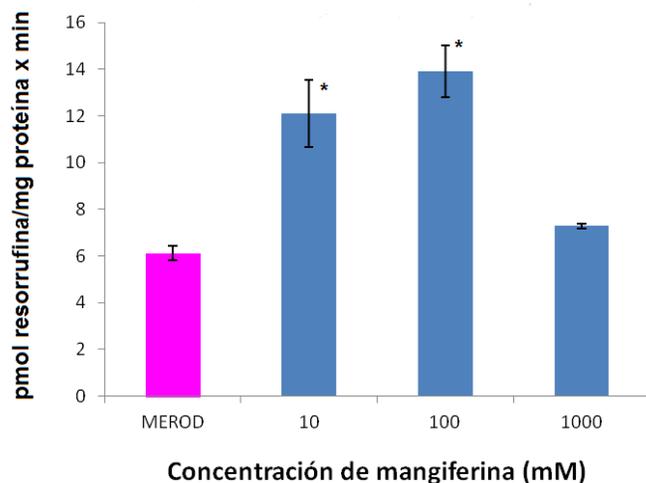


Figura 17. Efecto de la mangiferina sobre la actividad de CYP1A2. *Diferencia significativa respecto al control.

Para la inhibición de la actividad de CYP1A1 por la mangiferina se realizó una ANOVA de una vía que mostró diferencias significativas entre los grupos. Luego se hizo un análisis post hoc de Dunnet que mostró diferencias significativas del control respecto a las concentraciones de [10, 100 y 1000 μM] de mangiferina. (Fig. 16). Para la inhibición de la actividad del CYP1A2 se realizó una ANOVA de una vía que mostró diferencias significativas entre los grupos. El análisis post hoc de Dunnet evidenció que las diferencias significativas eran entre el grupo control y las concentraciones de 10 y 100 μM . No hubo diferencias entre el control y la concentración de 1000 μM (Figura 17).

El estudio de la inhibición de la actividad de CYP2E1 no se pudo realizar debido a que el MSBE y la mangiferina interfieren en los resultados pues la técnica empleada mide la cantidad de fenol obtenido lo cual da cierta coloración, en éste caso los dos compuestos tienen un color pardoso o amarillo que afectan las mediciones.

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran en primera instancia que el MSBE a concentraciones de 200, 500 y 750 $\mu\text{g/ caja}$ no son mutagénicas en presencia y ausencia de S9 inducido tanto en la cepa TA98 (Figuras 2 y 3) como en la TA100 (Figuras 4 y 5), estos datos concuerdan con lo observado por Rodeiro *et al.* (96) que evaluaron el potencial genotóxico del MSBE a concentraciones de 200 a 5000 $\mu\text{g/ caja}$, encontrando la misma tendencia. En cuanto a los resultados con la mangiferina se observa lo mismo, a

concentraciones de 200, 500 y 750 μg no se encontró efecto mutagénico en presencia o ausencia de S9 inducido en la cepa TA98 (Figuras 8 y 9) y la cepa TA100 (Figuras 10 y 11). Lo anterior muestra que el MSBE y la mangiferina *per se* no causan efecto mutagénico en la prueba de Ames ya que no provocan ningún evento mutacional en el ADN de las cepas usadas.

Asimismo, se observa que en las concentraciones de 200, 500 y 750 μg , el MSBE tiene la capacidad de disminuir el número de revertantes de las cepas de *S. typhimurium* cuando son expuestas a ciertos mutágenos en este caso el B[a]P y la NPYR para la TA98 (Figura 6) y TA100 (Figura 7), respectivamente. El efecto observado es proporcional a la concentración del extracto agregada al medio, es decir, a mayor cantidad de MSBE, menor número de mutantes en el medio (Tabla 5). Como se sabe, estos mutágenos son metabolizados por los CYP1A1 y CYP2E1, respectivamente, (los cuales se encontraban en gran cantidad en el medio gracias a la inducción del S9) por lo que se puede asumir que de cierta forma el MSBE impide la generación de metabolitos mutagénicos. En este trabajo se usaron dos mutágenos que inducen eventos mutacionales diferentes, por lo que el efecto protector del extracto actúa tanto en un corrimiento del marco de lectura como de sustitución de pares de bases (que es lo que cada mutágeno provoca en el ADN). Otro punto a destacar es que el efecto antimutagénico más notorio fue al usar el B[a]P pues se encontró hasta más de 90% de inhibición a concentraciones altas (Tabla 6). Es por ello que se piensa que cualquiera que sean los mecanismos por los que se puede provocar la antimutagenicidad, la familia más afectada es la CYP1A. Estos resultados no concuerdan con lo observado por Rodeiro et al. (96) cuando evaluaron el potencial genotóxico del MSBE, lo cual se puede explicar por el hecho de que en ese trabajo usaron tanto mutágenos como condiciones experimentales diferentes.

En el caso de la mangiferina se mostró que, a pesar de ser el compuesto mayoritario, ésta no es la responsable de todo el efecto antimutagénico como se esperaría, ya que al probar su efecto en la prueba de Ames contra el B[a]P, el grado de disminución de las colonias revertantes no fue igual al observado con el MSBE usando las mismas concentraciones de 200, 500 y 750 μg (Figura 12). De hecho, cuando se usó la NPYR no hubo inhibición (Figura 13), lo cual muestra que el mecanismo involucrado afecta solamente a los CYP1A y es posible postular que protege de efectos mutacionales de sustitución de pares de bases y no de corrimiento del marco de lectura. Finalmente se puede observar que el efecto antimutagénico ocasionado por el MSBE es causado por más de un componente y no solo al compuesto mayoritario. A esta conclusión también llegaron Rodeiro et al. (97) donde mencionan que posiblemente el efecto también se debe a otros componentes como las catequinas las cuales se ha mostrado que inhiben a los CYP1A1 y CYP1A2, o la epigallocatequina que modula a los CYP2E1 y se sabe que están presentes en el extracto herbal.

Como se mencionó, los extractos naturales son una mezcla de compuestos que se han reportado con propiedades antimutagénicas pues cuentan con la capacidad de modular los CYP's, entre estos se tiene a los taninos, flavonoides, cumarinas, y polifenoles (124, 125, 66). Entre algunos ejemplos conocidos se puede mencionar el jugo de uva (69), *Myrtus communis* (67), *Teucrium differs*, *Kalopanax picus* (68). En el presente estudio el MSBE también muestra en su composición varios de estos fenoles y observando los resultados se logra asumir que cuenta con un efecto antimutagénico posiblemente por la capacidad de modular de igual forma los CYP's.

Para dar una posible explicación al fenómeno de antimutagénesis observado fue a través de explorar la inhibición de los CYP's por parte del MSBE y la mangiferina. Lo que se encontró es que, el MSBE inhibió la actividad de CYP1A1 (Figura 14) y se obtuvo un aumento en la actividad del CYP1A2 (Figura 15). Esto llama la atención ya que a pesar de ser citocromos de la misma familia, se ven afectados de diferente manera. De hecho, en el caso del CYP1A2 se observó que con la concentración de 20 µg de MSBE o mangiferina se obtuvo menor producción de resorrufina por el CYP. Dicho efecto no es posible adjudicarlo pero se puede suponer que de alguna forma los citocromos se ven limitados y por lo tanto dejan de producir la resorrufina, lo que sugiere que es el MSBE el que interactúa con la fluorescencia de la resorrufina, sin embargo al hacer las pruebas de interferencia en la curva de resorrufina no se nota un gran cambio (Apéndice)

Por otro lado, con la mangiferina se observó que tanto la actividad del CYP1A1 (Figura 16) como del CYP1A2 (Figura 17) se obtuvo un incremento en la actividad en las concentraciones de 10 y 100 nM y una disminución en la actividad a 1000 nM, esto se le puede atribuir a la interacción de la resorrufina con la mangiferina que impide que emita fluorescencia, pues a diferencia de la poca interferencia que tuvo el MSBE, en este caso sí se vieron afectadas las lecturas emitidas por el espectrómetro de las cantidades de resorrufina en la curva patrón (Apéndice). Lo que se puede concluir es que el MSBE y la mangiferina no inhiben la actividad del CYP1A2, aumentando la producción de resorrufina. Lo interesante de estos resultados es que no se parecen a los obtenidos por Rodeiro et al. (99) quienes encontraron que en cultivos de hepatocitos el MSBE presenta un efecto inhibitorio de la actividad enzimática del CYP1A1 y CYP1A2 y la mangiferina produjo inhibición dos veces más alta de la actividad de CYP1A2. Lo mismo se encontró usando enzimas P450 humanas (microsomas). Esta discrepancia en los resultados obtenidos por Rodeiro et al. (99) en comparación con los de este trabajo, se puede atribuir a los diferentes modelos de estudio utilizados, ya que en nuestro caso no solo se usaron microsomas de rata inducidos, sino que también las condiciones eran diferentes pues provocábamos la actividad enzimática de los CYP al adicionar mutágenos al medio.

Asimismo, se sabe que los CYP's pueden ser activados, inducidos o inhibidos por mecanismos muy diferentes, lo que traerá consecuencias en el metabolismo de los

xenobióticos, en el presente trabajo de alguna forma el extracto está por un lado, inhibiendo la actividad del CYP1A1 no se sabe si de forma competitiva, no competitiva o cualquiera de sus tipos, sin embargo el efecto se observó fue dosis-dependiente por lo que se puede estar hablando de una inducción reversible (41). Por otro lado, cuando se ve la actividad del CYP1A2 tanto en el extracto como en la mangiferina, se observa que se está activando o induciendo la enzima, lo cual se nota por el aumento de la cantidad de resorufina producida en el medio. Sería interesante conocer cual el mecanismo involucrado si es solo inducción se estaría hablando de mecanismos como el aumento de la activación transcripcional, el incremento de los mensajeros, la degradación del RNAm o de la proteína u otro. Si es activación (hay que recordar que el extracto tiene diferentes flavonoides que pueden ejercer efecto estimulante sobre los CYP) se observarían efectos alostéricos, movimiento de electrones, desestabilización del complejo enzima-sustrato o alguna otra (38).

Finalmente, un punto a analizar es el arma de doble filo que tiene la inhibición de los CYP's. Por un lado se observa que el MSBE y la Mangiferina poseen la capacidad de interferir con el proceso mutagénico, sin embargo, el precio puede ser elevado ya que si el mecanismo por el cual provoca esto es la inhibición de los citocromos, se estaría hablando de un problema a largo plazo, pues estas enzimas también son las encargadas de metabolizar varios fármacos que si dejan de eliminarse (por la inhibición de los CYP's) se acumularían en el organismo y provocarían efecto tóxico. Un ejemplo claro de esto es el Acetaminofen o la Teofilina que son fármacos metabolizados por estas enzimas y que al ingerir el MSBE junto con ellos se podría presentar una intoxicación pues no se estarían eliminando del organismo. Cuando se habla de una inducción los problemas con los que se enfrentan son alteraciones en la eficacia de los medicamentos que se estén administrando a la par del extracto, interacciones fármaco-fármaco o el aumento de la activación metabólica de procarcinógenos, es por ello que es necesario seguir la línea de investigación *in vivo* para conocer las interacciones e implicaciones que existirían entre el extracto y el metabolismo de los organismos.

9. CONCLUSIONES

- El MSBE y la Mangiferina presentan efecto antimutagénico en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella thyphimurium*. Dicho efecto puede deberse a la inhibición de los citocromos que impiden la generación de metabolitos mutagénicos a partir del B[a] P y la NPYR.

- La actividad de los CYP1A1 y CYP1A2 son moduladas por el MSBE y la Mangiferina, ya que tanto el MSBE como la Mangiferin inhiben la actividad de CYP1A1, mientras que la actividad del CYP1A2 se vio aumentada.

10. PERSPECTIVAS

Estos resultados son la base para explorar el posible efecto quimioprotector del MSBE y la mangiferina en un modelo *in vivo*; tomando en cuenta que los CYP también metabolizan sustancias endógenas, dicho estudio se enfocaría también al posible efecto tóxico involucrado en la inhibición de los CYP's.

11. REFERENCIAS:

1. Kada T., 1984. Environmental desmutagens and antimutagenic agents. *Environ Mut* 240 (135-151).
2. Gerbhart E., 1974. Antimutagens, Data and problems. *Humangenetik* 24 (1-32).
3. Kada T., Inoue T., Namiki N., 1982. Environmental desmutagens and anti-mutagens. En Klekowski E. J., Environmental Mutagenesis and Plant Biology, Praeger, New York. (137-151).
4. King B., 2008. Prevention of genomic Instability by the Dietary Antimutagens Genistein and Lycopene. ProQuest LLC, New York University (11-13).
5. Kada T., Tadashi I., Ohta I., Shirasu T., 1987. Antimutagens and their modes of action. *Basic Life Sciences* 39 (181-192).
6. Kada T. y Shimoi K., 1987. Desmutagens and Bio-antimutagens-their modes of action, review articles. *BioEssays* 7 (113-116).

7. Kuroda Y., Hara Y., 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat Res* 436 (69–97).
8. Arrencibia D., Rosario L., Lopez Y., Diaz D., 2009. Las plantas, fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. *Retel* 21 (37-51).
9. Simic D., Vukovic-Gacic B., Knezevic-Vukcevic J., 1997. Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mutat Res* 402 (51-57).
10. De Flora S., Izzotti A., D'Agostini F., Balansky R. M., Noonan D., Albini A., 2001. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutat Res* 480 (19-22).
11. De Flora S., 1997. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 402 (151-158).
12. Knasmuller S., Majer B. J., Buchmann C., 2004. Identifying antimutagenic constituents of food. En *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*, North America, CRC Press LLC, USA, (581-614).
13. Huber W., Prustomersky S., Delbanco E., Uhl M., Scharf G., Turesky R. J., Thier R. y Schulte-Hermann R., 2002. Enhancement of the chemoprotective enzymes glucuronosyl transferase and glutathione transferase in specific organs of the rat by the coffee components kahweol and cafestol. *Arch Toxicol* 76 (209- 217).
14. Huber W. W., Scharf G., Rossmannith W., Prustomersky S., Grasl-Kraupp B., Peter B., Turesky R. J., Schulte-Hermann R., 2002. The coffee components kahweol and cafestol induce gamma-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of

chemoprotective glutathione synthesis, in several organs of the rat. *Arch Toxicol* 75 (685- 694).

15. Huber W. W., Scharf G., Nagel G., Prustomersky S., Schulte-Hermann R. y Kaina B., 2003. Coffee and its chemopreventive components Kahweol and Cafestol increase the activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver-comparison with phase II xenobiotic metabolism. *Mutat Res* 522 (57-68).
16. Perelman F. C., 2000, Tesis de Licenciatura, Fac de Química UNAM.
17. Zamora R. G., 2005. Efecto de los niveles de glutatión sobre la expresión y actividad del CYP1A1 inducido por albendazol, Tesis de maestría en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias, UNAM.
18. Escobar D., 2003. La mezcla del ciclohexanol y el albendazol como inductora de los citocromos P450 en hígado de roedores, tesis de maestría en ciencias biológicas, México D.F, UNAM.
19. Estabrook R. W., 1996. The remarkable P450s: A historical overview of these versatile heme protein catalysis. *Faseb J* 10 (202-204).
20. Spantzeneger M., Jaeger W., 1995. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metab Rev* 27 (397-417).
21. Meyer U. A., 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinetic Biopharm* 24 (449- 459).
22. Bourdi M., Larrey D., Nataf J., Bernuan J., Pessayre D., Iwasaki M., Guengerich F. P., Beaune P. H., 1990. Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are

- directed against human cytochrome P-450IA2. A specific marker of dihydralazine-induced hepatitis. *J Clin Invest* 85 (1967-1973).
23. Okey A. B., 1990. Enzyme induction in the cytochrome P450 system. *Pharmacol Ther* 45 (241- 298).
 24. Ioannides C., 1996. Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects. *CRC Press*, Boca Raton, EUA. (212-230)
 25. Ryan D. E., Thomas P. E., Reik L. M., Livin W., 1982. Purification, characterization and regulation of five rat hepatic microsomal cytochrome P450 isoenzymes. *Xenobiotica* 11 (727-744).
 26. Guengerich F. P., Shimada T., 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 4 (391-407).
 27. Johnson E. F., Levitt A. S., Muller-Eberhard U., Thorgeirsson S. S., 1980. Divergent pathways of carcinogens metabolism: metabolism of 2-acetylaminofluorene by multiple forms of cytochrome P450. *Cancer Res* 40 (4456-4460).
 28. Puntarulo S., Cederbaum A., 1998. Production of reactive oxygen species by microsomas enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med* 24 (1324- 1330).
 29. Park J. Y., Shigenaga M. K., Ames B. N., 1996. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin or indolo(3,2-*b*)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (2322–2327).

30. Cozza K., Armstrong S., 2005. The Cytochrome P450 System, *American Psychiatric Publishing Inc*, 1 ed. Washington DC (69-78).
31. Morel Y., Barouki R., 1998. Down-regulation of cytochrome P4501A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1. *J Biol Chem* 273 (26969-26976).
32. Wen X., Walle U. K., Walle T., 2005. 5,7-Dimethoxyflavone down regulates CYP1A1 expression and benzo[a]pyrene induced DNA binding in Hep G2 cells. *Carcinogenesis* 26 (803–809).
33. Brooks R. A., Gooderham N. J., Edwards R. J., Boobis A. R., Winton D. J., 1999. The mutagenicity of benzo[a]pyrene in mouse small intestine. *Carcinogenesis* 20 (109-114).
34. Knasmuller S., Zeilmaker M., Kassie F., Schulte-Hermann R., Mohn G. R., 1998. *Environ Mutagen Carcinogen* 3 (18-32).
35. Brondeau M. T., Ban M., Bonnet J. P., Guenier J., De Ceaurriz J., 1989. Acetone compared to other ketones in modifying the hepatotoxicity of inhaled 1,2-dichlorobenzene in rat and mice. *Toxicol Lett* 49 (69-78).
36. Espinosa-Aguirre J. J., Rubio J., Cassani M., Nosti R., Caballero S., Gonzalez I., Martínez G., 1996. Induction of microsomal enzymes in liver of rats treated with cyclohexanol. *Mutat Res* 368 (103-107).
37. Finkel T., Holbrook N. J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408 (239-247).

38. Hollenberg P., 2002. Characteristics and common properties of inhibitors, inducers and activators of CYP enzymes. *Drug metabolism reviews* 34 (17-35).
39. Ortiz de Montellano P. R., Correia M. A., 1995. Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes. En *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*; 2nd Ed. Plenum Press, New York (305–364).
40. Guengerich F. P., 1999. Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes: Molecular and Biochemical Aspects. En Woolf T. F., *Handbook of Drug Metabolism*. Marcel Dekker, New York (203–227).
41. Lin J. H., Chen I. W., Chiba M., Nishime J. A., de Luna F. A., 2000. Route-Dependent Nonlinear Pharmacokinetics of a Novel HIV Protease Inhibitor: Involvement of Enzyme Inactivation. *Drug Metab Dispos* 28 (460–466).
42. Mansuy D., Gans P., Chottard J. C., Bartoli J. F., 1977. Nitrosoalkanes as Fe(II) Ligands in the 455-nm Absorbing Cytochrome P-450 Complexes Formed from Nitroalkanes in Reducing Conditions. *Eur J Biochem* 76 (607–615).
43. Whitlock J. P. Jr., Denison M. S., 1995. Induction of Cytochrome P450 Enzymes that Metabolize Xenobiotics. En Ortiz de Montellano, *Cytochromes P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 2nd Ed, Plenum Press, New York, (367–398).
44. Ronis M. J. J., Ingelman-Sundberg M., 1999. Induction of Human Drug-Metabolizing Enzymes: Mechanisms and Implications. En Woolf T. F., *Handbook of Drug Metabolism*, Marcel Dekker: New York (239–262).

45. Ronis, M. J. J., Lindros K. O., Ingelman-Sundberg M., 1996. The CYP2E Family. En Ioannides C., Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects, CRC Press, Boca Raton FL, (211–239).
46. White R. E., Coon M. J., 1980. Oxygen Activation by Cytochrome P450. *Annu Rev Biochem* 49 (315–356).
47. Mussarat J., Aquil F., Ahmad I., 2006. Mutagenicity and Antimutagenicity of Medical Plants. En Ahmad I., Aquil F., Owais M., Modern Phytomedicine: Turning Medical Plants Into Drugs, Wiley-VCH, Weinheim, (271-286).
48. Ames B. N., McCann J., Yamasaki E., 1975. Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat Res.* 31 (347-364).
49. Maron D. M. y Ames B. N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutant Res* 113 (173-215).
50. Dogra S., Doehmer J., Glatt H., Mölders H., Siegert P., Friedberg T., Seidel A., Oesch F., 1990. Stable expression of rat cytochrome P-450IA1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and their use in mutagenicity testing. *Mol. Pharmacol* 37 (608-613).
51. Philips D. H., Venitt S., 1995. Use of Genetically Engineered Cells for Genetic Toxicology Testing. Bio Press, Eynsham (233-248).
52. Knasmuller S., Parzefall W., Sanyal R., Ecker S., Schwab C., Uhl M., Mersch-Sundermann V., Williamson G., Hietsch G., Langer Darroudi F., Natarajan A. T.,

1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutant Res* 402 (185-202).
53. Laky B. A., Knasmüller S., Gminski R., Mersch-Sundermann V., Scharf G., Freywald C., Lutz W. K., Schlatter J., 1992. *Carcinog* 13 (2211-2216).
54. Knowles B. B., Home C. C. y Aden D. P., 1980. Human hepatocellular carcinoma cells lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209 (497- 499).
55. Heddle J. A., Hite M., Kirkart B., Mavournin K., Macgregor J. T., Newell G. W., Salamone M. F., 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 123 (61-118).
56. IARC, 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items, and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
57. IARC, 1987. The Relevance of N-Nitroso Compounds to Human Cancer. Exposure and Mechanism. En Bartsch, H., O'Neill, I., Schulte-Herman, R.. IARC Scientific Publications N° 84. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
58. Dashwood R. H., 2002. Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an A-to-Z guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models, *Mutant Res* 511 (89-112).

59. Yang H., Holcroft J., Glickman B. W. y De Boer J. G., 2003. Conjugated linoleic acid inhibits mutagenesis by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5-b]pyridine in the prostate of Big Blue (R) rats. *Mutagenesis* 18 (195-200).
60. Schwab G.E., Raucy J. L., Johnson E. F., 1998. Modulation of rabbit and human hepatic cytochrome P450 catalyzed steroid hydroxylation by naphthoflavone. *Mol. Pharmacol* 33 (493-499).
61. Josephy P.D., Gruz P., Nohmi T., 1997. Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. *Mutat Res* 386 (1-23).
62. Mortelmans K., Zeiger E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Elsevier, *Mutat Res* 455 (29-60).
63. Deguchi T., Ohba R., Ueda S., 2000. Radical scavenging activity of a purple pigment, hordeumin, from uncooked barley bran-fermented broth. *J. Agric Food Chem* 48 (3198-3201).
64. Ferguson L. R., 1998. Inhibitors of topoisomerase II enzymes: a unique group of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res* 400 (271-278).
65. Ferguson L. R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res* 475 (89-111).
66. Abalea V., Cillard J., Dubos M. P., Sergent O., Cillard P., More I., 1999. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. *Free Rad Biol Med* 26 (1457-1466).

67. Hayder N., Skandrani I., Kilani S., Bouhlel I., Abdelwahed A., Ben Ammar R., Mahmoud A., Ghedira K., Chekir-Ghedira L., 2008. Antimutagenic activity of *Myrtus communis* L. using the *Salmonella* microsome assay. *South African Journal of Botany* 74 (121-125).
68. Lee K. T., Sohn C. I. I., Park H. J., Kim D.W., Jung G. O., Park K. Y., 2000. Essential moiety for antimutagenic and cytotoxic activity of *Hederagenin monodesmosides* and *bidesmosides* isolated from the stem bark of *Kalopanax pictus*. *Planta Med* 66 (329–332).
69. Alvarez-Gonzales L., Mojica R., Madrigal-Bujaidar E., Camacho-Carranza R., Escobar-García D., Espinosa-Aguirre J. J., 2011. The antigenotoxic effects of grapefruit juice on the damage induced by benzo[a]pyrene and evaluation of its interaction with hepatic and intestinal Cytochrome P450 (Cyp) 1A1. *Food Chem Toxicol* 49 (807-811).
70. Gorski C. J., Huang S., Pinto A., Hamman M., Hilligoss J., Zaheer N. A., Miller M., Hall S. D., 2004. The effect of *echinacea* (*Echinacea purpurea* root) on cytochrome P450 activity *in vivo*. *Clin Pharmacol Ther* 75 (89–100).
71. Zhou S., Gao Y., Jiang W., Xu A., Paxton W., 2003. Interactions of herbs with cytochrome P450. *J Drug Metabol Rev* 35 (35– 98).
72. Ueng Y. F., Chen R. M., 2004. The role of cytochrome P450 in herb drug interactions. *Curr Pharmacog* 2 (209–218).
73. Coe F. G., Anderson G. L., 1996. Screening of medical plants used by the Garifuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds. *J. Ethnopharmacol* 53 (29-50).

74. Guevara M., Montalvo A., Álvarez A., Garrido G., Páez E., Delgado R., 2002. *Mangifera indica* L. Uso etnomédico en Cuba. Rev Cub Farm 36 (166–168).
75. Guevara M., Tamayo D., González S., Núñez A. J., 2001. Vimang as natural antioxidant supplementation in patients with malignant tumors. Min Med 92 (95–97).
76. Núñez A.J., Castro H., Agüero-Agüero J., Gonzalez J., Naddeo F., De Simona F., Rastrelli L., 2002. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars and polyphenols from Mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. J Agric Food Chem 50 (762–766).
77. Núñez-Selles A. J., Delgado-Hernández R., Garrido-Garrido G., García-Rivera D., Guevara-García M., Pardo-Andreu G. L., 2007. The paradox of natural products as pharmaceuticals Experimental evidences of a mango stem bark extract. Pharmacol Res 55 (351-358).
78. Martínez G., Delgado R., Pérez G., Garrido G., Núñez A., León O., 2000. Evaluation of the in vitro antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extracts (Vimang). Phytother Res 14 (424–427).
79. Martínez S. G., Jalil E. C., Giuliani A., León F. O. S., Ram S., Delgado H. R., 2000. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) reduces ischemia-induced neuronal loss and oxidative damage in gerbil brain. Free Radical Res 32 (1-3).
80. Martinez S. G., Giuliani A., León O. S., Pérez D. G., Núñez A. J., 2001. Effect of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) on protein and hepatic microsoma peroxidation. Phytother Res 15 (581).

81. Garrido G., Gonzalez D., Delpote R., Backhouse N., Quintero G., Nuñez-Selles A., 2001. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Phytother Res* 15 (18-21).
82. Garrido G., Delgado R., Lemus Y., Rodríguez J., García D., Nuñez A., 2004. Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production on macrophages and microglia by a standard aqueous extract of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). Role of mangiferina isolated from the extract. *Pharmacol Res* 50 (165-172).
83. Garrido G., González D., Lemus Y., García D., Lodeiro L., Quintero G., Delporte C., Núñez-Sellés A., Delgado R., 2004. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Pharmacol Res* 50 (143–149).
84. Garcia D., Delgado R., Ubeira F., Leiro J., 2002. Modulation of rat macrophage function by the *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin. *Int Immunopharmacol* 2 (797–806).
85. García O., Mandina T., Lamadrid A. I., Díaz A., Remigio A., González Y., Piloto J., González J. E., Alvarez A., 2004. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an interlaboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat Res* 556 (25–34).
86. Leiro, J., García, D., Arranz, J.A., Delgado, R., Sanmartín, M.L., Orallo, F., 2004. An Anacardiaceae preparation reduces the expression of inflammation-related genes in murine macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 4, 991–1003.
87. Remírez D., Shahrzard T., Delgado R., Sarandi A., O'Brien P., 2005. Preventing hepatocyte oxidative stress cytotoxicity with *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Drug Met Drug Int* 21 (19–29).

88. Cancino L., Leiva A., Garnido G., Cossio M., Prieto E., 2001. MSBE: los efectos antigenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 20 (48-53).
89. Hernández P., Delgado R., Walczak H., 2006. *Mangifera indica* L. extract protects T cells from activation-induced cell death. *Int Immunopharmacol* 6 (1496–1505).
90. Hernández P., Rodríguez P. C., Delgado R., Walczak H., 2007. Protective effect of *Mangifera indica* L. polyphenols on human T lymphocytes against activation-induced cell death. *Pharmacol Res* 55 (167–173).
91. Sa-Nuñes A., Rogério A. P., Medeiros A. I., Fabris V. E., Andreu G. P., Rivera D. G., Delgado R., Faccioli L. H., 2006. Modulation of eosinophil generation and migration by *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Int Immunopharmacol* 6 (1515–1523).
92. García D., Leiro J., Delgado R., Sanmartin M. L., Ubeira F. M., 2003. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin modulate mouse humoral immune responses. *Phytother Res* 17 (1182–1187).
93. Rivera D. G., Balmaseda I. H., Leon A. A., Hernandez B. C., Montiel L. M., Garrido G. G., Cuzzocrea S., Hernandez R. D., 2006. Antiallergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. *J Pharm Pharmacol* 58 (385–392).
94. García D., Escalante M., Delgado R., Ubeira F. M., Leiro J., 2003. Anthelmintic and antiallergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components Vimang and mangiferin. *Phytother Res* 17 (1203–1208).

95. Rodeiro I, Donato M. T., Martínez I., Hernández I., Garrido G., González-Lavaut J. A., Menéndez R., Laguna A., Castell J. V., Gómez-Lechón M. J., 2008. Potential hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture. Elsevier, Toxicology in Vitro 22 (1242–1249).
96. Rodeiro I, Cancino L, González J.E, Morffi J, Garrido G, González R.M, Nuñez A, Delgado R, 2006. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. Food Chem Toxicol 1 (707-713).
97. Rodeiro I., Donato M. T., Jiménez N., Garrido G., Delgado R., Gómez-Lechón M. J., 2007. Effects of *Mangifera indica* L. aqueous extract (Vimang) on primary culture of rat hepatocytes. Food and Chem Toxicol 45 (2506-2515).
98. Guengerich F. P., 1997. Role of cytochrome P450 enzymes in drug–drug interactions. Adv Pharm 43 (7–35).
99. Rodeiro I, Donato M. T., Lahoz I., González-Lavaut J. A., Laguna A., Castell J. V., Delgado R., Gómez-Lechón M. J., 2008. Modulation of P450 enzymes by Cuban natural products rich in polyphenolic compounds in rat hepatocytes. Science Direct, Chemico-Biological Interactions 172 (1–10).
100. González J. E., Rodríguez M. D., Rodeiro I., Morffi J., Guerra E., Leal F., García H., Goicochea E., Guerrero S., Garrido G., Delgado R., Núñez-Selles A. J., 2007. Lack of in vivo embryotoxic and genotoxic activities of orally administered stem bark aqueous extract of *Mangifera indica* L. (Vimang®). Food Chem Toxicol 45 (2526-2532).

101. Garrido G., Rodeiro I., Hernández I., García G., Pérez G., Merino N., Nuñez-Sellés A., Delgado R., 2009. *In vivo* acute toxicological studies of an antioxidant extract from *Mangifera indica* L. (VIMANG). *Drug Chem Toxicol* 32 (53-58).
102. Rodeiro I, Donato MT, Jimenez N, Garrido G, Molina-Torres J, Menendez R, Castell VJ, Gómez-Lechón MJ (2009) Inhibition of human p450 enzymes by natural extracts used in traditional medicine. *Phytother Res* 23: 279-282.
103. Gorski C. J., Huang S., Pinto A., Hamman M., Hilligoss J., Zaheer N. A., Miller M., Hall S. D., 2004. The effect of echinacea (*Echinacea purpurea* root) on cytochrome P450 activity *in vivo*. *Clin Pharmacol Ther* 75 (89-100).
104. Zhou S., Gao Y., Jiang W., Xu A., Paxton W., 2003. Interactions of herbs with cytochrome P450. *J Drug Metabol Rev* 35 (35–98).
105. Ueng Y. F., Chen R. M., 2004. The role of cytochrome P450 in herb drug interactions. *Curr Pharmacog* 2 (209–218).
106. Wen X., Walle U. K., Walle T., 2005. 5,7-Dimethoxyflavone down regulates CYP1A1 expression and benzo[a]pyrene-induced DNA binding in Hep G2 cells. *Carcinogenesis* 26 (803–809).
107. Mukhtar H., Das M., Khan W. A., Bik D. P., 1988. Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 48 (2361–2365).
108. Guengerich F. P., 1988. Roles of cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res* 48 (2946–2954).

109. Tsyrllov I. B., Mikhailenko V. M., Gelboin H. V., 1994. Isozyme and species specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P450s to different flavonoids. *Biochim. Biophys Acta* 1205 (325–335).
110. Williams S. N., Pickwell G. V., Quattrochi L. C., 2003. A combination of tea (*Camellia senensis*) catechins is required for optimal inhibition of induced CYP1A expression by green tea extract. *J Agric Food Chem* 51 (6627–6634).
111. Yang M., Yoshikawa M., Arashidani K., Kawamoto T., 2003. Effects of green tea on carcinogen-induced hepatic CYP1As in C57BL/6 mice. *Eur J Cancer Prev* 12 (391–395).
112. Brosen K., 1995. Drug interactions and the cytochrome P450 system: the role of cytochrome P4501A2. *Clin Pharmacokinet* 29 (20–25).
113. Rendic S., DiCarlo F. J., 1997. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metabol Rev* 29 (413–580).
114. Muto S., Fujita K., Yamazaki Y., Kamataki T., 2001. Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. *Mutat Res* 479 (197–206).
115. Williams S. N., Shih H., Guenette D. K., Denison M. S., Pickwell G. V., Quattrochi L. C., 2000. Comparative studies on the effects of green tea extracts and individual tea catechins on human CYP1A gene expression. *Chemico Biol Inter* 1 (211–219).
116. Young H., Jun S., Ho C., Wan S., Hun D., Au W., 1994. Anticlastogenic effects of galangin against bleomycin induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes. *Mutat Res* 311 (225–229).

117. Espinosa-Aguirre J. J., Rubio J., Lopez I., Nosti R., Asteinza J., 1997. Characterization of the CYP isozyme profile induced by ciclohexanol. *Mutagenesis* 12 (159- 162).
118. Maron, D. M., Ames, B.N. *Mutat. Res*, 1993, 300,301-306.
119. Bradford M., 1979. A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (248-254).
120. Yahagi Y., Nagao M., Seino Y., Matsushima T., Sugimura T., Okada M., 1977. Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella. *Mutat Res* 48 (121-130).
121. Burke D., Thompson S., Weaver R., Wolf R., Mayers R., 1994. Cytochrome P450 Specificities of alkoxyresorufin-o-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* 48 (923-926).
122. Rodrigues A., Prough R., 1991. Induction of cytochrome P4501A1 and P4501A2 and measurement of catalytic activities. *Meth Enzymol* 26 (4350-4354).
123. Asteinza J., Camacho R., Reyes E., Dorado V., Espinosa J., 2000. Induction of cytochrome P450 enzymes by albendazole treatment in the rat. *Environ Toxicol Pharmacol* 9 (31-37).
124. Calomme M., Pieters L., Vlietinck A., Vanden Berghe D., 1996. Inhibition of bacterial mutagenesis by citrus flavonoids. *Planta Medica* 62 (222–226).
125. Okuda T., Mori K., Hyatsu H., 1989. Ellagitannins as active constituents of medical plants. *Chemical Pharmacology* 32 (3755–3760).

12. APENDICE

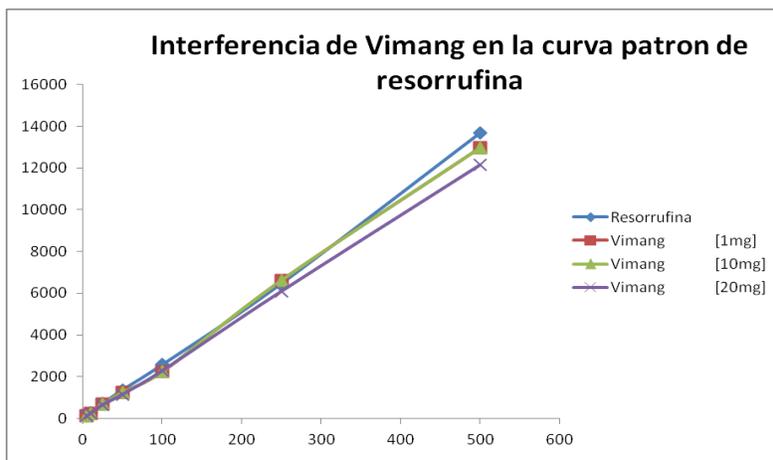


Figura 18. Interferencia del MSBE [1, 10, 20 mg] en la curva patron de la Resorrufina

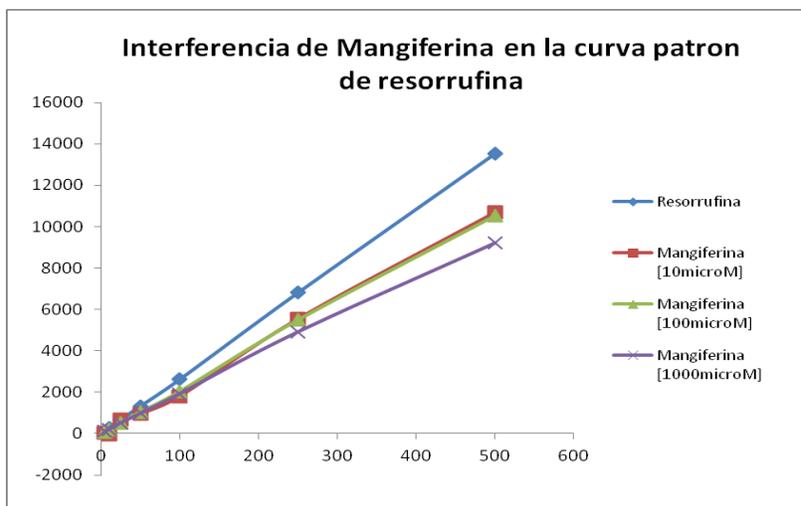


Figura 19. Interferencia de la Mangiferina [10, 100, 1000 microM] en la curva patron de la Resorrufina