



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA DIHIDROXIBERGAMOTINA COMO
INHIBIDOR DE CITOCROMO P450

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
REBECA SANTES PALACIOS

TUTOR PRINCIPAL
DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D. F. MAYO, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMEN	10
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Citocromo P450	12
I.2 CYP1	13
I.3 CYP2	14
I.4 Mecanismo catalítico del CYP	15
I.5 Inhibición del ciclo catalítico de CYP	16
I.6 Jugo de toronja y su interacción con CYP	20
I.7 6,7-Dihidroxi bergamotina como inhibidor de CYP	20
I.8 Naringenina como inhibidor de CYP	22
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVO GENERAL	25
V. OBJETIVOS PARTICULARES	25

VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	
VI.1	Sustancias Químicas	26
VI.2	Inducción de CYP1A y CYP2B	26
VI.3	Obtención de la fracción microsomal	26
VI.4	Expresión de CYP1A1 humano en <i>Escherichia coli</i>	27
VI.5	Obtención de la fracción membranal bacteriana	28
VI.6	Determinación de la actividad enzimática	28
VI.7	Determinación de la cinética enzimática	30
VI.8	Evaluación <i>in silico</i> de la interacción del sustrato e inhibidores con CYP1A1	31
VII.	RESULTADOS	
VII.1	Determinación del efecto de la naringenina sobre la actividad enzimática de CYP de rata	33
VII.2	Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de la naringenina sobre CYP de rata	34
VII.3	Determinación del efecto de la naringenina sobre la actividad enzimática de CYP1A1 de rata	34
VII.4	Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de la naringenina sobre CYP1A1 humano	37
VII.5	Determinación del efecto de la naringenina sobre la actividad enzimática de CYP1A1 humano	37
VII.6	Determinación del efecto de la DHB sobre la actividad enzimática de CYP de rata	40
VII.7	Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de la DHB sobre CYP de rata	41
VII.8	Determinación del efecto de la DHB sobre la actividad enzimática de CYP1A1 de rata	41

VII. RESULTADOS (CONTINUACIÓN)	
VII.9 Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de la DHB sobre CYP1A1 humano	43
VII.10 Determinación del efecto de la DHB sobre la actividad enzimática de CYP1A1 humano	43
VII.11 Comparación de las estructuras tridimensionales de CYP1A1 humano y de rata	45
VII.12 Evaluación <i>in silico</i> de la interacción de la etoxirresorufina con CYP1A1	49
VII.13 Evaluación <i>in silico</i> de la interacción de la alfa-naftoflavona con CYP1A1	50
VII.14 Evaluación <i>in silico</i> de la interacción de la naringenina con CYP1A1	52
VII.15 Evaluación <i>in silico</i> de la interacción de la DHB con CYP1A1	54
VIII. DISCUSIÓN	57
IX. CONCLUSIONES	61
X. PERSPECTIVAS	62
XI. REFERENCIAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo catalítico del CYP450.

Figura 2. Equilibrios de unión a considerar en la inhibición competitiva.

Figura 3. Equilibrios de unión a considerar en la inhibición acompetitiva.

Figura 4. Equilibrios de unión a considerar en la inhibición mixta.

Figura 5. Equilibrios de unión a considerar en la inhibición no competitiva.

Figura 6. Estructura química de las furanocumarinas presentes en el jugo de toronja.

Figura 7. Estructura química de la naringina y su aglicona (naringenina).

Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de naringenina sobre la actividad de CYP de rata.

Figura 9. Efecto inhibitorio de la naringenina sobre la actividad de CYP1A1 de rata.

Figura 10. Inhibición de la actividad de CYP1A1 de rata por la naringenina.

Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de naringenina sobre la actividad de CYP1A1 humano.

Figura 12. Efecto inhibitorio de la naringenina sobre la actividad de CYP1A1 humano.

Figura 13. Inhibición de la actividad de CYP1A1 humano por la naringenina.

Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de DHB sobre la actividad de CYP de rata.

Figura 15. Efecto inhibitorio de la DHB sobre la actividad de CYP1A1 de rata.

Figura 16. Inhibición la actividad de CYP1A1 de rata por la DHB.

Figura 17. Efecto de diferentes concentraciones de DHB sobre la actividad de CYP1A1 humano.

Figura 18. Efecto inhibitorio de la DHB sobre la actividad de CYP1A1 humano.

Figura 19. Inhibición la actividad de CYP1A1 humano por la DHB.

Figura 20. Alineamiento de secuencias de aminoácidos del CYP1A1 humano y de rata.

Figura 21. Superposición de la estructura tridimensional del CYP1A1 humano y el modelo obtenido en este trabajo para el CYP1A1 de rata.

Figura 22. Interacciones de la etoxirresorufina con CYP1A1 humano y con el modelo de CYP1A1 de rata obtenido en este trabajo.

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

Figura 23. Interacciones de la α -naftoflavona con CYP1A1 humano y con el modelo de CYP1A1 de rata obtenido en este trabajo.

Figura 24. Interacciones de la naringenina con CYP1A1 humano y con el modelo de CYP1A1 de rata obtenido en este trabajo.

Figura 25. Interacciones de la DHB con CYP1A1 humano y con el modelo de CYP1A1 de rata obtenido en este trabajo.

Figura 26. Superposición de las interacciones de los ligandos con CYP1A1 humano y con el modelo de CYP1A1 de rata obtenido en este trabajo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. CI_{50} de la naringenina para diferentes CYPs.

Tabla 2. CI_{50} de la naringenina sobre CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 de rata.

Tabla 3. Parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la naringenina sobre CYP1A1 de rata.

Tabla 4. Parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la naringenina sobre CYP1A1 humano.

Tabla 5. Resumen de los parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la naringenina sobre CYP1A1.

Tabla 6. CI_{50} de la dihidroxibergamotina sobre CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 de rata.

Tabla 7. Parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la DHB sobre CYP1A1 de rata.

Tabla 8. Parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la DHB sobre CYP1A1 humano.

Tabla 9. Resumen de los parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la DHB sobre CYP1A1.

Tabla 10. Interacciones de los ligandos con CYP1A1

LISTA DE ABREVIATURAS

ADT	AutoDock tools
ALA	Ácido delta aminolevulínico
α -NF	α -naftoflavona
β -NF	β -naftoflavona
BROD	Actividad benciloxirresorufina O-desalquilasa
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CYP	Citocromo P450
DHB	6,7-Dihidroxibergamotina
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
ER	Etozirresorufina
EROD	Actividad etoxirresorufina O-desetilasa
FB	Fenobarbital
<i>g</i>	Gravedades
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HSD	Actividad 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
K _i	Constante de inhibición
K _{iC}	Constante de inhibición de la enzima libre
K _{iU}	Constante de inhibición del complejo enzima-sustrato
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria Bertani
MROD	Actividad metoxirresorufina O-desmetilasa
NAR	Naringenina
NCBI	National Center for Biotechnology
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PROD	Actividad pentoxirresorufina O-desalquilasa
TB	Medio Terrific Broth
V _{max}	Velocidad máxima

RESUMEN

La coadministración del jugo de toronja con una amplia variedad de medicamentos afecta la biodisponibilidad de éstos, alterando la acción terapéutica del fármaco y en muchos casos incrementando sus efectos no deseados. La mayoría de los efectos adversos son resultado de la inhibición de los citocromos P450 (CYP) por los componentes del jugo de toronja, siendo la subfamilia CYP3A4 una de las más afectadas.

La naringina, bergamotina y dihidroxibergamotina son tres de los constituyentes mayoritarios del jugo de toronja. En estudios previos, se demostró que las dos últimas inhiben la actividad enzimática de CYP3A4 *in vitro*. La naringina es metabolizada *in vivo* por la α -ramnosidasa y β -glucosidasa a su aglicona naringenina, que posee actividad inhibitoria sobre la actividad de CYP3A4. Diversos estudios sugieren que CYP3A4 no es la única subfamilia afectada, ya que también CYP1A y CYP2B pueden ser inhibidos por los componentes del jugo de toronja. A fin de explorar esta última posibilidad, se evaluó la capacidad de la naringenina y la dihidroxibergamotina para inhibir la actividad de las subfamilias CYP1A y CYP2B *in vitro* en microsomas de hígado de rata, encontrando que ambos compuestos inhiben preferentemente al CYP1A1 (CI_{50} de $0.09 \pm 0.01 \mu\text{M}$ para la naringenina y de $4.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ para la dihidroxibergamotina).

Por consiguiente, se decidió realizar la caracterización bioquímica de las propiedades inhibitorias de estas moléculas utilizando CYP1A1 recombinante de rata, donde se encontró que la naringenina es un inhibidor mixto de esa isoenzima con una constante de inhibición de la enzima libre (K_{iC}) de $172 \pm 18 \text{ nM}$ y una constante de inhibición del complejo enzima-sustrato (K_{iU}) de $391 \pm 16 \text{ nM}$, mientras que la DHB se comporta como un inhibidor competitivo (K_i de $1.73 \pm 0.03 \mu\text{M}$).

El conocimiento de diferencias interespecie en la actividad catalítica de CYP es importante cuando los resultados de modelos animales son extrapolados para el asesoramiento de riesgo en la salud humana. Por ello se realizaron experimentos de cinética enzimática empleando proteína recombinante CYP1A1 de humano.

En este caso, se observaron diferencias en el tipo de inhibición mostrada por la naringenina y la dihidroxibergamotina sobre esta isoenzima, pues en este modelo ambas moléculas inhibieron competitivamente (K_i de $489 \pm 22 \mu\text{M}$ para la primera y de $55 \pm 2 \mu\text{M}$ para la segunda), por lo cual las aproximaciones obtenidas en el modelo de rata deben tratarse con reservas si se quieren extrapolar al modelo humano.

Con una evaluación *in silico* de las interacciones del sustrato (etoxirresorufina) e inhibidores (naringenina y dihidroxibergamotina), se encontró que estas diferencias pueden ser resultado de la interacción de los ligandos con el sitio catalítico de las enzimas, donde los aminoácidos de CYP1A1 de humano/CYP1A1 de rata en las siguientes posiciones Ile115/119, Ser122/Thr126, Phe123/127, Ans222/226, Phe224/228, Phe251/255, Phe258/262, Gly316/320, Ala317/321, Phe319/323, Asp320/324, Thr385/389, Ile386/390 y Leu496/500 parecen ser fundamentales para el reconocimiento y orientación del sustrato/inhibidor.

En conclusión, este trabajo describe la aplicación de herramientas *in vitro* e *in silico* para el estudio de la inhibición de compuestos presentes en productos naturales, como son la naringenina y DHB, con el fin de investigar la habilidad de estas moléculas para interactuar con CYP1A1.

I. INTRODUCCIÓN

Diariamente nos exponemos a distintos compuestos químicos ajenos a nuestro organismo que provienen de diversas fuentes. Muchos de estos compuestos son reconocidos como perjudiciales y por ende, hay que eliminarlos.

Con el fin de eliminar los xenobióticos, en el organismo se producen reacciones de biotransformación encaminadas a incrementar la hidrofilia de estas moléculas para facilitar su rápida excreción. Estas reacciones se pueden diferenciar en reacciones de fase I y fase II.

Durante la fase I o de funcionalización se produce una modificación del xenobiótico por reacciones químicas como oxidación, reducción o hidrólisis, dando lugar a la aparición de grupos polares en la molécula, lo que se traduce en un aumento de su hidrosolubilidad y por tanto una mayor facilidad para su excreción. Dentro de las enzimas responsables de estas reacciones están las aldehído deshidrogenasas, azo- y nitrorreductasas, alcohol deshidrogenasas, épxido hidrolasas, monoamino oxidasas, flavin monooxidasas, estererasas no específicas y los citocromos P450 (CYP) (Maquardt *et al.*, 1999).

En la fase II, el metabolito proveniente de una reacción de fase I, se conjuga con una sustancia endógena, lo que facilita su transporte en el organismo para su posterior eliminación.

I.1 Citocromo P450

De las enzimas de fase I, los CYP son una superfamilia que se encuentra distribuida en gran variedad de organismos. Su actividad está relacionada con la biotransformación de xenobióticos así como moléculas endógenas (Fujii-Kuriyama y Kawajiri, 2010), metabolizando a más del 80% de los fármacos procesados en fase I (Costas, 2005). También, puede activar profármacos u otras sustancias químicas, pudiendo incluso dar lugar a productos reactivos que pueden dañar a la célula (Guengerich, 2006).

En organismos eucariontes, los CYPs se han detectado prácticamente en todas las membranas subcelulares (Stasiecki *et al.*, 1980; Oesch *et al.*, 1985), siendo la mitocondria y principalmente el retículo endoplásmico las fuentes más importantes (Lee *et al.*, 1981; Nebert *et al.*, 1982).

Las proteínas pertenecientes a CYP pueden ser clasificadas de acuerdo a su secuencia de aminoácidos en familias, subfamilias e isoformas siguiendo la sugerencia de Nelson y colaboradores (1996). En una misma familia se agrupan aquellas enzimas cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud mayor del 40%, independientemente de la especie de procedencia. Dentro de una familia, los CYPs se agrupan en diferentes subfamilias que tienen una similitud en la secuencia de aminoácidos superior al 55%.

Por último, dentro de la misma subfamilia, las enzimas individuales se designan con números, teniendo en cuenta que dos CYPs se consideran como diferentes siempre y cuando sus respectivas secuencias difieran en más de un 3%.

Las subfamilias CYP1A y CYP2B son particularmente importantes debido a su capacidad de activar una gran variedad de contaminantes ambientales para convertirlos en metabolitos altamente reactivos que reaccionan con macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Nebert, 1989; Rendic, 2002).

I.2 CYP1

Incluye dos subfamilias: 1A y 1B, a su vez 1A presenta dos citocromos muy parecidos, CYP1A1 y CYP1A2, mientras que a la subfamilia 1B únicamente pertenece el CYP1B1.

CYP1A1 es capaz de metabolizar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) que son compuestos encontrados en el petróleo y emisiones de combustibles fósiles, alimentos carbonizados, humo de tabaco y otros productos resultantes de la combustión incompleta de la materia orgánica (Jeffy *et al.*, 2002). Se sabe que los metabolitos formados por la interacción entre los HAPs y CYP1A1 genera aductos en el DNA dando lugar a eventos mutagénicos y aberraciones cromosómicas que contribuyen al proceso carcinogénico (Shou *et al.*, 1996).

Por otro lado, CYP1A2 está involucrado en el metabolismo de varios fármacos, por ejemplo la teofilina, tacrina y verapamil, entre otros (Zhou *et al.*, 2010). Por ello, la alteración de la actividad basal de CYP1A2 puede ocasionar interacciones fármaco-fármaco o fármaco-alimentos de relevancia clínica (Granfors *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005).

CYP1B1 es la principal enzima del metabolismo de estrógenos carcinogénicos y está involucrado en la activación metabólica de procarcinógenos derivados de los HAPs (Chun y Kim, 2003).

I.3 CYP2

Incluye 5 subfamilias, siendo las subfamilias 2A y 2B de escasa importancia para el metabolismo de fármacos; en cambio, las subfamilias 2C, 2D y 2E son las más relevantes en este rubro.

CYP2A6 tiene como sustratos las cumarinas y algunos procarcinógenos como el metiliterbutiléter, la nicotina, la N-nitrosodietilamina y la N-nitrosobenzilmetilamina. Constituye alrededor del 5-10% del CYP hepático microsomal total en el hombre (Le-Gal *et al.*, 2003).

CYP2B6 metaboliza compuestos como la nicotina, el bupropión y muchas toxinas y carcinógenos. Su expresión en el cerebro es específica de determinadas regiones y se localiza tanto en neuronas como en astrocitos. Los niveles de CYP2B6 en cerebro se encuentran elevados en fumadores y alcohólicos (Miksys *et al.*, 2003).

La subfamilia 2C contiene al menos siete genes de los cuales, CYP2C9 y CYP2C19 exhiben alto polimorfismo. El CYP2C9 metaboliza la warfarina, la fenitoína y algunas sulfonilureas.

El CYP2C19 tiene función de (S)- mefenitoína hidroxilasa y metaboliza algunos inhibidores de la bomba de protones, antidepresivos y varios antiepilépticos (Lin y Lu, 2001; Guengerich, 2003).

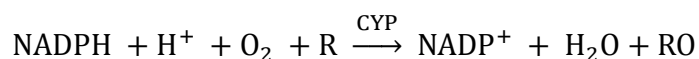
La subfamilia 2D, a la que pertenece el CYP2D6, metaboliza entre el 20 y 25% de los fármacos. La mayoría de las interacciones entre psicofármacos y fármacos cardiovasculares se observan a este nivel.

El CYP2D6 exhibe alto polimorfismo, especialmente en las poblaciones europeas (Lin y Lu, 2001; Guengerich, 2003).

La subfamilia 2E contiene el CYP2E1, responsable del metabolismo del etanol y que participa en la activación metabólica de una serie de procarcinógenos, como N-dimetil nitrosamida y de solventes orgánicos (Lieber, 1997).

I.4 Mecanismo catalítico del CYP

Los CYPs son hemoproteínas con función de oxidasa, cuya reacción se puede generalizar de la siguiente forma:



En donde R representa al sustrato y RO al metabolito oxidado (Hollenberg, 1992). La reactividad del CYP es atribuida al hierro presente en el complejo de protoporfirina IX, el cual está unido a la proteína por medio de un puente de hidrógeno de las dos cadenas de propionato y una cisteína coordinada al hierro (Poulos y Raag, 1992).

En la Figura 1, se muestran las fases intermediarias del ciclo catalítico de CYP que conducen a la hidroxilación del sustrato (R-H). El estado de reposo del citocromo presenta un grupo hemo de bajo spin hexacoordinado [1]. El sexto ligando axial es una molécula de agua unida débilmente. La unión del sustrato desplaza el ligando del agua para obtener un grupo hemo de alto spin pentacoordinado-estado funcional (5c-Hs) [2]. El cambio de bajo spin a alto spin provoca en general un aumento de potencial redox del hemo, que facilita la transferencia de electrones de su pareja redox al P450. En este momento, el P450 férrico 5c-Hs se reduce mediante su pareja redox, para producir hemo ferroso [3], al que se une el oxígeno para producir un intermedio oxiferroso [4]. P450 oxiferroso es el primero de una serie de intermediarios "oxi" que conducen a la activación del dioxígeno. El segundo electrón se transfiere en este momento desde la pareja redox al intermedio oxiferroso, para obtener un intermedio peroxo [5], que posteriormente se protona dando un intermedio hidroperoxo [6].

Para finalizar se produce la ruptura heterolítica del enlace O-O, con la formación del intermedio oxiferrilo altamente reactivo denominado Compuesto I por analogía con el grupo hemo de las peroxidasa (Hamdane *et al.*, 2008).

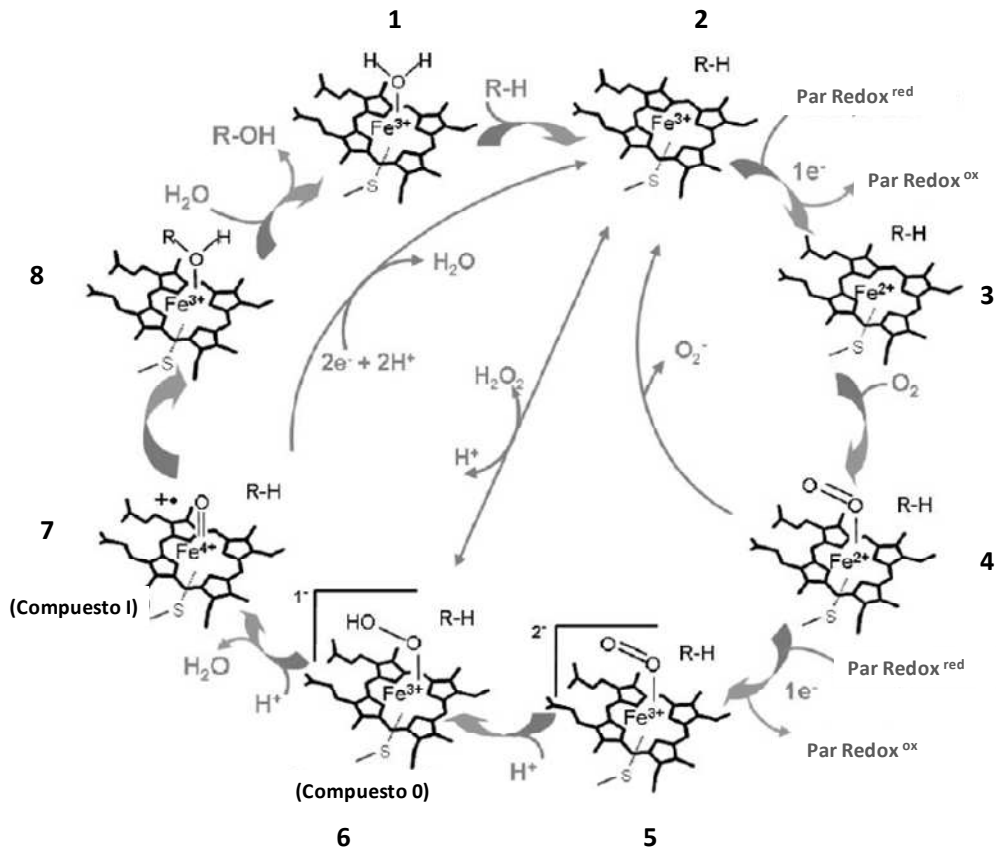


Figura 1. Ciclo catalítico del CYP450 (Modificado de Munro *et al.*, 2007).

I.5 Inhibición del ciclo catalítico de CYP

Los inhibidores enzimáticos son aquellas moléculas que se unen a la proteína e interfieren en la catálisis de una reacción haciéndola más lenta o deteniéndola (Nelson y Cox, 2006). Por otro lado, el inhibidor puede transformarse en un metabolito reactivo que modifique la estructura del CYP, produciendo una pérdida de actividad enzimática (Silverman, 1988).

En general, los mecanismos inhibitorios pueden clasificarse en dos grupos:

- **Irreversible.** Ocurre cuando el inhibidor modifica o destruye la enzima, y ésta no puede recuperar su actividad. Dentro de este grupo también se incluyen aquéllos que forman una asociación no covalente muy estable impidiéndole a la enzima realizar la catálisis (Nelson y Cox, 2006).

Existe un tipo de inhibidores irreversibles llamado inactivadores suicidas. Un inactivador de este tipo pasa a través de los primeros pasos de una reacción enzimática normal, pero enseguida se convierte en un compuesto muy reactivo que se une covalentemente con la enzima inactivándola, en lugar de transformarse en el producto normal. Estos compuestos también se conocen con el nombre de inactivadores basados en el mecanismo catalítico, ya que utilizan el mecanismo de reacción enzimático normal para inactivar a la enzima (Ortíz de Montellano, 2005).

- **Reversible.** Se da cuando el complejo enzima-inhibidor puede dissociarse y la enzima puede volver a actuar. Existen varios tipos:
 - *Inhibición competitiva:* El inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo y la enzima no es capaz de realizar la catálisis. En este caso la constante de afinidad aparente ($K_{m_{ap}}$) para el sustrato incrementa en presencia del inhibidor; sin embargo, no hay cambio en la velocidad máxima (V_{max}).

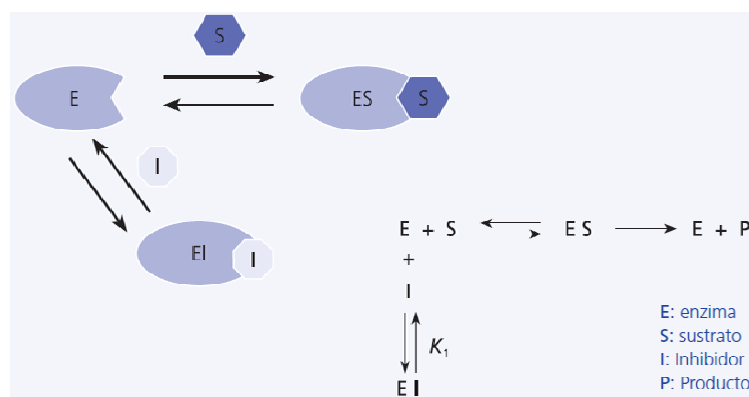


Figura 2. Equilibrios de unión a considerar en la inhibición competitiva (Modificado de Nelson y Cox, 2006).

Este mecanismo de inhibición ha sido explotado en el área de la química farmacéutica para el diseño de fármacos con un blanco terapéutico específico. Por ejemplo, para el tratamiento de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana se han desarrollado diversos inhibidores competitivos de la proteasa del virus como el atazanavir y saquinavir (Kuriyan *et al.*, 2013).

- *Inhibición acompetitiva*: Un inhibidor acompetitivo se fija a un sitio distinto al que se fija el sustrato en el sitio activo. Se produce un complejo Sustrato-Enzima-Inhibidor no productivo que ocasiona una disminución proporcional tanto de V_{max} como K_m , ya que la relación V_{max}/K_m permanece constante.

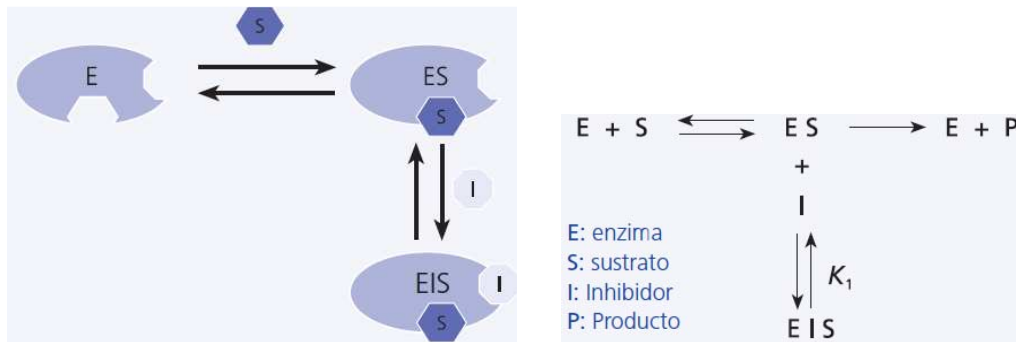


Figura 3. Equilibrios de unión a considerar en la inhibición acompetitiva (Modificado de Nelson y Cox, 2006).

El compuesto BIA 3-335 (dihidrocloruro de 1-[3,4-dihidroxi-5-nitrofenil]-3-(N-3'-trifluorometilfenil)-piperazina-1-propanona) ha sido caracterizado como un potente inhibidor acompetitivo de la enzima Catecol-O-metiltransferasa (COMT), una enzima importante en el metabolismo de neurotransmisores y xenobióticos. En particular, esta enzima lleva a cabo la inactivación de fármacos como la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) mediante una O-metilación, por lo que encontrar inhibidores de la COMT se convierte en una alternativa para incrementar la efectividad de los fármacos empleados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Kuriyan *et al.*, 2013).

- *Inhibición mixta*: Un inhibidor mixto también se fija en un sitio distinto al del sustrato, pero se une tanto a la enzima como al complejo Enzima-Sustrato (Nelson y Cox, 2006), por lo que la afinidad por la enzima libre será diferente y por lo tanto variarán tanto la K_m como la V_{max} sin proporcionalidad alguna.

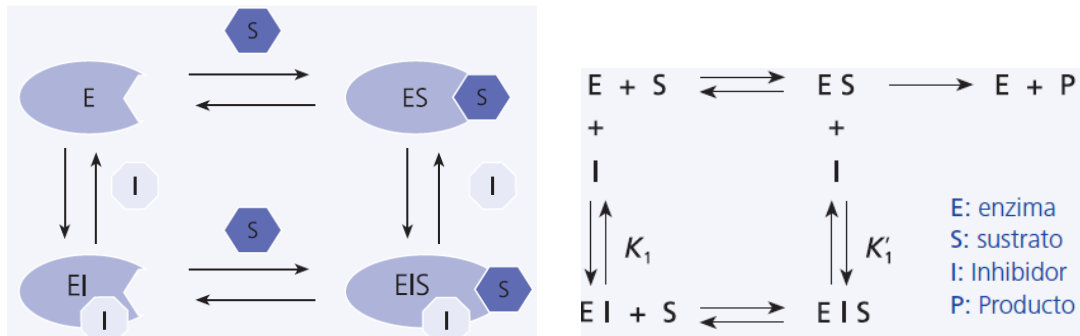


Figura 4. Equilibrios de unión a considerar en la inhibición mixta (Modificado de Nelson y Cox, 2006).

- *Inhibición no competitiva*: Es una variante de la inhibición mixta donde la afinidad por la enzima libre es igual a la afinidad por el complejo Enzima-Sustrato. Sólo se observa cambio en la V_{max} sin afectar la K_m .

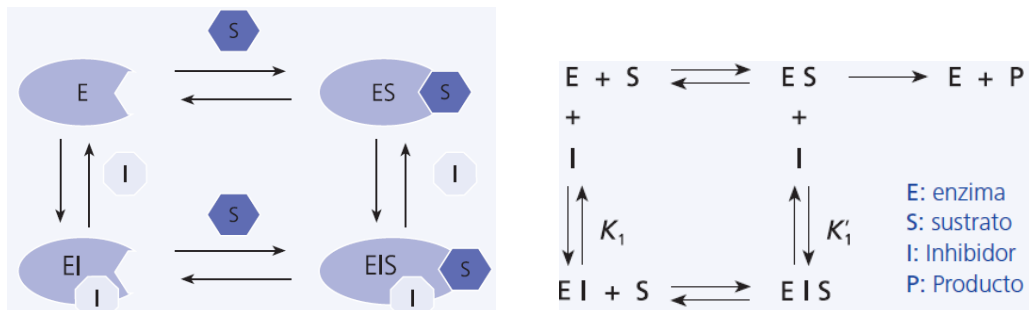


Figura 5. Equilibrios de unión a considerar en la inhibición no competitiva (Modificado de Nelson y Cox, 2006). Este tipo de inhibición es un caso particular de la inhibición mixta, donde K_1 tiene el mismo valor que K'_1 .

En el caso de los CYPs, la inhibición reversible se da principalmente por dos mecanismos: Alquilación del hemo y/o proteína y formación de un complejo metabólico intermedio. En este último, se produce una fuerte unión entre el metabolito y el estado reducido del hierro del grupo hemo, dando lugar al complejo metabólico intermedio, sin

actividad catalítica. La unión es fuerte, pero no se forman enlaces covalentes, por lo que puede revertirse bajo determinadas condiciones experimentales, como por ejemplo la adición de ferrocianida potásica (VandenBrink, 2010).

I.6 Jugo de toronja y su interacción con CYP

La ingesta del jugo de toronja se ha generalizado en la población debido a sus efectos antioxidantes, como agente quimioprotector o reducción de la placa aterosclerótica, entre otros que impactan en la salud de los individuos (Seden *et al.*, 2010). Además, el estudio de la interacción de éste con diversos fármacos ha tenido un incremento en los últimos años desde el primer reporte como un potente inhibidor de algunas isoformas del CYP.

El jugo de toronja no sólo inhibe el metabolismo mediado por CYP, sino que también inhibe la actividad de proteínas transportadoras que evitan la acumulación de sustancias tóxicas en la célula (Dresser *et al.*, 2002; Takanaga *et al.*, 1998). También, algunos de los componentes del jugo de toronja pueden modular la expresión de enzimas de fase II (Kleiner *et al.*, 2008).

Las moléculas más abundantes encontradas en el jugo de toronja son naringina, bergamotina y la dihidroxibergamotina, y todas han sido reportadas como inhibidores del CYP (De Castro *et al.*, 2006).

I.7 6,7-Dihidroxibergamotina como inhibidor de CYP

La bergamotina y la dihidroxibergamotina (Figura 6) son furanocumarinas encontradas en el jugo de toronja en concentraciones desde 1.0-36.6 y 0.22-52.6 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (De Castro *et al.*, 2006).

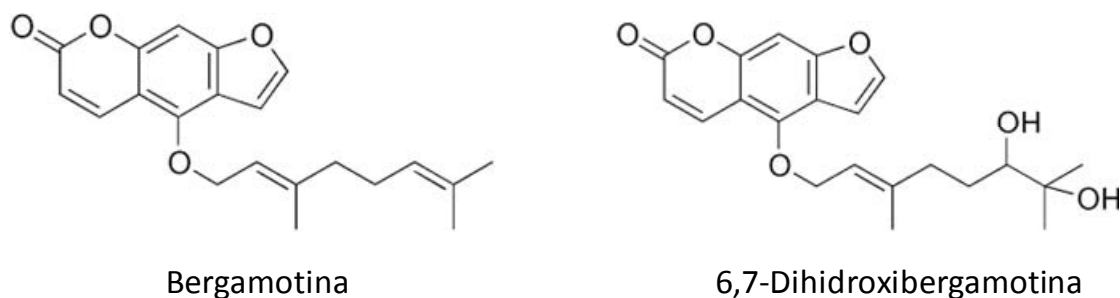


Figura 6. Estructura química de las furanocumarinas presentes en el jugo de toronja.

Los dímeros de estas furanocumarinas han sido catalogados como inhibidores potentes de la actividad de CYP3A4 (Fukuda *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2000; Tassaneeyakul *et al.*, 2000).

Se ha reportado que la dihidroxi-bergamotina muestra mayor potencia inhibitoria sobre CYP3A4, CYP2C9 y CYP2D6 comparada con la bergamotina (Girenavar *et al.*, 2007). Empleando microsomas hepáticos humanos se evaluó la actividad de CYP3A4, reportándose una CI_{50} de 1.58 μM para el primer compuesto (César *et al.*, 2009) y también se sabe que esa inhibición se debe a que se inhibe la actividad de la citocromo P450 reductasa (Araki *et al.*, 2012).

En los numerosos estudios enfocados en la inhibición de las familias de CYP, hay sólo algunos que exploran el posible efecto inhibitorio de la dihidroxi-bergamotina sobre las subfamilias CYP1A y 2B, las cuales son importantes debido a que están involucradas en el metabolismo de diversos mutágenos, carcinógenos y de algunos fármacos. Un ejemplo es el trabajo realizado por Olgún-Reyes y colaboradores (2012) donde se utilizaron microsomas hepáticos de ratas para evaluar la actividad de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2, determinándose una CI_{50} de 3.162 μM , 54.479 μM , 55.066 μM y 48.195 μM respectivamente; sin embargo, la caracterización bioquímica de su inhibición utilizando enzima purificada no ha sido reportada.

I.8 Naringenina como inhibidor de CYP

La naringina es un flavonoide encontrado en el jugo de toronja en concentraciones que van desde 174 a 1472 $\mu\text{mol/L}$ (De Castro *et al.*, 2006) y puede ser metabolizada por la α -ramnosidasa y la β -glucosidasa a naringenina (Figura 7), molécula que inhibe la actividad de CYP3A4 en estudios *in vivo* (Fuhr y Kummert, 1995; Kane y Lipsky, 2000).

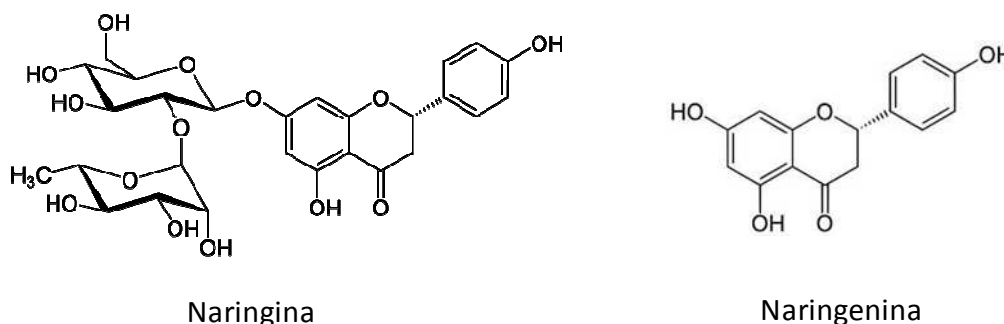


Figura 7. Estructura química de la naringina y su aglicona (naringenina).

Experimentos *in vitro* utilizando microsomas de hígado humano mostraron que la naringenina tiene una pobre inhibición sobre la actividad de CYP3A4 y CYP1A2 en comparación con el efecto inhibitorio mostrado por el jugo de toronja (Bailey *et al.*, 1993; Edwards y Bernier, 1996; Fuhr *et al.*, 1993).

Por otro lado, Álvarez-González y colaboradores (2001) reportaron que la naringenina disminuye los micronúcleos inducidos por ifosfamida en ratón, mostrando un efecto quimiopreventivo *in vivo* asociado a la inhibición de Cyp3a.

Existe un gran número de trabajos enfocados en la inhibición de las familias de CYP por la naringenina (Tabla 1). Se sabe que dicha molécula es un inhibidor de tipo mixto empleando microsomas de hígados de ratas, con una constante de inhibición de la enzima libre (K_{iC}) de 2.40 μM (Moon *et al.*, 1998); no obstante, la caracterización bioquímica de su inhibición utilizando enzima purificada no ha sido reportada.

Tabla 1. CI_{50} de la naringenina para diferentes CYPs.

CYP	CI_{50} (μM)	OBSERVACIONES	MÉTODO	REFERENCIA
CYP3A4	8.8	Proteína recombinante humana.	6 β -Hidroxilación de testosterona.	Kimura <i>et al.</i> , 2010.
	420	Proteína recombinante humana. Compuesto aislado de <i>P. serotina</i> .	Adaptado y modificado del reportado por Crespi <i>et al.</i> , 1997.	Budzinski <i>et al.</i> , 2000.
CYP2C9	12.4	Proteína recombinante humana.	4'-Hidroxilación de diclofenaco.	Kimura <i>et al.</i> , 2010.
CYP1A1	≥ 100	Proteína recombinante humana.	Etoxirosorufin O-desetilasa (EROD)	Schwarz y Roots, 2003.
	15.167	Proteína recombinante humana.	EROD	Takemura <i>et al.</i> , 2010.
	> 0.4	5 \pm 5% de Inhibición. Microsomas hepáticos humanos.	Actividad Alcoxirosorufin O-desalquilasa	Doostdar <i>et al.</i> , 2000.
CYP1A2	> 0.4	25 \pm 15% de Inhibición. Microsomas hepáticos humanos.	Actividad Alcoxirosorufin O-desalquilasa	Doostdar <i>et al.</i> , 2000.
	26.339	Proteína recombinante humana.	EROD	Takemura <i>et al.</i> , 2010.
	182	Microsomas hepáticos humanos.	Cafeína N3-demetilación.	Lee <i>et al.</i> , 1998.
CYP1A1/2	58	Microsomas hepáticos de ratas. Inhibición mixta, $K_{app} = 28 \mu M$, $V_{max} = 35.8 \text{ nmol/min*mg prot}$, $K_{iC} = 2.40 \mu M$	Actividad etoxicumarina O-desetilasa	Moon <i>et al.</i> , 1998.
CYP1B1	3.656	Proteína recombinante humana.	EROD	Takemura <i>et al.</i> , 2010.
CYP19 (Aromatasa)	2	En células MCF-7aro.	Descrito por Grube <i>et al.</i> , 2001.	Ye <i>et al.</i> , 2012.
	3	En células MCF-7. Proteína recombinante humana.	Descrito por Grube <i>et al.</i> , 2001.	Li <i>et al.</i> , 2011.
	9.2	Microsomas de placenta humana.	Actividad 3 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (HSD) y 17 β -HSD	Le Bail <i>et al.</i> , 2000.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inactivación o inhibición de enzimas CYP puede conducir a la alteración del metabolismo de fármacos afectando su actividad biológica. Una posible causa de inhibición es que dos fármacos sean sustratos del mismo CYP y se produzca una competencia por su unión a la enzima. Así mismo, en determinadas ocasiones, uno de los compuestos puede bloquear o inactivar irreversiblemente la actividad del CYP que metaboliza al otro fármaco. En ambos casos se produce una elevación de los niveles circulantes de este último fármaco y, en el caso de aquellos con un índice terapéutico estrecho, da lugar a efectos adversos y/o toxicidad (Lin y Lu, 1998).

En contraparte, la inactivación de enzimas CYP también puede ser benéfica. Un ejemplo es la inhibición del potencial hepatocarcinogénico de la aflatoxina-1 por inhibición del CYP3A4, disminuyendo el riesgo de cáncer hepático. Por ello, es de gran relevancia explorar ambas facetas del efecto de agentes inhibitorios de CYP.

El jugo de toronja está considerado como un agente inhibitorio de CYP y ha sido estudiado ampliamente, principalmente el efecto de sus componentes mayoritarios sobre la actividad de CYP3A4. Sin embargo, no se ha hecho énfasis en el estudio de su actividad sobre otras isoformas, como CYP1A y CYP2B, importantes en el metabolismo y activación de xenobióticos, incluyendo procarcinógenos.

Así pues, en este trabajo se plantea que la dihidroxibergamotina y la naringenina, compuestos mayoritarios en el jugo de toronja, podrían inhibir la actividad de las subfamilias 1A y 2B del citocromo P450. Además, se pretende definir el tipo de inhibición que ejercen dichas moléculas sobre CYP1A1, pues a la fecha no se ha utilizado a la enzima purificada para realizar la caracterización bioquímica.

III. HIPÓTESIS

La dihidroxibergamotina y la naringenina, componentes mayoritarios del jugo de toronja, tendrán la capacidad de inhibir *in vitro* a CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2, isoenzimas importantes en el metabolismo de fármacos y xenobióticos.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el tipo de inhibición que ejercen la dihidroxibergamotina y la naringenina sobre las subfamilias 1A y 2B de los CYP450.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Inducir CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 en hígado de rata por tratamiento con fenobarbital y β -naftoflavona.
- Inducir CYP1A1 humano en un cultivo de *Escherichia coli* DH5 α transformada con el plásmido apropiado.
- Obtener la proteína microsomal hepática de los animales tratados.
- Obtener la fracción membranal bacteriana.
- Medir la actividad de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 en microsomas hepáticos de rata, así como la actividad CYP1A1 humano en la fracción membranal bacteriana, en presencia y ausencia de dihidroxibergamotina y naringenina.
- Caracterizar la cinética enzimática de CYP1A1 de rata y humano.
- Caracterizar la inhibición que la dihidroxibergamotina y naringenina presentan sobre CYP1A1, tanto humano como de rata.
- Determinar *in silico*, mediante estudios de acoplamiento molecular, las interacciones del sustrato e inhibidores con el CYP1A1 humano y de rata.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Sustancias químicas

El fenobarbital (FB) fue adquirido de ABBOTT Laboratories de México (Distrito Federal, México). La β -naftoflavona (β -NF), la etoxirresorufina, la metoxirresorufina, la pentoxirresorufina, la benciloxirresorufina, la 6,7-dihidroxi bergamotina (DHB) y la naringenina (NAR) se adquirieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis MO, USA). Las isoenzimas recombinantes de rata y humano CYP1A1 sobreexpresadas en células de insecto infectadas con baculovirus (Supersome[®]) se adquirieron en BD Gentest (Wobourn, MA, USA).

VI.2 Inducción del CYP1A y CYP2B en rata

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

Los días 1, 2 y 3 se les administró 60 mg/kg de FB vía intraperitoneal a las cuatro ratas por inducir; el día 3, además, se les administró 80 mg/kg de β -NF vía intraperitoneal y el día 4 se redujo la dosis de FB administrada a 30 mg/kg.

A la rata testigo se le administraron 200 μ L de aceite de maíz los cuatro días. El día 5 todos los animales de experimentación se sacrificaron por dislocación cervical (Matsushima, *et al.*, 1976).

VI.3 Obtención de la fracción microsomal

Después del sacrificio por dislocación cervical, se extrajo el hígado y, posteriormente, se lavó con agua estéril procurando retirar la mayor cantidad de

hemoglobina, después se colocó en una solución de KCl 0.15 M a razón de 3 mL por gramo de hígado.

Cada hígado se cortó en partes pequeñas, se homogenizó y se hizo una mezcla del homogenado correspondiente a los animales tratados.

La mezcla anterior se centrifugó a 9 000 g por 10 min a 4 °C. El hígado de la rata control se procesó de igual manera.

El sobrenadante obtenido se centrifugó a 100 000 g por 60 min a 4 °C. El botón resultante se homogenizó con una solución de fosfatos 0.1 M pH 7.4 y sacarosa 0.25 M y se centrifugó a 100 000 g por 60 min a 4 °C.

El botón resultante se resuspendió en una solución de fosfatos 0.1 M pH 7.4, ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) 1 mM, ditiotreitól 0.1 mM y glicerol 20% v/v (Maron y Ames, 1983).

La fracción microsomal obtenida se distribuyó en alícuotas que se almacenaron a -80 °C para su posterior uso y determinación de proteína total mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

VI.4 Expresión de CYP1A1 humano en *Escherichia coli*

Para la expresión de CYP1A1 humano se utilizaron las cepas construidas y donadas por el Dr. Peter Guengerich. Esta cepa corresponde a bacterias *E. coli* DH5 α que poseen el vector pCW en donde fue insertado el gen de interés (Guo *et al.*, 1994).

Las células de *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido de interés se siembran en agar Luria Bertani (LB) y se dejan crecer 24 h a 37 °C. Posteriormente, se toma una colonia aislada que es usada para inocular 10 mL de medio LB y se deja crecer toda la noche a 37 °C (16 h). Este precultivo se utiliza para inocular 1 L de medio Terrific Broth (TB) suplementado con 1 mM de tiamina, incubándose durante 5 h a 30 °C y agitación de 150 rpm. Pasado este tiempo, se adiciona el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y ácido delta aminolevulínico (ALA) a una concentración final de 0.5 mM para inducir la expresión y se deja incubando con agitación constante durante 20 h a 30 °C, 150 rpm.

VI.5 Obtención de la fracción membranal bacteriana

El cultivo de *E. coli* preparado como se describió anteriormente se coloca en hielo y se recolecta la biomasa por centrifugación a 4 000 g durante 15 min a 4 °C.

El botón resultante se resuspende en amortiguador A (solución 0.1 M de Tris-acetato, pH 7.6, conteniendo 0.5 M de sacarosa y 0.5 mM de EDTA) a razón de 5 mL de amortiguador por cada 100 mL cultivo, luego se diluye 2 veces con agua y se adiciona la lisozima hasta una concentración final de 0.1 mg/mL, se agita ligeramente e incuba en hielo durante 30 min.

Los esferoplastos resultantes se recuperan por centrifugación a 40 000 g durante 15 min a 4 °C y se resuspende el botón resultante con amortiguador B (solución de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.4, conteniendo 6 mM de acetato de magnesio, 20% v/v de glicerol y 10 mM de 2-mercaptoetanol) a razón de 2 mL de amortiguador por cada 100 mL de cultivo.

Se adicionan inhibidores de proteasas hasta concentraciones finales de 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 2 µM de leupeptina, 1 µM de bestatina y 0.04 U/mL de aprotinina.

Posteriormente, se lisan las células en hielo usando un sonicador de aguja al 70% de su capacidad máxima, a intervalos de 1 min durante 10 min.

El lisado se centrifuga a 10 000 g por 20 min a 4 °C, recuperando el sobrenadante que es sometido a una centrifugación a 100 000 g durante 90 min.

Finalmente, se resuspende el botón en el mínimo volumen de amortiguador B, se hacen alícuotas que se almacenan a -80 °C para su posterior uso y determinación del contenido de proteína por el método de Bradford.

VI.6 Determinación de la actividad enzimática

La evaluación de la actividad enzimática se realizó mediante la capacidad de O-desalquilasa que poseen los CYPs. Los sustratos utilizados fueron etoxirresorufina (actividad EROD, etoxirresorufina O-desetilasa) para CYP1A1, metoxirresorufina (actividad MROD, metoxirresorufina O-desmetilasa) para CYP1A2, pentoxirresorufina

(actividad PROD, pentoxirresorufina O-desalquilasa) para CYP2B1 y benciloxirresorufina (actividad BROD, benciloxirresorufina O-desalquilasa) para CYP2B2, que son metabolizados por las respectivas enzimas y tienen como producto común a la resorufina, compuesto cuantificable mediante fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm..

Se realizó una curva patrón con resorufina a concentraciones de 25, 50, 125, 250, 500, 1250 y 2500 fM. La curva patrón se hizo mezclando la cantidad correspondiente de resorufina en amortiguador a pH 7.6 (Tris-base 50 mM y MgCl₂ 25 mM) en un volumen final de 200 µL.

La reacción enzimática se llevó a cabo en una mezcla de amortiguador pH 7.6 (Tris-base 50 mM y MgCl₂ 25 mM), 1 µM del sustrato correspondiente (disuelto en DMSO), la cantidad necesaria de proteína (80 µg de proteína microsomal hepática para la determinación de CYP1A1, CYP2B1 y CYP2B2, mientras que para CYP1A2 se utilizaron 200 µg. Para CYP1A1 humano se emplearon 40 µg de la fracción membranal bacteriana) y en su caso, el inhibidor (Naringenina o DHB) disuelto en DMSO.

La mezcla se incubó por 3 min a 37 °C. Posteriormente se comenzó la reacción enzimática al adicionar NADPH 50 µM (disuelto en amortiguador). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 200 µL.

La formación del producto se evaluó durante 15 min a 37 °C registrando lecturas cada 20 s en el fluorómetro Synergy H4. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

Las determinaciones de actividad enzimática para cada concentración de inhibidor se realizaron por triplicado y los resultados de actividad se expresan en porcentaje respecto a la actividad del control, donde cada punto es el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar. Se determinó la concentración de inhibidor que disminuye la actividad enzimática al 50% (Concentración Inhibitoria Media, CI₅₀) a través del análisis de las curvas de concentración-efecto utilizando el programa GraphPad Prism 6 para Windows. Se realizó un ajuste no lineal de los datos a la siguiente ecuación para un inhibidor parcial (Copeland, 2000):

$$\text{Actividad respecto al control} = \frac{\text{Actividad máxima} - \text{Actividad mínima}}{1 + \frac{[I]}{CI_{50}}} + \text{Actividad mínima}$$

Donde Actividad máxima es la actividad enzimática respecto al control a la concentración de inhibidor más baja probada, Actividad mínima es la actividad enzimática respecto al control a la concentración de inhibidor más alta probada, [I] corresponde a la concentración de inhibidor y CI_{50} es la concentración inhibitoria media.

VI.7 Determinación de la cinética enzimática

La evaluación de la actividad enzimática se realizó mediante la capacidad de O-desetilasa que posee el CYP1A1. El sustrato utilizado fue etoxirresorufina.

La cinética enzimática de CYP1A1 se llevó a cabo en una mezcla de amortiguador pH 7.6 (Tris-base 50 mM y $MgCl_2$ 25 mM), diferentes concentraciones del sustrato correspondiente (0.16, 0.31, 0.62, 0.94, 1.25, 3.75 y 5 μM) disuelto en DMSO (menos del 5% del volumen final), 10 pmol/mL de CYP1A1 recombinante de rata o humano (Supersome®).

Para la cinética de inhibición se emplearon diferentes concentraciones de naringenina y de DHB.

Las determinaciones de actividad enzimática para cada concentración de inhibidor en presencia de distintas concentraciones de sustrato se realizaron por triplicado y los resultados se expresan en pmol de resorufina formada por minuto por mg de proteína (pmol resorufina/min*mg proteína).

Para la determinación de los parámetros cinéticos V_{max} , K_m y K_i se utilizó el programa GraphPad Prism 6 para Windows, ajustando por regresión no lineal los datos de velocidad inicial de reacción en función de la concentración de sustrato en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de inhibidor a las siguientes ecuaciones:

Ecuación de Michaelis-Menten

$$V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

Inhibición competitiva

$$V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

Inhibición no competitiva

$$V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Inhibición mixta

$$V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{iC}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iU}}\right)}$$

Inhibición acompetitiva

$$V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iU}}\right)}$$

Donde V es la velocidad inicial de reacción, [S] es la concentración de sustrato, [I] corresponde a la concentración de inhibidor, K_{iC} es la constante de inhibición de la enzima libre y K_{iU} indica la constante de inhibición del complejo enzima-sustrato.

El tipo de inhibición asignado fue aquél que presentó mayor coeficiente de correlación y menor valor absoluto de la suma de errores al cuadrado derivados del ajuste no lineal.

El patrón de inhibición fue ilustrado con el gráfico de dobles recíprocos.

VI.8 Evaluación *in silico* de la interacción del sustrato e inhibidores con CYP1A1

Las estructuras químicas de los ligandos fueron tomadas de la base de datos ChemSpider de la Real Sociedad de Química. Posteriormente, se revisaron y optimizaron con el programa Maestro 9.6.

La estructura tridimensional del CYP1A1 humano se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (PDB, 4I8V.pdb) y fue modificada empleando el programa PyMOL para eliminar el ligando con el que se co-cristalizó. También se buscó la secuencia de aminoácidos en el servidor del National Center for Biotechnology (NCBI) con número de

acceso NP_000490.1 para realizar el alineamiento global con la secuencia de aminoácidos del CYP1A1 de rata (NP_036672.2) empleando la herramienta EMBOSS Needle.

Por otro lado, dado que no existe una estructura del CYP1A1 de rata obtenida por cristalografía de rayos X, se procedió a realizar su modelado por homología con CYP1A1 humano. Para ello, la secuencia proteica de CYP1A1 de rata se sometió al programa en línea de modelado de proteínas de la Universidad de California, San Francisco, denominado ModWeb para generar el modelo tridimensional correspondiente. El grupo hemo fue añadido después por superposición del modelo de CYP1A1 de rata con la estructura cristalográfica del CYP1A1 humano.

La incorporación de todos los átomos de hidrógeno no polares y la asignación de las cargas Gasteiger a las proteínas y a los ligandos fue realizada con el programa AutoDock Tools (ADT) versión 1.5.6 para generar los archivos pdbqt correspondientes. A partir de éstos, empleando el programa AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010), se llevó a cabo la obtención de los archivos que contienen las conformaciones tridimensionales de los ligandos con las macromoléculas, donde se eligieron aquéllas que presentaron las energías de unión calculadas más negativas.

Todos los cálculos fueron hechos para proteína fija y ligando flexible empleando el algoritmo genético lamarckiano. El sitio del acoplamiento molecular para el CYP1A1 humano fue establecido con las siguientes dimensiones del centro en X: -25.056, Y: 86.952, Z: -9.42 Å, con un espaciamiento de 1.0 Å, tamaño de X: 30, Y: 30, Z: 30 Å. Para CYP1A1 de rata fueron para el centro en X: -19.043, Y: 39.378, Z: -35.731 Å, con un espaciamiento de 1.0 Å, tamaño de X: 30, Y: 30, Z: 30 Å.

Los programas PyMOL y Maestro 9.6 fueron empleados para el análisis de los resultados del acoplamiento molecular y la preparación de las figuras correspondientes.

VII. RESULTADOS

VII.1 Determinación del efecto de la naringenina sobre la actividad enzimática de CYP de rata

Las actividades enzimáticas que se muestran en la Figura 8 se determinaron en presencia de diferentes concentraciones de naringenina, empleando microsomas de hígados de ratas tratadas con FB y β -NF. Para CYP1A1, CYP2B1 y CYP2B2 se observa que la naringenina tiene efecto inhibitorio dependiente de la concentración, mientras que para CYP1A2 a la concentración más alta probada, únicamente se logra la disminución de la actividad enzimática hasta un 80 ± 1 % con respecto al control.

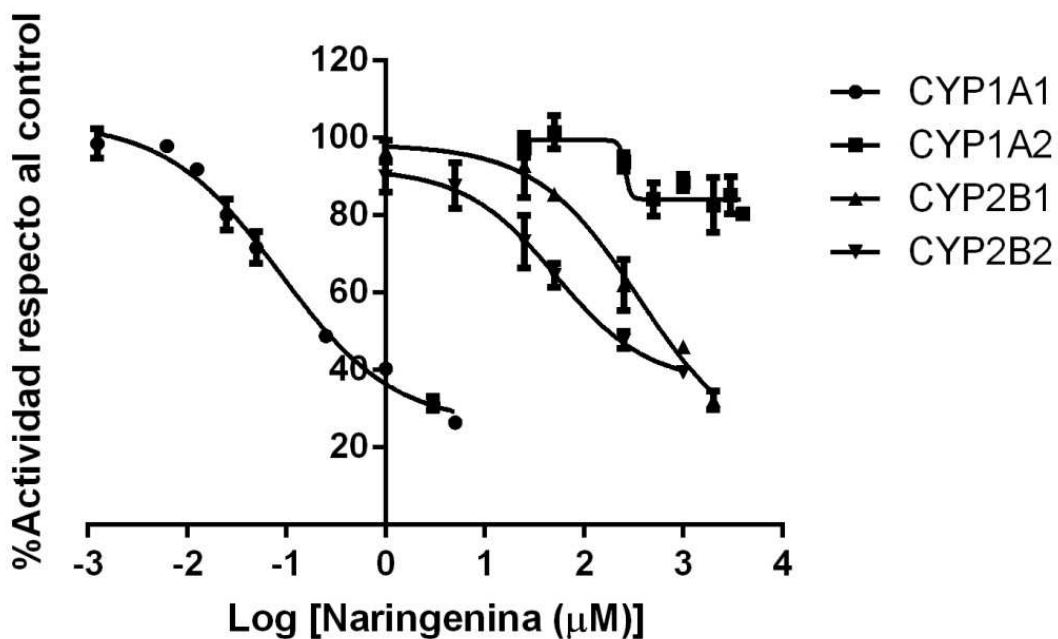


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de naringenina sobre la actividad de CYP de rata: CYP1A1 (\bullet), CYP1A2 (\blacksquare), CYP2B1 (\blacktriangle), CYP2B2 (\blacktriangledown). La naringenina es un inhibidor parcial de las enzimas evaluadas. Cada punto es el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar, al igual que en las gráficas siguientes.

VII.2 Concentración inhibitoria media (CI₅₀) de la naringenina sobre CYP de rata

En la Tabla 2 se muestra la concentración necesaria de naringenina para inhibir el 50% de la actividad enzimática (CI₅₀) de cada enzima evaluada.

Tabla 2. CI₅₀ de la naringenina sobre CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 de rata.

Enzima	CI ₅₀ (μM)
CYP1A1	0.09 ± 0.01
CYP1A2	> 4000 (80 ± 1 % de actividad)
CYP2B1	351 ± 2
CYP2B2	52 ± 1

Aquí se observa una aparente selectividad del CYP1A1 de rata por la naringenina (CI₅₀ más baja).

VII.3 Determinación del efecto de la naringenina sobre la actividad enzimática de CYP1A1 de rata

En la Figura 9 se muestra el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten por regresión no lineal de la velocidad inicial de reacción de CYP1A1 a diferentes concentraciones de etoxirresorufina. Del ajuste de los datos se determinó una V_{max} de 6165 ± 100 pmol/min*mg proteína y una K_m de 0.35 ± 0.02 μM. De igual manera podemos observar el efecto inhibitorio de varias concentraciones de naringenina (40, 60, 80, 100, 120, 200 y 400 nM) sobre la actividad de CYP1A1 de rata.

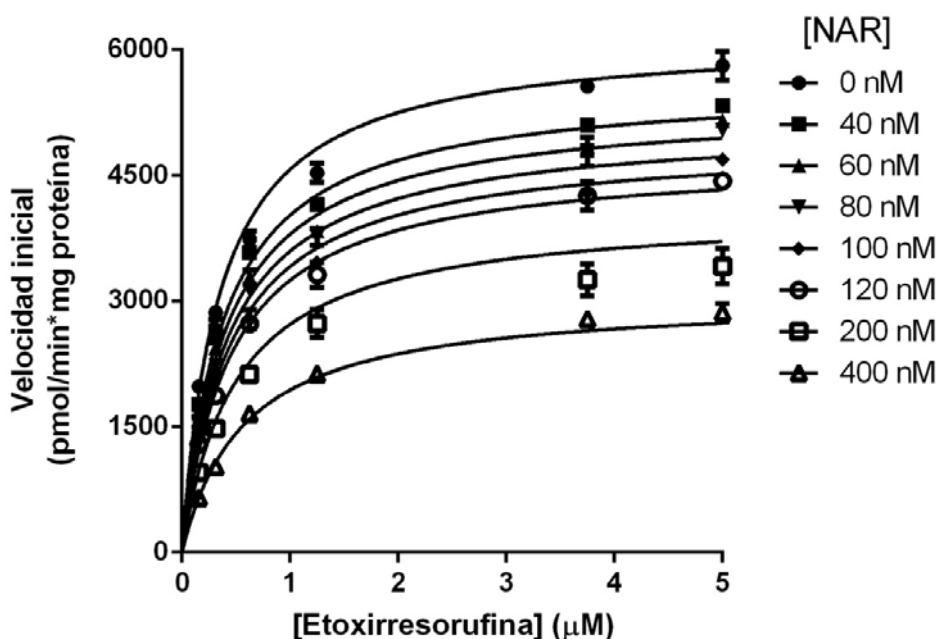


Figura 9. Efecto inhibitorio de la naringenina sobre la actividad de CYP1A1 de rata. Gráficos de velocidad inicial de reacción del CYP1A1 en ausencia y presencia del inhibidor que muestra el ajuste a la ecuación de inhibición mixta.

Del ajuste de datos a las ecuaciones de velocidad inicial en presencia de diferentes tipos de inhibidor se determinó que la naringenina es un inhibidor de tipo mixto de esta enzima (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la naringenina sobre CYP1A1 de rata.

Parámetro	Inhibición competitiva	Inhibición no competitiva	Inhibición mixta	Inhibición acompetitiva
Coefficiente de correlación al cuadrado	0.9273	0.9577	0.9888	0.9672
Suma de errores al cuadrado (valor absoluto)	6.4×10^6	1.7×10^5	4.6×10^4	2.9×10^6
Vmax (pmol/min*mg proteína)	ND	ND	6165 ± 100	ND
Km (μM)	ND	ND	0.35 ± 0.02	ND
Ki _C (nM)	ND	ND	172 ± 18	ND
Ki _U (nM)	ND	ND	391 ± 16	ND

Donde ND es no determinado

En la Figura 10 se esquematiza que la naringenina afecta la afinidad por el sustrato y la velocidad máxima de reacción, al observarse una intersección de las rectas en el segundo cuadrante del gráfico de dobles recíprocos (Figura 10).

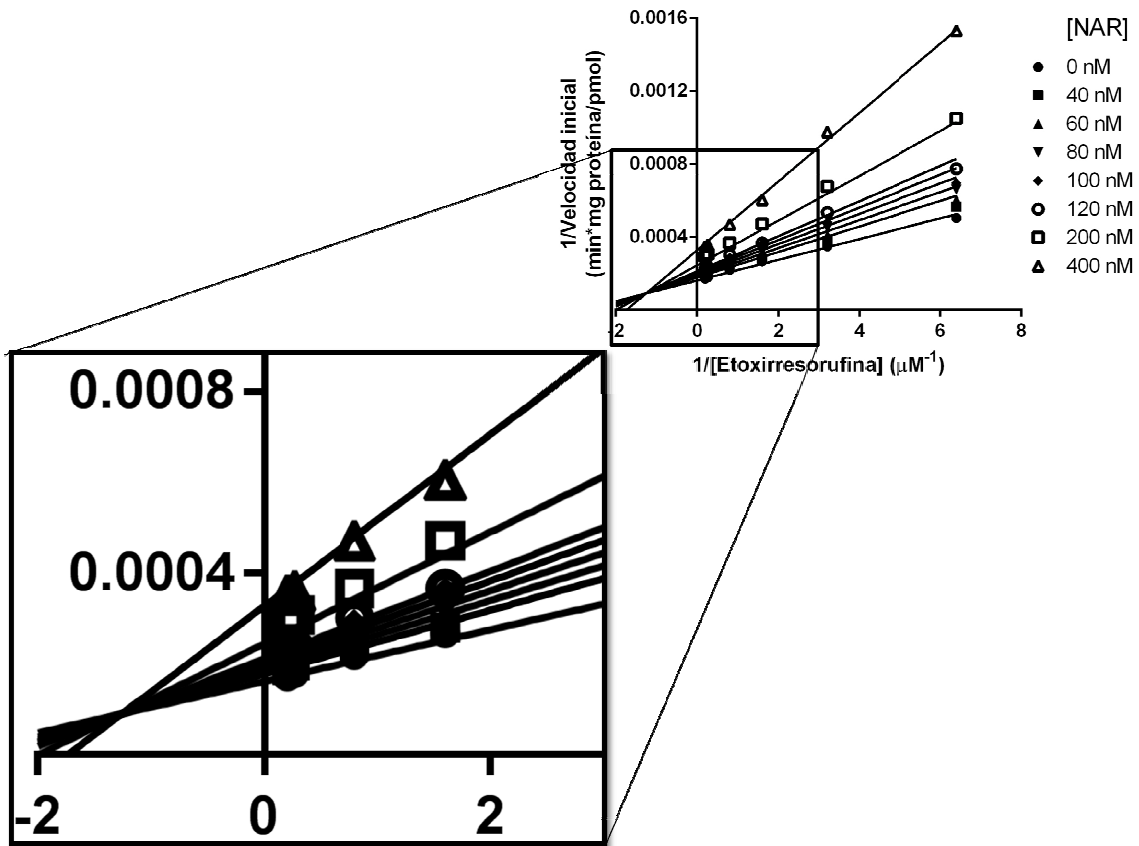


Figura 10. Inhibición de la actividad de CYP1A1 de rata por la naringenina. Gráfico de dobles recíprocos que muestra la intersección de las rectas en el segundo cuadrante (inhibición mixta).

Al tratarse de una inhibición mixta se pueden calcular dos constantes de inhibición que determinan la afinidad del inhibidor por distintas formas de la enzima: para la unión del inhibidor con la enzima libre se denominará K_{iC} y para la unión con el complejo enzima-sustrato se nombrará como K_{iU} , cuyos valores se encuentran en la Tabla 3 (K_{iC} de 172 ± 18 nM y K_{iU} de 391 ± 16 nM).

VII.4 Concentración inhibitoria media (CI₅₀) de la naringenina sobre CYP1A1 humano

En la Figura 11 se muestra el efecto dependiente de la concentración de naringenina sobre la actividad enzimática de CYP1A1 humano. Se determinó un valor para la CI₅₀ de $361 \pm 1 \mu\text{M}$.

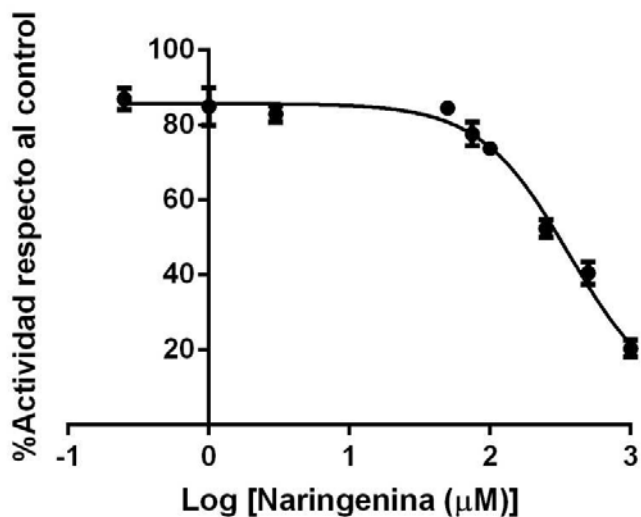


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de naringenina sobre la actividad de CYP1A1 humano. La naringenina es un inhibidor parcial de esta enzima.

VII.5 Determinación del efecto de la naringenina sobre la actividad enzimática de CYP1A1 humano

En la Figura 12 podemos observar el ajuste por regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten de la velocidad inicial de reacción de CYP1A1 humano a diferentes concentraciones de etoxirresorufina, donde se calculó una V_{max} de $92 \pm 1 \text{ pmol/min} \cdot \text{mg proteína}$ y una K_m de $0.13 \pm 0.01 \mu\text{M}$.

En la Figura 12 se representa el efecto inhibitorio de la naringenina sobre la actividad de CYP1A1 humano, demostrándose con la regresión no lineal que este compuesto es un inhibidor de tipo competitivo de la enzima evaluada con una K_i de $489 \pm 22 \mu\text{M}$ (Tabla 4). En el gráfico de dobles recíprocos se observa la intersección de las rectas en el eje de las ordenadas (Figura 13), es decir, no se modifica la velocidad máxima de la reacción por la presencia del inhibidor.

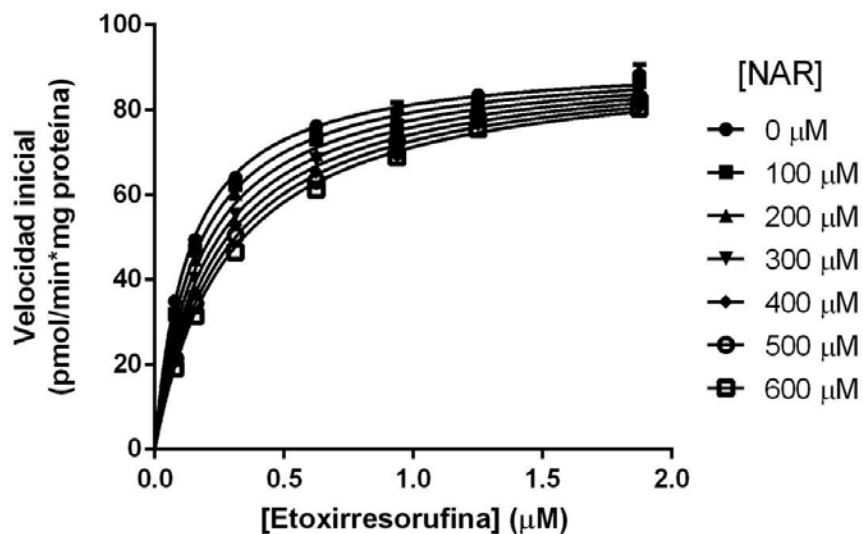


Figura 12. Efecto inhibitorio de la naringenina sobre la actividad de CYP1A1 humano. Gráfico de velocidad inicial de reacción de CYP1A1 en ausencia y presencia del inhibidor que muestra el ajuste a la ecuación de inhibición competitiva.

Tabla 4. Parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la naringenina sobre CYP1A1 humano.

Parámetro	Inhibición competitiva	Inhibición no competitiva	Inhibición mixta	Inhibición acompetitiva
Coefficiente de correlación al cuadrado	0.9912	0.9727	0.9912	0.9624
Suma de errores al cuadrado (valor absoluto)	541	1684	541	2315
Vmax (pmol/min*mg proteína)	92 ± 1	ND	92 ± 1	ND
Km (μM)	0.13 ± 0.01	ND	0.13 ± 0.01	ND
K _i (μM)	489 ± 22	ND	489 ± 184	ND
K _i (μM)	ND	ND	4.3×10^{20}	ND

Donde ND es no determinado

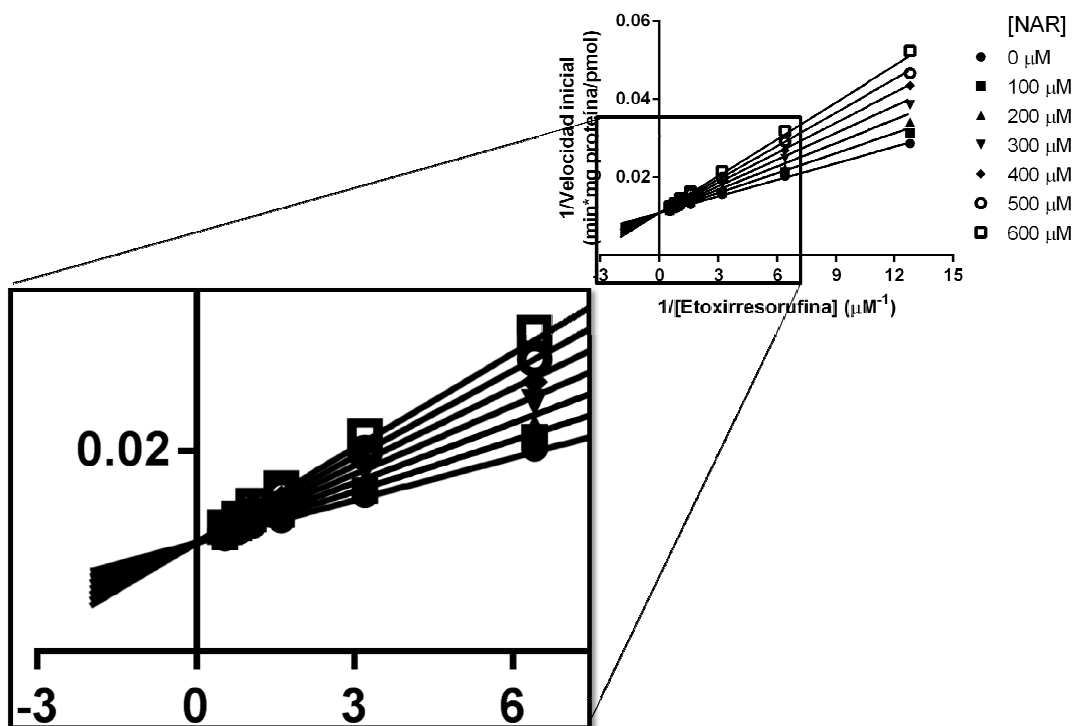


Figura 13. Inhibición de la actividad de CYP1A1 humano por la naringenina. Gráfico de dobles recíprocos que muestra la intersección de las rectas en el eje de las ordenadas (inhibición competitiva).

En la Tabla 5 se muestra un resumen de los parámetros cinéticos determinados en presencia y ausencia de la naringenina sobre la O-desalquilación de la etoxirresorufina mediada por CYP1A1.

Tabla 5. Resumen de los parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la naringenina sobre CYP1A1.

	Características	CYP1A1 Humano	CYP1A1 Rata
Etoxrresorufina (Sustrato)	Vmax (pmol/min*mg proteína)	92 ± 1	6089 ± 134
	Km (μM)	0.13 ± 0.01	0.37 ± 0.03
Naringenina (Inhibidor)	Tipo de Inhibición	Competitiva	Mixta
	K_{iC} (μM)	489 ± 22	0.17 ± 0.02
	K_{iU} (μM)		0.39 ± 0.02

Al comparar los valores de V_{max} se observa que existe diferencia en el metabolismo de la etoxirresorufina por ambas enzimas.

De igual forma, también existe diferencia en el tipo de inhibición ejercida por la naringenina en ambos modelos biológicos, donde esta molécula presenta inhibición de tipo competitivo en humano y tipo mixto en rata. Esto indica que puede haber variaciones entre ambas proteínas, lo que provocaría un acomodo tridimensional distinto del flavonoide con posible influencia en el mecanismo y potencia de inhibición.

VII. 6 Determinación del efecto de la DHB sobre la actividad enzimática de CYP de rata

La Figura 14 muestra el efecto inhibitorio dependiente de la concentración de dihidroxi bergamotina sobre la actividad enzimática de los CYPs evaluados.

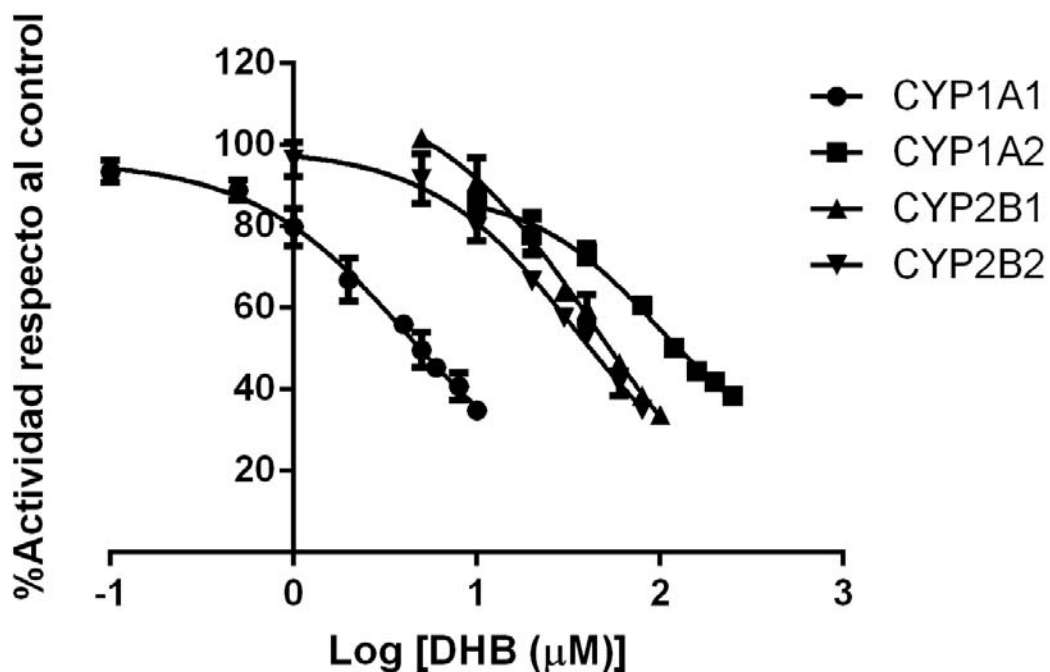


Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de DHB sobre la actividad de CYP de rata: CYP1A1 (\bullet), CYP1A2 (\blacksquare), CYP2B1 (\blacktriangle), CYP2B2 (\blacktriangledown). La DHB es un inhibidor parcial de las enzimas evaluadas.

VII.7 Concentración inhibitoria media (CI₅₀) de la DHB sobre CYP de rata

En la Tabla 6 se resumen los valores de concentración inhibitoria media de la DHB para diferentes CYPs, donde se observa una inhibición preferencial de CYP1A1 de rata.

Tabla 6. CI₅₀ de la DHB sobre CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 de rata.

Enzima	CI ₅₀ (μM)
CYP1A1	4.2 ± 0.2
CYP1A2	96 ± 1
CYP2B1	43 ± 1
CYP2B2	35 ± 1

VII.8 Determinación del efecto de la DHB sobre la actividad de CYP1A1 de rata

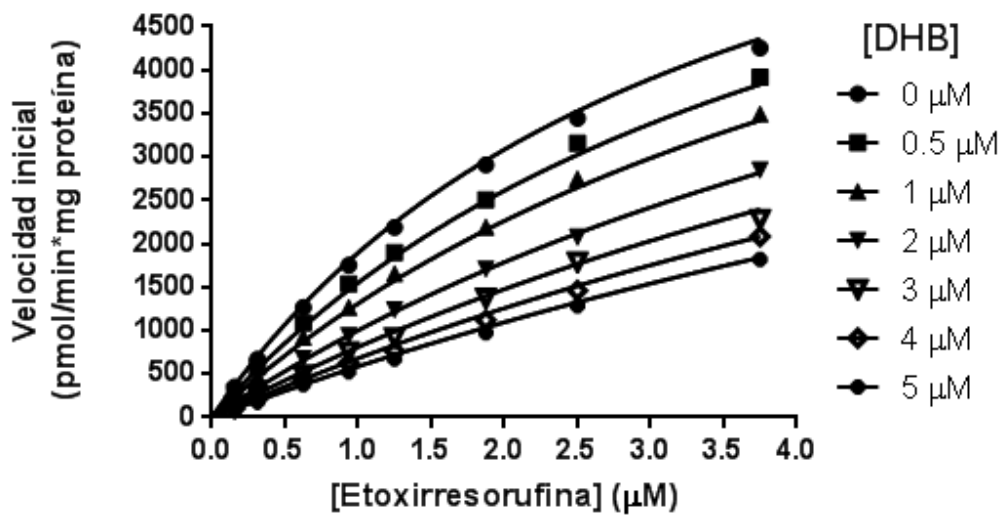


Figura 15. Efecto inhibitorio de la DHB sobre la actividad de CYP1A1 de rata. Gráfico de velocidad inicial de reacción en presencia de diferentes concentraciones de DHB que muestra el ajuste a la ecuación de inhibición competitiva.

La DHB es un inhibidor competitivo de CYP1A1 de rata, con una K_i de $1.73 \pm 0.03 \mu\text{M}$ (Tabla 7). En la Figura 16 se ilustra que no modifica la velocidad máxima de la reacción de *O*-desalquilación de la etoxirresorufina mediada por la enzima.

Tabla 7. Parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la DHB sobre CYP1A1 de rata.

Parámetro	Inhibición competitiva	Inhibición no competitiva	Inhibición mixta	Inhibición acompetitiva
Coefficiente de correlación al cuadrado	0.9973	0.9936	0.9973	0.9622
Suma de errores al cuadrado (valor absoluto)	6.4×10^5	1.5×10^6	6.4×10^5	8.9×10^6
Vmax (pmol/min*mg proteína)	8260 ± 119	ND	8272 ± 141	ND
Km (μM)	3.36 ± 0.08	ND	3.36 ± 0.08	ND
K _i (μM)	1.73 ± 0.03	ND	1.73 ± 0.06	ND
K _i (μM)	ND	ND	370 ± 234	ND

Donde ND es no determinado

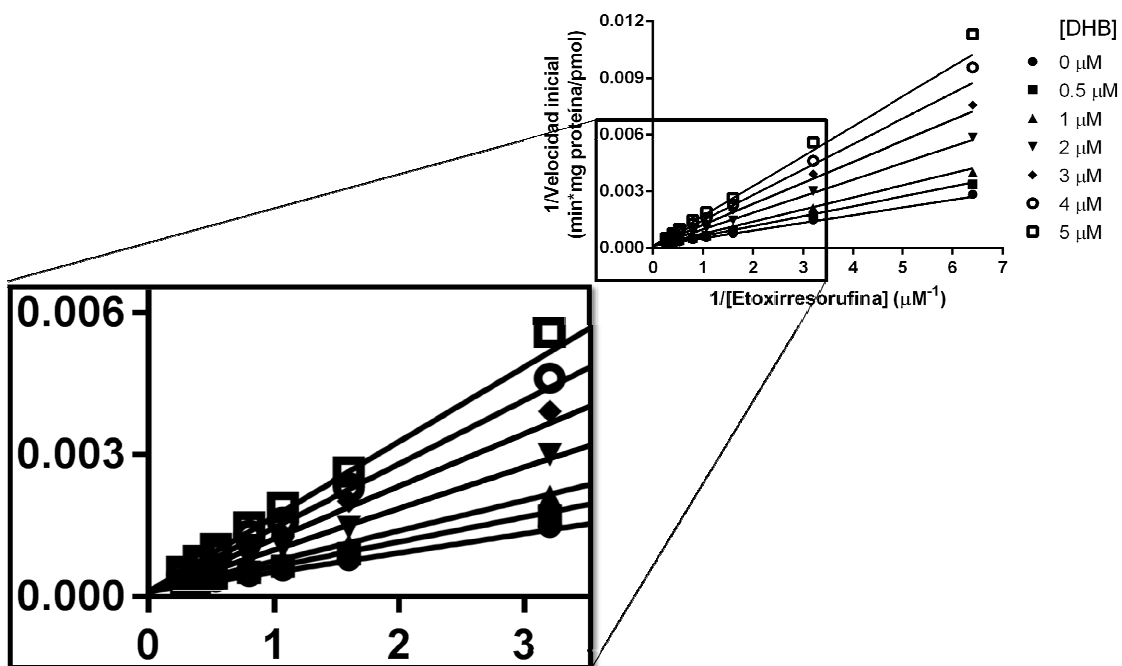


Figura 16. Inhibición la actividad de CYP1A1 de rata por la DHB. Gráfico de dobles recíprocos que ilustra la inhibición competitiva (intersección de las rectas en el eje de las ordenadas).

VII.9 Concentración inhibitoria media (CI₅₀) de la DHB sobre CYP1A1 humano

En la Figura 17 se muestra el comportamiento dependiente de la concentración de DHB sobre la actividad enzimática de CYP1A1 humano (CI₅₀ de 66 ± 1 μM).

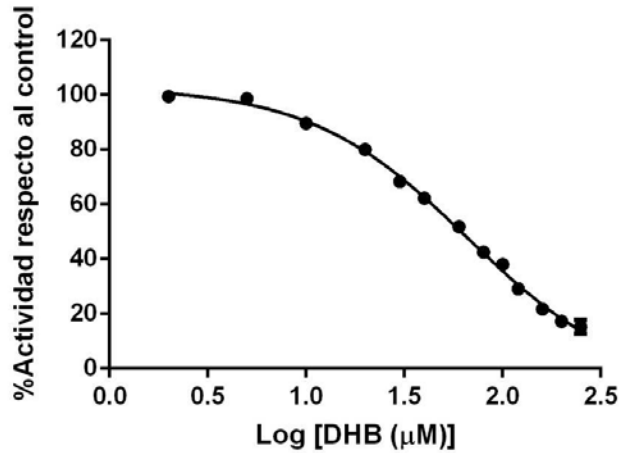


Figura 17. Efecto de diferentes concentraciones de DHB sobre la actividad de CYP1A1 humano. La DHB es un inhibidor parcial de la enzima evaluada.

VII.10 Determinación del efecto de la DHB sobre la actividad de CYP1A1 humano

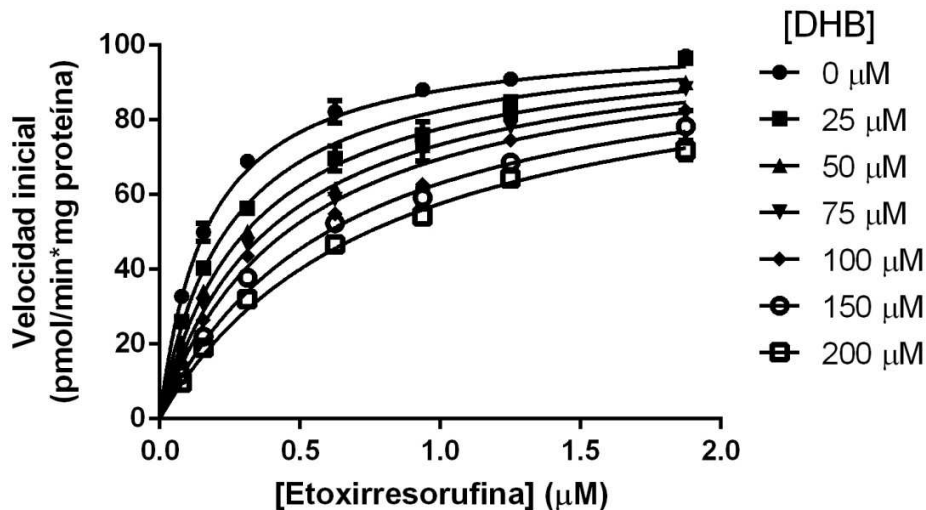


Figura 18. Efecto inhibitorio de la DHB sobre la actividad de CYP1A1 humano. Gráfico de velocidad inicial de reacción en presencia de diferentes concentraciones de DHB que muestra el ajuste a la ecuación de inhibición competitiva.

La Figura 19 ilustra que la DHB no afecta la velocidad máxima de reacción (intersección de las rectas en el eje de las ordenadas). La regresión no lineal demuestra que es un inhibidor competitivo de CYP1A1 humano, con una K_i de $55 \pm 2 \mu\text{M}$ (Tabla 8).

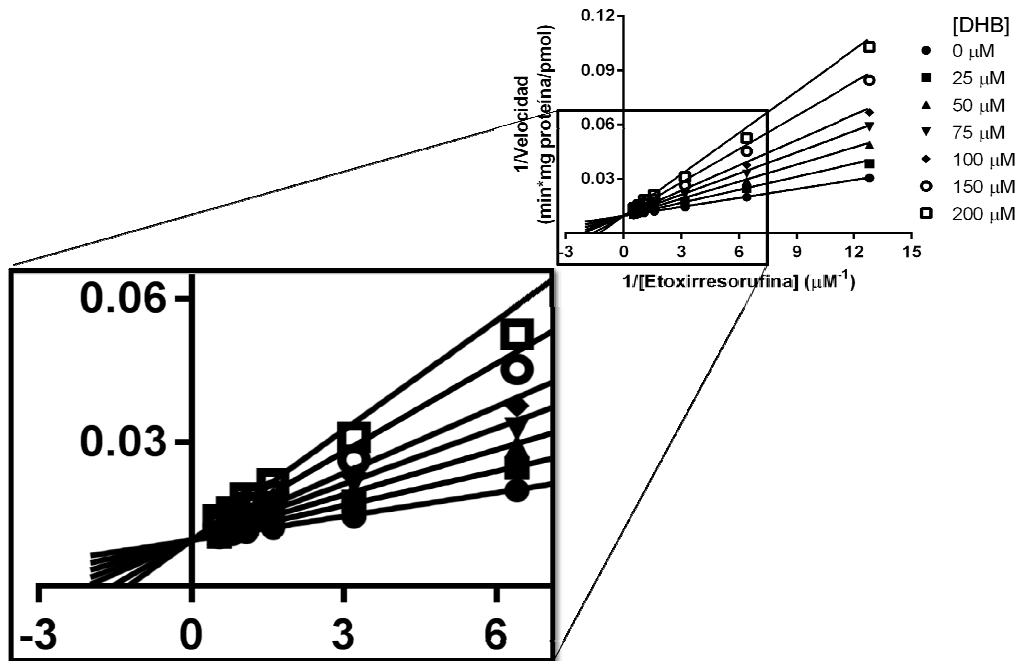


Figura 19. Inhibición la actividad de CYP1A1 humano por la DHB. Gráfico de dobles recíprocos que muestra una inhibición competitiva (intersección de las rectas en el eje de las ordenadas).

Tabla 8. Parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la DHB sobre CYP1A1 humano.

Parámetro	Inhibición competitiva	Inhibición no competitiva	Inhibición mixta	Inhibición acompetitiva
Coefficiente de correlación al cuadrado	0.9867	0.9621	0.9868	0.9386
Suma de errores al cuadrado (valor absoluto)	1591	4549	1579	7365
Vmax (pmol/min*mg proteína)	103 ± 1	ND	104 ± 1	ND
Km (μM)	0.17 ± 0.01	ND	0.17 ± 0.01	ND
K _i (μM)	55 ± 2	ND	59 ± 4	ND
K _i (μM)	ND	ND	5762 ± 2343	ND

Donde ND es no determinado

En la Tabla 9 se muestra un resumen de los parámetros cinéticos determinados en presencia y ausencia de la DHB sobre la O-desalquilación de la etoxirresorufina mediada por CYP1A1.

Tabla 9. Resumen de los parámetros cinéticos determinados para la inhibición de la DHB sobre CYP1A1.

	Características	CYP1A1 Humano	CYP1A1 Rata
Etoxicresorufina (Sustrato)	Vmax (pmol/min*mg proteína)	103 ± 1	8260 ± 119
	Km (µM)	0.17 ± 0.01	3.36 ± 0.08
DHB (Inhibidor)	Tipo de Inhibición	Competitiva	Competitiva
	Ki (µM)	55 ± 2	1.73 ± 0.03

En este caso, la DHB muestra el mismo tipo de inhibición en los dos modelos biológicos evaluados; no obstante, se determinó un valor de Ki más pequeño sobre CYP1A1 de rata (mayor afinidad por esta enzima), lo cual sugiere que el compuesto podría presentar energías de interacción ligeramente distintas con el sitio activo del CYP1A1 de ambos organismos.

VII.11 Comparación de las estructuras tridimensionales de CYP1A1 humano y de rata

Debido a las diferencias encontradas en el tipo de inhibición ejercida por la naringenina y DHB sobre el CYP1A1 humano y de rata, se decidió explorar, a través de un análisis *in silico*, la forma en que podrían interaccionar estas moléculas con las proteínas de interés. Primero se analizaron las secuencias de aminoácidos de ambas enzimas, encontrándose un porcentaje de identidad del 77.5%, donde se observa que la mayoría de las diferencias se encuentran en los aminoácidos iniciales y centrales de la secuencia de ambas proteínas, algunas de las cuales corresponden al sitio catalítico (Figura 20).

```

Identity:      406/524 (77.5%)
Similarity:   461/524 (88.0%)
Gaps:         12/524 ( 2.3%)

Query    1  ----MLFPISMSATEFLLASVIFCLVFWVIRASRPQVPKGLKNPPGPWGW      46
          . . | . . . | | | . | | . . . | | . | | | : | . : | . . | | | | | : | | | | | .
Sbjct    1  MPSVYGFPAFTSATELLLAVTTFCLGFVVVRVTRTWVPKGLKSPGPWGL      50

Query    47  PLIGHMLTLGKNPHLALSRRMSQQYGDVLRIGSTPVVVLSGLDTIRQAL      96
          | . : | | : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct    51  PFMGHVLTGKNPHLSLTKLSQQYGDVLRIGSTPVVVLSGLNTIKQAL      100

Query    97  VRQGDDFKGRPDLYTFTLISNGQSMSESPDSGPVWAARRRLAQNGLKSFS      146
          | : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct   101  VKQGDDFKGRPDLYSFTLIANGQSMTEPNDSGPLWAARRRLAQNALKSFS      150

Query   147  IASDPASSTSCYLEEHVSKAEVLI STLQELMAGPGHFNPYRIVVY SVTN      196
          | | | | | . . . : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct   151  IASDPTLASSCYLEEHVSKAEYLI SKFQKLMAEVGHFDPFKYL VVY SVAN      200

Query   197  VICAICFGRRYDHNHQELLSLVNINNNFGEVVVSGNPADFIPIILRYLPNP      246
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct   201  VICAICFGRRYDHDDQELLSIVNLSNEFGEVTVSGYPADFIPIILRYLPNS      250

Query   247  SLNAFKD LNEKFYSFMQKMVKEHYKTFEKGHIRDITDSLIEHCQEKQLDE      296
          | | : | | | | | : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct   251  SLDAFKD LNKKFYSFMKKLIKEHYRTFEKGHIRDITDSLIEHCQDRRLDE      300

Query   297  NANVQLSDEKINIVLDLFGAGFDVTITAI SWSLMYLVMNPRVQRKIQEE      346
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct   301  NANVQLSDDKVIITIVFDLFGAGFDVTITAI SWSLMYLVTNPRIQRKIQEE      350

Query   347  LDTVIGRRRPRLSDRSHLPYMEAFILETFRHSSFVLEETIPIHSTTRDTSL      396
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct   351  LDTVIGRDRQPRLSDRPQLPYLEAFILETFRHSSFVLEETIPIHSTIRDTSL      400

Query   397  KGFYIPKGRCVFVNQWQINHDQKLWVNPSEFLPERFLTPDGAIDKVLSEK      446
          . | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct   401  NGFYIPKGHCVFVNQWQVNHQELWGDPNFRPERFLTSSGTLDKHLSEK      450

Query   447  VIIFGMGKRKCIGETIARWEVFLFLAILLQRVEFSVPLGVKVDMTPIYGL      496
          | | : | | : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct   451  VILEGLGKRKCIGETIGRLEVFLFLAILLQQMEFNVSPGEKVDMTPIAYGL      500

Query   497  TMHACCEHFQMLRS----- 512
          | : | | . | | | | | | | : | | |
Sbjct   501  TLHARCEHFQVQMRSSGPQHLQA 524

```

Figura 20. Alineamiento de secuencias de aminoácidos del CYP1A1 humano (Query) y de rata (Sbjct). En recuadros se muestran los residuos que forman parte del sitio catalítico del CYP1A1 humano.

Como se ha hecho notar con anterioridad, al observar las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de ambas enzimas, se pensó que éstas podrían afectar la estructura tridimensional de las proteínas o las dimensiones del sitio catalítico y por ende, el reconocimiento del ligando.

A pesar de los esfuerzos realizados por cristalizar el CYP1A1 de rata, todavía no ha sido posible conocer su estructura, por ello las herramientas bioinformáticas resultan de gran relevancia. Los resultados del modelado computacional predicen que las estructuras de ambos CYPs son similares; sin embargo, el modelo tridimensional sugiere la presencia de modificaciones en la proximidad de las hélices y asas hacia el grupo hemo que es esencial para la catálisis (Figura 21), las cuales pueden tener repercusión en la orientación de los ligandos en el sitio activo de las enzimas evaluadas.

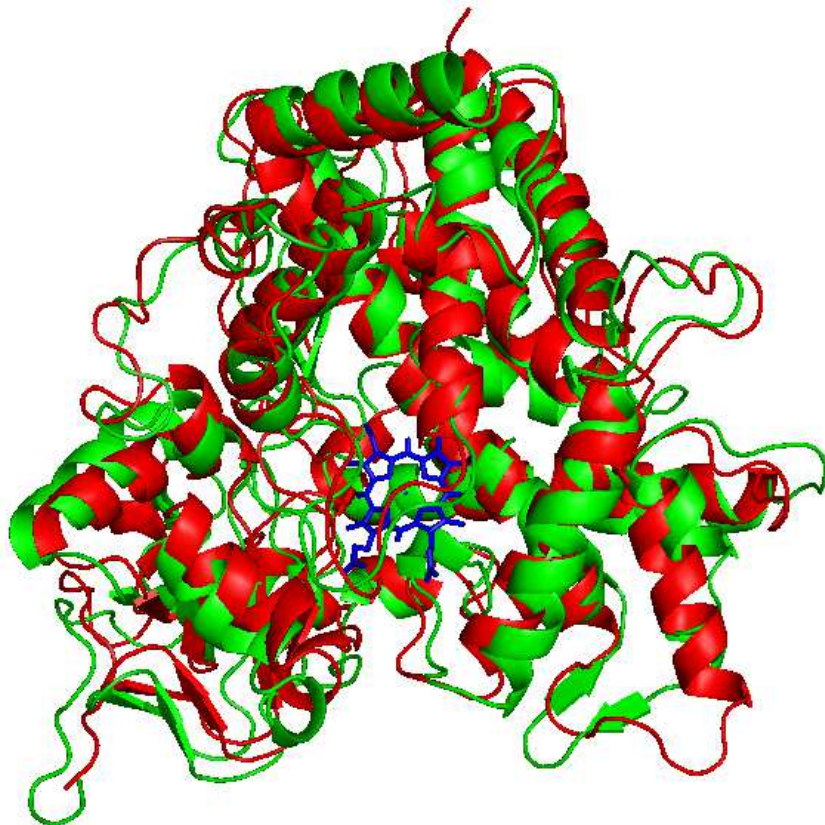


Figura 21. Superposición de la estructura tridimensional del CYP1A1 humano (4I8V.pdb, en color rojo) y el modelo obtenido en este trabajo para el CYP1A1 de rata (verde). El grupo hemo se representa en color azul.

De manera general, se presentarán las interacciones promedio del sustrato e inhibidores con ambos modelos de CYP1A1 (Tabla 10).

Tabla 10. Interacciones de los ligandos con CYP1A1

LIGANDO	CYP1A1 HUMANO		CYP1A1 DE RATA	
	ENERGÍA DE UNIÓN (Kcal/mol)	INTERACCIONES	ENERGÍA DE UNIÓN (Kcal/mol)	INTERACCIONES
ER	-9.5	SER122, PHE123, PHE224, GLY316, ALA317, ILE386, LEU496	-9.0	ILE119, PHE127, PHE228, PHE255, GLY320, ALA321, LEU500
α -NF	-9.0	SER122, PHE123, ASN222, PHE224, PHE258, ASP313, GLY316, ALA317, PHE319, ASP320, THR321, ILE386, LEU496	-5.4	SER115, ILE119, THR126, PHE127, PHE228, THR232, PHE255, GLY320, ALA321, THR325, VAL386, PHE388, THR389, ILE390, LEU500, HEMO
NAR	-8.4	SER122, PHE123, ASN222, PHE224, PHE258, GLY316, ALA317, PHE319, ASP320, VAL382, LEU496, THR497, HEMO	-5.5	ILE119, ALA120, SER124, THR126, PHE127, THR232, ASN259, GLY320, ALA321, THR389, ILE390, LEU500, HEMO
DHB	-7.5	ILE115, SER116, SER120, SER122, PHE123, ASN222, PHE224, GLY225, PHE258, LEU312, ASP313, GLY316, ALA317, PHE319, ASP320, ILE386, LEU496, LYS499	-7.2	ILE119, ALA120, ANS121, THR126, PHE127, PHE228, THR232, PHE255, ANS259, PHE262, PHE316, GLY320, ALA321, ASP324, THR325, VAL386, PHE388, THR389, ILE390, LEU500, THR501, HEMO

Donde ER: Etoxiirresorufina, α -NF: α -naftoflavona, NAR: Naringenina y DHB: Dihidroxibergamotina.

VII.12 Evaluación *in silico* de la interacción de la etoxirresorufina con CYP1A1

Con la finalidad de predecir las interacciones entre el sustrato y el CYP1A1, se procedió a realizar el ensayo de acoplamiento molecular de la enzima de rata y humano con la etoxirresorufina, cuya representación tridimensional se muestra en la Figura 22.

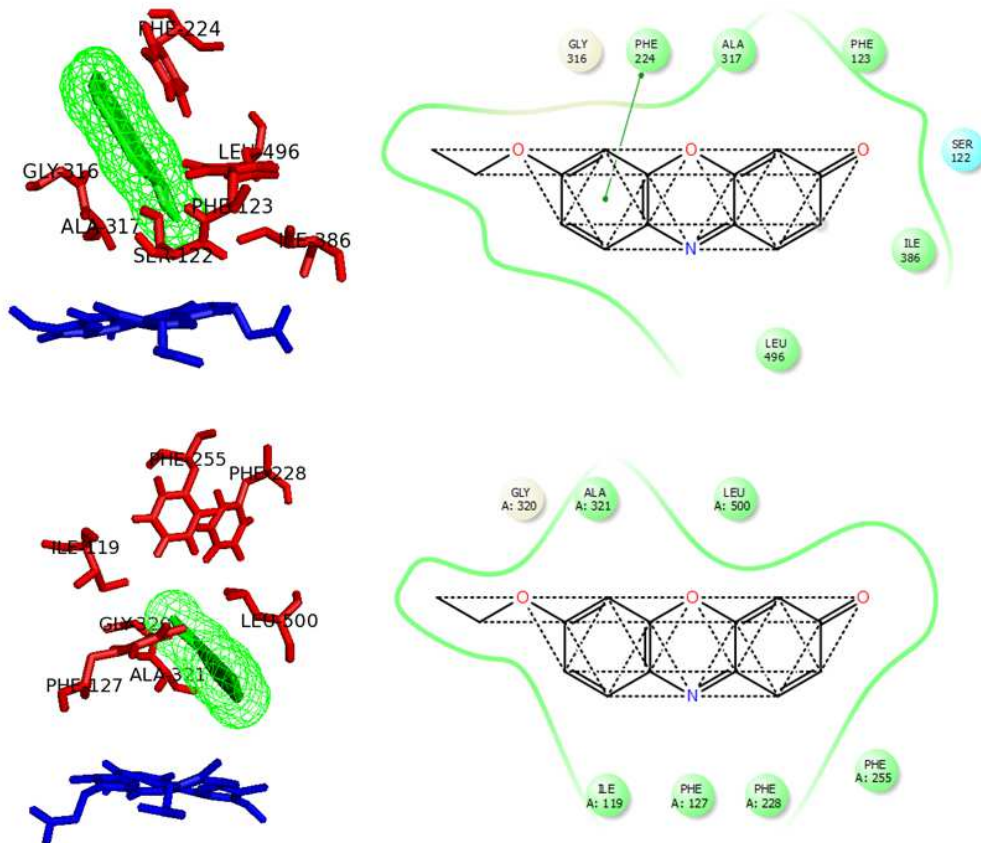


Figura 22. Interacciones de la etoxirresorufina con CYP1A1 humano (panel superior) y con el modelo de CYP1A1 de rata obtenido en este trabajo (panel inferior). El grupo hemo se representa en color azul y el ligando en verde. A la derecha se muestran los diagramas de interacción obtenidos con el programa Maestro 9.6.

Con el modelado molecular se pudo plantear que se favorece energéticamente la interacción del sustrato con el sitio catalítico de la enzima. Los residuos que parecen ser los responsables de la orientación y unión de la etoxirresorufina con el CYP1A1 de rata se encuentran en la Tabla 10, los cuales concuerdan con los reportados en estudios previos (Lewis *et al.*, 1999); sin embargo, las interacciones encontradas en

este trabajo pueden ser más cercanas a la realidad, ya que se construyó el modelo de CYP1A1 de rata por homología con la estructura cristalográfica de CYP1A1 humano, que no estaba disponible en el trabajo de Lewis y colaboradores.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en el modelo de rata se sugiere el predominio de las interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos y el sustrato, donde las fenilalaninas podrían jugar un papel primordial en el reconocimiento y orientación de la etoxirresorufina por el CYP1A1.

De igual manera, con el CYP1A1 humano se sugiere el mismo número de aminoácidos que interactúan con el sustrato (Tabla 10), predominando las interacciones con residuos hidrofóbicos como la Phe224.

La energía de unión de la etoxirresorufina con CYP1A1 humano con un valor más negativo sería un indicio de que el sustrato tendría más afinidad por esta enzima, lo cual se comprobó con los experimentos de cinética enzimática, donde se encontró una K_m menor para esta isoforma.

Las interacciones del ligando con CYP1A1 humano determinadas en este estudio concuerdan con las reportadas en trabajos previos (Lewis *et al.*, 2007 y Walsh *et al.*, 2013), sugiriendo que la interacción con los aminoácidos Ser122, Phe123, Phe224, Gly316, Ala317, Ile386 y Leu496 parece ser fundamental para la orientación y reconocimiento del sustrato.

VII.13 Evaluación *in silico* de la interacción de la alfa-naftoflavona con CYP1A1

Para determinar si el modelado molecular se estaba ejecutando de manera correcta se realizó el acoplamiento del inhibidor selectivo y ampliamente estudiado de CYP1A1, alfa-naftoflavona (α -NF), con las proteínas de interés.

A partir de lo anterior, se encontró que la α -NF podría unirse en el mismo sitio que el sustrato (Figura 23), lo que correlaciona con reportes previos que caracterizan a la molécula como un inhibidor competitivo de CYP1A1 de rata (Lewis *et al.*, 1999).

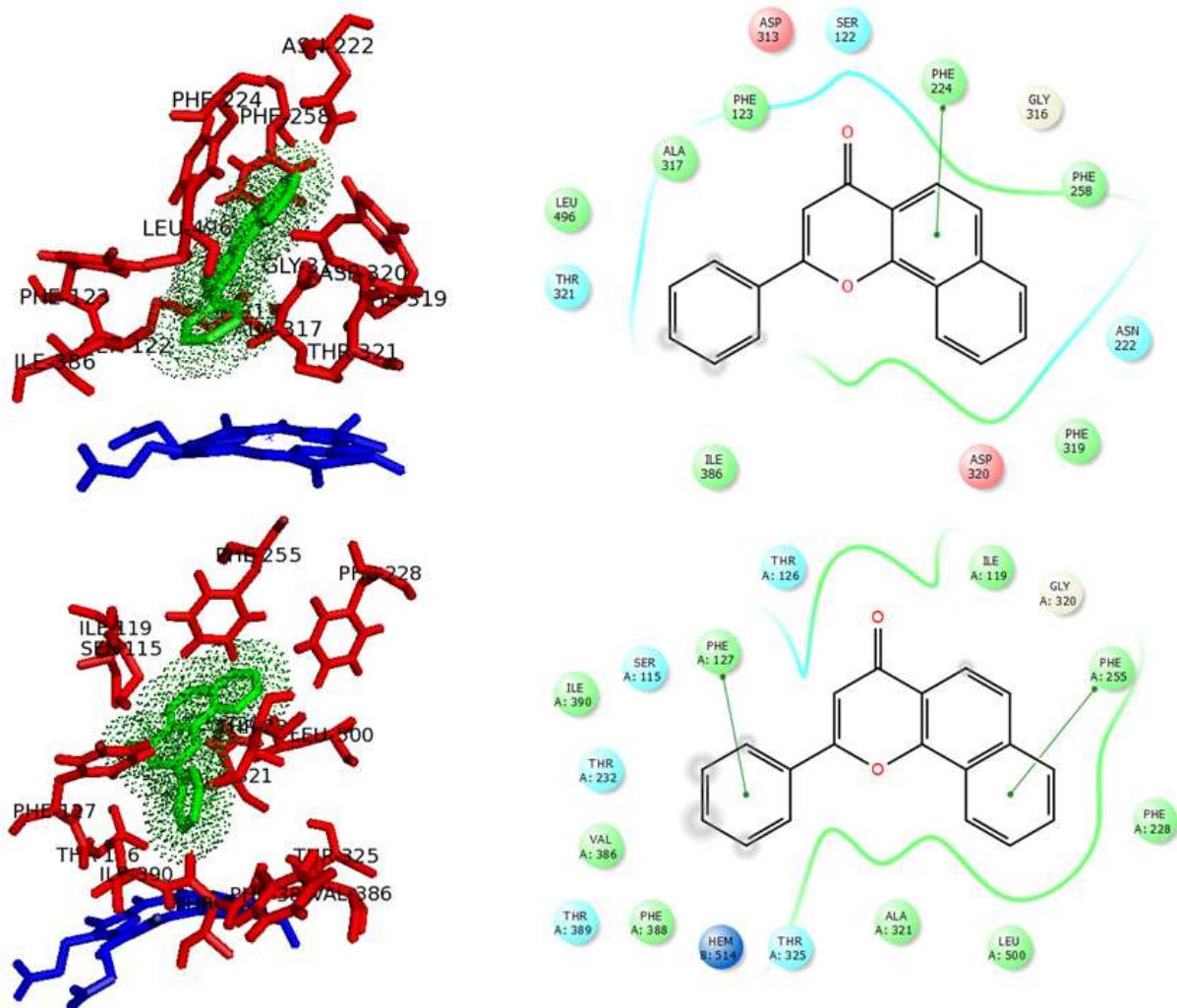


Figura 23. Interacciones de la α -naftoflavona con CYP1A1 humano (panel superior) y con el modelo de CYP1A1 de rata obtenido en este trabajo (panel inferior). El grupo hemo se representa en color azul y el ligando en verde.

Con CYP1A1 de rata, además de los aminoácidos hidrofóbicos, también podrían participar los aminoácidos polares como la Ser115, Thr126, Thr232, Thr325 y Thr389 en el reconocimiento del inhibidor (Tabla 10).

De igual forma, con el CYP1A1 humano, se sugiere que el inhibidor α -NF interactúa en el sitio catalítico, con el anillo rotable en dirección hacia el grupo hemo (Figura 23). En este modelo, las energías de unión son más negativas, por lo tanto, más fuertes en comparación con CYP1A1 de rata (Tabla 10), lo que correlaciona con

las diferencias interespecie encontradas en la potencia de inhibición de las moléculas evaluadas en este trabajo.

Por otro lado, en ambos modelos, se observa que la α -NF podría unirse prácticamente a los mismos residuos que el sustrato (Tabla 10), lo que explicaría el patrón de inhibición competitivo que presenta esta molécula.

VII.14 Evaluación *in silico* de la interacción de la naringenina con CYP1A1

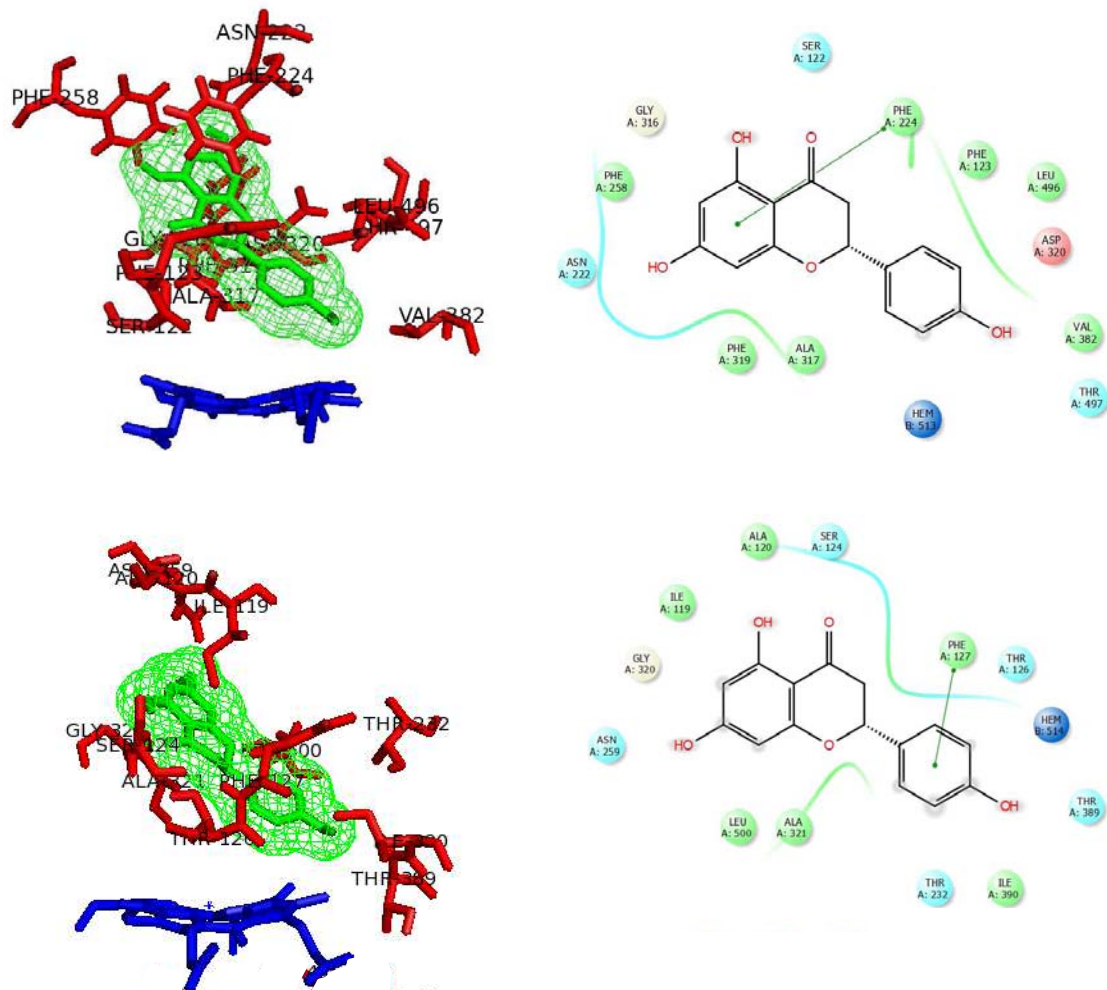


Figura 24. Interacciones de la naringenina con CYP1A1 humano (panel superior) y con el modelo de CYP1A1 de rata obtenido en este trabajo (panel inferior). El grupo hemo se representa en color azul y el ligando en verde.

El análisis *in silico* predijo que el flavonoide podría unirse en el sitio catalítico de CYP1A1 de humano y de rata de forma similar a la etoxirresorufina (Figura 24), por lo que habría una competencia entre ambos compuestos por ocupar este sitio.

En los ensayos *in vitro* se encontró que el inhibidor es más afín a CYP1A1 de rata en comparación con la etoxirresorufina (la K_i es menor que la K_m). No obstante, con el modelaje se determinaron energías de unión menores para la interacción de la naringenina con CYP1A1 de rata comparadas con el sustrato (Tabla 10).

En contraparte, la interacción de la naringenina con CYP1A1 humano produce una inhibición competitiva. En la Figura 24 se observan los resultados del acoplamiento molecular en esta enzima, donde una vez más se sugiere que el sitio preferencial de interacción corresponde al sitio de unión del sustrato. Lo anterior correlaciona con los patrones de inhibición determinados para el flavonoide, ya que al tener el mismo sitio de unión, ambos ligandos competirían por unirse al sitio catalítico. En la conformación tridimensional, la naringenina se orienta con su grupo rotatable cercano al grupo hemo, donde podría ser estabilizada por interacciones π - π con la Phe224 que forma parte del sitio catalítico. Este comportamiento es parecido al determinado para el análisis *in silico* de otro tipo de flavonoides sobre CYP1A2 y CYP2C9 de humano (Sousa *et al.*, 2013), donde se sugiere que estos compuestos podrían actuar como sustratos de estas isoformas, que al ser metabolizados podrían resultar en moléculas con propiedades bioquímicas diferentes.

Cuando se analizan los aminoácidos que parecen estar involucrados en la interacción del CYP1A1 humano con la naringenina (Tabla 10), estos también corresponden a residuos, en su mayoría hidrofóbicos, que podrían interactuar con el sustrato, lo cual podría explicar el comportamiento competitivo encontrado para la molécula. Además, correlacionan con los sugeridos por Androutsopoulos y colaboradores (2011) para otros flavonoides: Ile115, Ser122, Phe 224, Phe258, Leu312 y Leu496.

VII.15 Evaluación *in silico* de la interacción de la DHB con CYP1A1

La interacción de la DHB con CYP1A1 de rata corresponde a una inhibición competitiva, lo que correlaciona bien con las predicciones obtenidas mediante el modelado molecular, donde se favorece la unión de la DHB en el sitio catalítico (Figura 25).

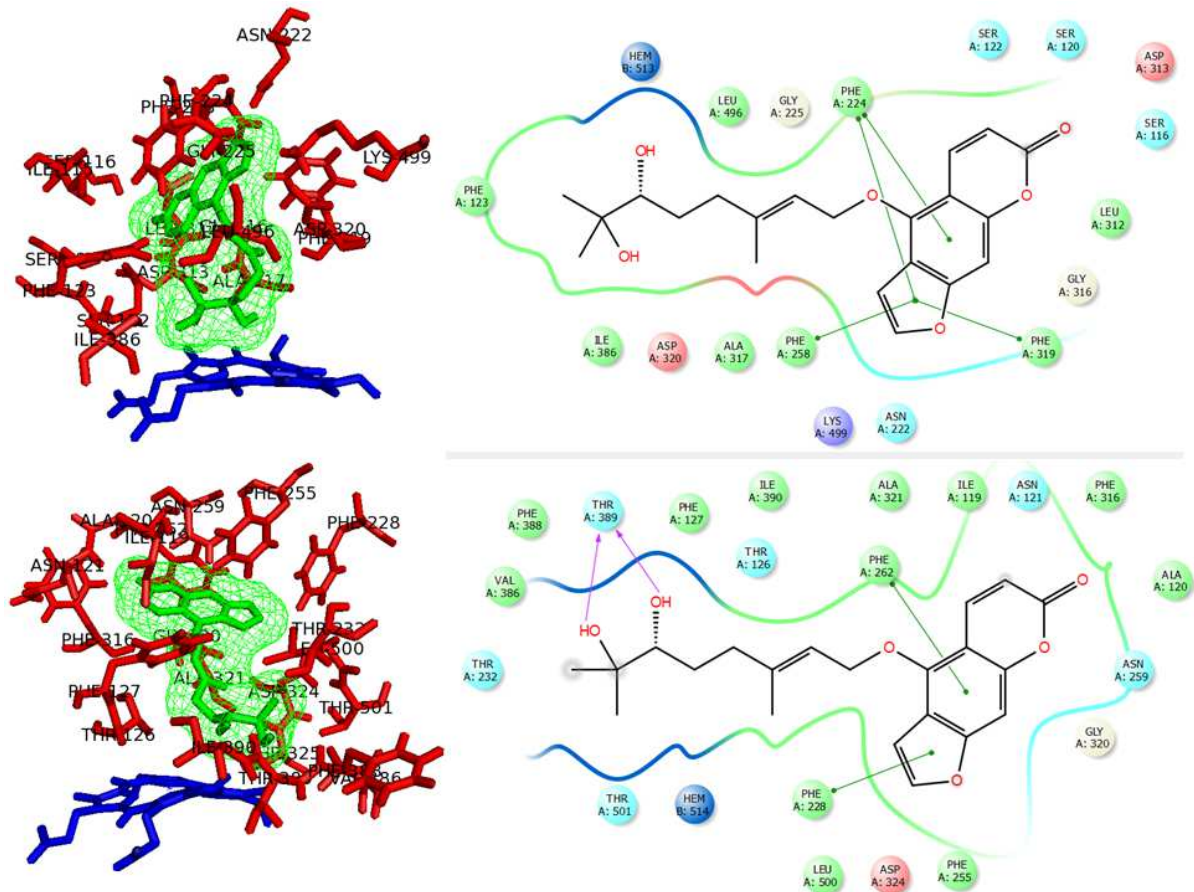


Figura 25. Interacciones de la DHB con CYP1A1 humano (panel superior) y con el modelo de CYP1A1 de rata obtenido en este trabajo (panel inferior). El grupo hemo se representa en color azul y el ligando en verde.

El análisis *in silico* predice un mayor número de residuos involucrados en la orientación y unión de la DHB con el CYP1A1 de rata (Tabla 10), siendo en su mayoría de naturaleza hidrofóbica. También, se puede observar que la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y la Thr389 podría ser importante para estabilizar a la molécula en el sitio catalítico.

De igual forma, la DHB resultó ser un inhibidor de tipo competitivo de CYP1A1 humano. Al observar la Figura 25, se puede sugerir que esta molécula podría unirse al sitio catalítico de la enzima impidiendo la entrada del sustrato, donde las interacciones de tipo π - π entre los anillos aromáticos del inhibidor con los residuos Phe224, Phe258 y Phe319 parecen ser fundamentales para la orientación de la DHB.

Ahora, al comparar el número de residuos que podrían estar involucrados en la interacción de DHB con CYP1A1, se observa que existe un mayor número de aminoácidos del CYP1A1 de rata que podrían interactuar con la molécula en comparación con aquéllos pertenecientes al CYP1A1 humano (Tabla 10). Esto correlaciona con el hecho de que la inhibición de la DHB es más fuerte en el CYP1A1 de rata (K_i menor en este modelo).

Finalmente, al hacer la superposición de la posible interacción de los ligandos con CYP1A1 de rata y humano (Figura 26), se muestra de manera más clara como los inhibidores se podrían unir al mismo sitio donde interactúa el sustrato con la enzima, por lo que quedan mejor explicados los patrones de inhibición determinados en este trabajo. A su vez, este comportamiento da lugar a sugerir que algunos de los inhibidores probados pueden ser sustratos del CYP1A1 que al ser metabolizados den origen a moléculas con propiedades bioquímicas distintas.

De manera general, con el modelado molecular se encontró un mayor número de residuos del CYP1A1 de rata que podrían interactuar con los ligandos (Tabla 10). Lo anterior, aunado a la naturaleza de las uniones entre la enzima y las moléculas podría explicar las diferencias encontradas en los parámetros cinéticos calculados en este estudio.

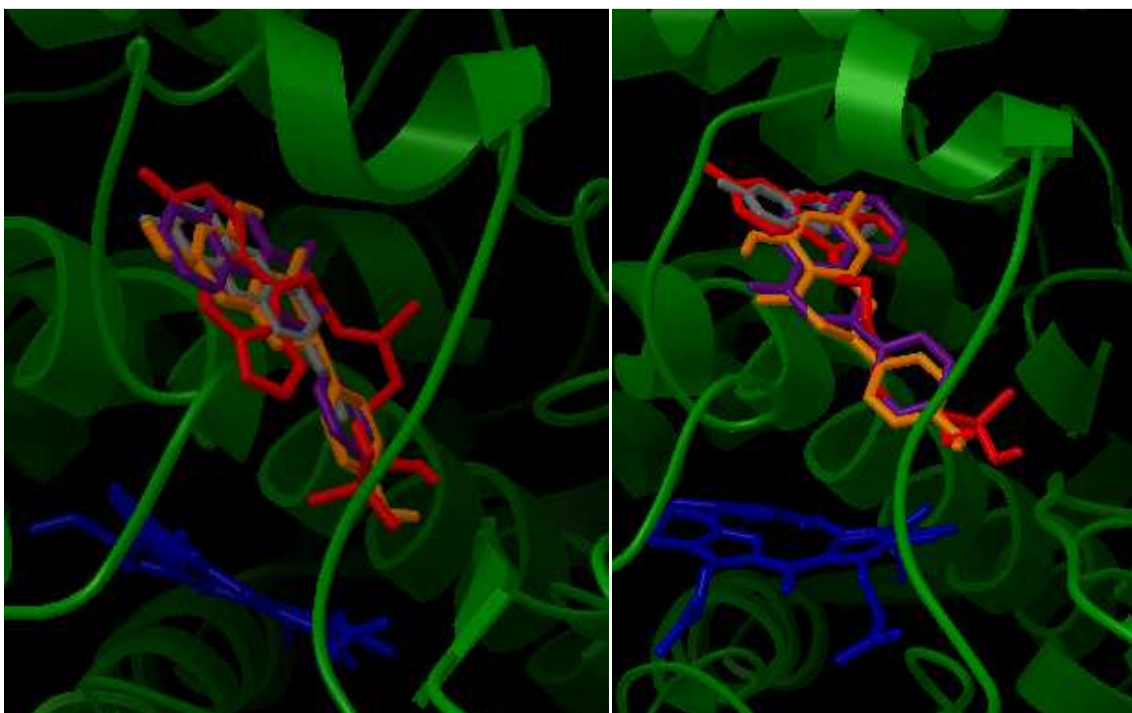


Figura 26. Superposición de las interacciones de los ligandos con CYP1A1 humano (izquierda) y con el modelo de CYP1A1 de rata obtenido en este trabajo (derecha). El grupo hemo se representa en color azul, la etoxiresorufina en gris, la alfa-naftoflavona en morado, la dihidroxibergamotina en rojo y la naringenina en naranja.

Tomando como ejemplo a la DHB, se sugiere que un mayor número de residuos del CYP1A1 de rata interactúan con la molécula, lo que correlaciona con los resultados *in vitro*, donde la DHB tiene una mayor afinidad (K_i menor) por esta isoforma en comparación con el CYP1A1 humano.

Por otro lado, también se encontró correlación con la potencia de inhibición mostrada por los componentes del jugo de toronja sobre el CYP1A1 humano, donde el análisis *in silico* predice la presencia de un mayor número de enlaces de la DHB con la enzima, que *in vitro* correlaciona con una K_i siete veces menor comparada con la naringenina.

VIII. DISCUSIÓN

La inactivación o inhibición de CYP por compuestos presentes en los alimentos como el jugo de toronja, puede ocasionar interacciones fármaco-alimento dando lugar a efectos adversos. Por otro lado, dichos compuestos pueden inhibir el metabolismo de compuestos mutagénicos/carcinogénicos teniendo efectos antimutagénicos o anticarcinogénicos convirtiéndolos en agentes quimiopreventivos para su potencial uso en prevención de cáncer u otras patologías.

El efecto de flavonoides como la naringina y de furanocumarinas como la dihidroxibergamotina sobre algunos CYPs ya ha sido evaluado previamente tanto *in vivo* como *in vitro*. Los estudios de la naringina sobre CYP3A4 sugieren que su aglicona (Naringenina) es quien posee el efecto inhibitorio *in vivo*, ya que la naringina es metabolizada por la α -ramnosidasa y β -glucosidasa convirtiéndola en naringenina, la cual presenta una alta potencia de inhibición de CYP3A4 (Fuhr y Kummert, 1995; Kane y Lipsky, 2000).

En este trabajo se probó la habilidad de la naringenina y de la dihidroxibergamotina para inhibir la actividad de cuatro isoformas pertenecientes a las familias CYP1 y CYP2, involucradas en el metabolismo de xenobióticos mutagénicos o carcinogénicos.

En los ensayos *in vitro* empleando microsomas hepáticos de ratas tratadas con FB y β -NF realizados en este estudio, se determinó que la naringenina presenta una mayor potencia de inhibición sobre CYP1A1 de rata (CI_{50} de $0.09 \pm 0.01 \mu\text{M}$), la cual es mucho menor para las reportadas en trabajos previos (Tabla 1). De igual forma, la dihidroxibergamotina muestra inhibición preferente de la misma isoenzima (CI_{50} de $4.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$), en concordancia con reportes anteriores (Olguín-Reyes *et al.*, 2012).

Debido a la importancia de CYP1A1 en la carcinogénesis química, así como la presencia de la dihidroxibergamotina y de la naringina (cuyo metabolito activo es la naringenina) como algunos de los principales componentes del jugo de toronja, se decidió caracterizar bioquímicamente el tipo de la inhibición ejercida por estas moléculas.

Se determinó que la naringenina actúa como un inhibidor mixto de dicha enzima, lo cual nos da una idea de que puede unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato produciendo cambios conformacionales que afectan la actividad enzimática. Este comportamiento concuerda con el reportado por Moon y colaboradores (1998) quienes determinaron el mismo tipo de inhibición y calcularon una K_{iC} de 2.40 μM en microsomas de hígados de ratas, cuyo valor es 13 veces mayor que el determinado en este trabajo para la enzima recombinante de rata (K_{iC} de 172 ± 18 nM y K_{iU} de 391 ± 16 nM).

Una razón para la diferencia entre los valores de CI_{50} y K_i es que las preparaciones microsomales obtenidas de hígados de ratas (microsomas hepáticos) contienen diferentes isoformas de CYP actuando sobre el mismo sustrato. Además, está bien establecido que las alcoxirresorufinas utilizadas como sustratos para la determinación de la actividad de CYP no son totalmente específicas para una isoforma de CYP, ya que más de una está implicada en su metabolismo (Hollenberg, 1992). En ambos casos, se puede requerir una mayor concentración de naringenina para inhibir la actividad enzimática.

Por otro lado, la afinidad por el sustrato también puede estar involucrada en las diferencias en la actividad, pues el grupo de investigación mencionado utiliza etoxicumarina como sustrato de CYP1A1/2, mientras que en este trabajo se empleó etoxirresorufina como sustrato de CYP1A1.

En estudios previos se determinó una CI_{50} de 11.9 nM para la α -naftoflavona, un inhibidor de CYP1A1 humano ampliamente utilizado (Cui *et al.*, 2013). La naringenina y la dihidroxibergamotina comparadas con este compuesto muestran valores de CI_{50} más altos (361 ± 1 μM y 66 ± 1 μM respectivamente) sobre la misma isoenzima. A partir de estas estructuras químicas bien definidas y caracterizadas como compuestos inhibitorios de CYP, se pueden hacer modificaciones a su estructura para generar compuestos con mayor actividad biológica (menor CI_{50} , similar a la de la α -naftoflavona) o mejorar sus propiedades fisicoquímicas e incluirlos en la formulación de medicamentos quimiopreventivos útiles en el tratamiento de enfermedades.

El conocimiento de diferencias interespecie en la actividad catalítica de CYP es importante cuando los resultados de modelos animales son extrapolados para el asesoramiento de riesgo en la salud humana, por ello se realizaron experimentos similares de cinética enzimática empleando la proteína recombinante CYP1A1 de humano.

Las secuencias de aminoácidos de CYP1A1 de rata y humano son idénticas en un 77.5% (Figura 23). Estos cambios en la secuencia pueden tener efectos considerables en la actividad catalítica y en la regioselectividad de la oxidación de los sustratos. En este trabajo se observaron diferencias significativas en la afinidad de la etoxirresorufina por CYP1A1, donde al comparar los valores de K_m se encontró que el sustrato es más afín por CYP1A1 de rata. Esto puede influir en el metabolismo de los compuestos evaluados (naringenina y DHB), así como en el tipo de inhibición determinada.

Como consecuencia, con la presencia de la naringenina se hizo evidente el cambio en el tipo de inhibición, siendo una inhibición mixta en rata y de tipo competitivo en humano donde los valores de K_i difieren en un orden de magnitud (μM para CYP1A1 humano y nM para CYP1A1 de rata). De igual forma, la DHB también presenta una ligera diferencia en la magnitud de inhibición en ambos modelos biológicos, sugiriendo que los datos obtenidos en el modelo de rata deben tomarse con reservas para ser extrapolados al modelo humano, pues se estarían obteniendo valores más bajos de concentración de inhibidor de los que en verdad se requieren.

Como ya se mencionaba, las diferencias existentes en la estructura tridimensional de ambas proteínas pueden tener repercusión en el metabolismo de xenobióticos. Entre éstas se pueden citar que el CYP1A1 de rata posee 12 aminoácidos más en su secuencia comparado con CYP1A1 humano; además, el sitio catalítico de la primera isoenzima es rico en treoninas (Lewis *et al.*, 1999) y el segundo en fenilalaninas (Walsh *et al.*, 2013) favoreciendo diferente tipo de interacciones entre el sitio catalítico y el xenobiótico debido a las diferencias en polaridad de los aminoácidos que conforman la enzima de interés, tal y como se sugiere con los resultados obtenidos del modelado molecular.

Se ha propuesto que los puentes de hidrógeno e interacciones π - π son importantes en la unión de las alcoxirresorufinas y compuestos heterocíclicos con el CYP1A (Lewis *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 2013). Las moléculas evaluadas en este trabajo presentan anillos aromáticos en su estructura, lo que explicaría el fenómeno de inhibición observado, pues se favorecería su unión a la enzima e impedirían que la catálisis enzimática se realizara de manera eficiente.

Con los estudios de acoplamiento molecular fue posible sugerir que la presencia de residuos que favorezcan estas interacciones puede ser importante para el reconocimiento e orientación de los ligandos con el CYP1A1, donde a mayor número de residuos involucrados en la interacción, la inhibición de la enzima será más fuerte.

Los resultados obtenidos por métodos bioquímicos conjugados con aquéllos obtenidos por modelado molecular pueden ayudar a revelar el papel crucial de estas interacciones entre el sustrato/inhibidor y los aminoácidos que conforman a CYP1A1, a fin de determinar a los residuos responsables de la inhibición preferente de este CYP. En este trabajo, a partir de métodos computacionales, se predijo que los dos compuestos probados podrían unirse al sitio catalítico de la enzima, por lo que al realizar mutaciones en los sitios de reconocimiento de los ligandos se podrían obtener diferencias en los parámetros de inhibición que comprueben la importancia de las interacciones encontradas entre la enzima y los inhibidores.

Ensayos como los realizados en el presente trabajo ayudan a esclarecer un poco el mecanismo por el cual las moléculas inhiben la actividad enzimática de los citocromos P450 y pueden derivar en determinar a futuro la relación estructura-actividad de este tipo de compuestos pues la topología adquirida en el sitio catalítico puede ser variable para la misma enzima en presencia de distintos ligandos provenientes de una estructura común, lo que daría como resultado diferencias en la potencia de inhibición.

De manera general, considerando el posible papel de CYP1A1 sobre la activación de mutágenos/carcinógenos y la aparente selectividad de los componentes del jugo de toronja (naringenina y dihidroxibergamotina) como inhibidores de esta enzima, estos componentes presentes en productos naturales o derivados sintéticos de ellos pueden ejercer efecto protector en el desarrollo de cáncer derivado de la exposición a xenobióticos.

Por otro lado, se pueden diseñar derivados sintéticos de estas moléculas de origen natural para ser activados por CYP1A1 a metabolitos citotóxicos que actúen sobre células cancerosas, lo que puede proporcionar un amplio espectro de nuevos profármacos para el tratamiento del cáncer.

IX. CONCLUSIONES

La actividad O-desetilasa de CYP1A1 es la más afectada por los compuestos presentes en el jugo de toronja, en comparación con la actividad de CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 de rata.

La naringenina es un inhibidor de tipo mixto de CYP1A1 de rata con una K_{iC} de 172 ± 18 nM y K_{iU} de 391 ± 16 nM. Por otro lado, este flavonoide es un inhibidor de tipo competitivo sobre CYP1A1 humano con una K_i de 489 ± 22 μ M.

La DHB es un inhibidor de tipo competitivo sobre CYP1A1 de humano y de rata, con una menor K_i para el segundo modelo biológico.

De manera general, la mayor potencia de inhibición de los componentes del jugo de toronja se da sobre CYP1A1 de rata. El modelo tridimensional generado de esta isoforma y el análisis *in silico* de acoplamiento molecular con los ligandos sugieren que son los residuos Ile119, Thr126, Phe127, Phe228, Phe255, Gly320, Ala321, Thr389, Ile390 y Leu500 los responsables de la interacción enzima-ligando.

En el caso de CYP1A1 humano, los residuos Ser122, Phe123, Asn222, Phe224, Phe258, Gly316, Ala317, Phe319, Asp320, Ile386 y Leu496 parecen ser fundamentales para el reconocimiento y orientación del sustrato/inhibidor.

X. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo, mediante un análisis *in silico*, se determinaron los principales residuos y las interacciones que podrían ser fundamentales en el mecanismo de inhibición de los componentes del jugo de toronja sobre CYP1A1. Los resultados aquí mostrados pueden servir como precedente para diseñar moléculas que sean inhibidores más potentes de esta enzima al aumentar su energía de unión o el número de enlaces con la proteína; a su vez, también se podría incrementar su selectividad al fomentar su interacción con aminoácidos que únicamente estén presentes en una isoforma específica.

Nuevos estudios, una vez que esté disponible la estructura cristalográfica de CYP1A1 de rata, permitirán validar el modelo de la proteína propuesto en este trabajo y también comprobar la hipótesis del sitio de unión para la naringenina y la DHB a esta enzima.

Por otro lado, al conocer los residuos que pueden ser importantes en el reconocimiento de los ligandos, se podría analizar el impacto de algunos polimorfismos de CYP1A1 presentes en la población humana sobre la potencia de inhibición de diversos compuestos de origen natural o sintético mediante el modelaje computacional de la proteína mutada.

Finalmente, traducir los hallazgos *in vitro* e *in silico* de la actividad inhibitoria de los compuestos del jugo de toronja en beneficios clínicos sobre la genotoxicidad mediada por CYP1A1 y otras patologías es de gran relevancia para futuras investigaciones.

XI. REFERENCIAS

1. Alvarez-Gonzalez I, Madrigal-Bujaidar E, Dorado V, Espinosa-Aguirre J J. (2001). Inhibitory effect of naringin on the micronuclei induced by ifosfamide in mouse, and evaluation of its modulatory effect on the Cyp3a subfamily. *Mutat Res* 480-481: 171-178.
2. Androutsopoulos V P, Papakyriakou A, Vourloumis D, Spandidos D A. (2011). Comparative CYP1A1 and CYP1B1 substrate and inhibitor profile of dietary flavonoids. *Bioorg Med Chem* 19: 2842-2489.
3. Araki N, Tsuruoka S, Hasegawa G, Yanagihara H, Omasa T, Enosawa S, Yamazoe Y, Fujimura A. (2012). Inhibition of CYP3A4 by 6', 7'-dihydroxybergamottin in human CYP3A4 over-expressed hepG2 cells. *J Pharm Pharmacol* 64: 1715-1721.
4. Bailey D G, Arnold J M, Munoz C, Spence J D. (1993). Grapefruit juice–felodipine interaction: mechanism, predictability, and effect of naringin. *Clin Pharmacol Ther* 53: 637-642.
5. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
6. Budzinski J W, Foster B C, Vandenhoeck S, Arnason J T. (2000). An *in vitro* evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomedicine* 7: 273-282.
7. César T B, Manthey J A, Myung K. (2009). Minor furanocoumarins and coumarins in grapefruit peel oil as inhibitors of human cytochrome P450 3A4. *J Nat Prod* 72: 1702-1704.
8. Chun Y J, Kim S. (2003). Discovery of cytochrome P-450 1B1 inhibitors as new promising anti-cancer agents. *Med Res Rev* 23: 657-668.
9. Copeland R A. (2000). *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. Wiley-VCH, USA. 412 pp.

10. Costas Loannides. (2005). Xenobiotic metabolism an overview: Enzyme Systems that metabolize drugs and other xenobiotics. John Wiley and Sons, LTD, USA. 1-29.
11. Crespi C L, Miller V P, Penman B W. (1997). Microtitre plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Anal Biochem* 248: 188-190.
12. Cui J H, Hu D, Zhang X, Jing Z, Ding J, Wang R B, Li S S. (2013). Design and synthesis of new 7, 8-dimethoxy- α -naphthoflavones as CYP1A1 inhibitors. *Chinese Chem Lett* 24: 215-218.
13. De Castro W V, Mertens-Talcott S, Rubner A, Butterweck V, Derendorf H. (2006). Variation of flavonoids and furanocoumarins in grapefruit juices: a potential source of variability in grapefruit juice-drug interaction studies. *J Agric Food Chem* 54: 249-255.
14. Doostdar H, Burke M D, Mayer R T. (2000). Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* 144: 31-38.
15. Dresser G K, Bailey D G, Leake B F, Schwarz U I, Dawson P A, Freeman D J, Kim R B. (2002). Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther* 71: 11-20.
16. Edwards D J, Bernier S M. (1996). Naringin and naringenin are not the primary CYP3A inhibitors in grapefruit juice. *Life Sci* 59: 1025-1030.
17. Fuhr U, Klittich K, Staib A H. (1993). Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. *Br J Clin Pharmacol* 35: 431-436.
18. Fuhr U, Kummert A L. (1995). The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice–drug interactions? *Clin Pharmacol Ther* 58: 365-373.
19. Fujii-Kuriyama Y, Kawajiri K. (2010). Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86: 40-53.

20. Fukuda K, Ohta T, Oshima Y, Ohashi N, Yoshikawa M, Yamazoe Y. (1997). Specific CYP3A4 inhibitors in grapefruit juice. Furocoumarin dimers as components of drug interaction. *Pharmacogenetics* 7: 391-396.
21. Girenavar B, Jayaprakasha G K, Patil B S. (2007). Potent inhibition of human cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 isoenzymes by grapefruit juice and its furocoumarins. *J Food Sci* 72: C417-C421.
22. Granfors M T, Backman J T, Neuvonen M, Neuvonen P J. (2004). Ciprofloxacin greatly increases concentrations and hypotensive effect of tizanidine by inhibiting its cytochrome P450 1A2-mediated presystemic metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 76: 598-606.
23. Grube B J, Eng E T, Kao Y C, Kwon A, Chen S. (2001). White button mushroom phytochemicals inhibit aromatase activity and breast cancer cell proliferation. *J Nutr* 131: 3288-3293.
24. Guengerich F P. (2003). Cytochromes P450, drugs and diseases. *Mol Interv* 3: 194-204.
25. Guengerich F P. (2006). Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS* 8: 102-103.
26. Guo L Q, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. (2000). Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug Metab Dispos* 28: 766-771.
27. Guo Z Y, Gillam E M J, Ohmori S, Tukey R H, Guengerich F P. (1994). Expression of modified human cytochrome P450 1A1 in *Escherichia coli*: Effects of 5' substitution, stabilization, purification, spectral characterization and catalytic properties. *Arch Biochem Biophys* 312: 436-446.
28. Hamdane D, Zhang H, Hollenberg P. (2008). Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase. *Photosynth Res* 98: 657-666.
29. Hollenberg P F. (1992). Mechanisms of Cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FASEB* 6: 686-694.
30. Hu Z, Yang X, Ho P C, Chan S Y, Heng P W, Chan E, Duan W, Koh H L, Zhou S. (2005). Herb–drug interactions: a literature review. *Drugs* 65: 1239-1282.

31. Ioannides C. (1996). *Cytochromes P450: Metabolic and toxicological aspects*. CRC Press LLC, 412 pp.
32. Jeffy B D, Chirnomas R B, Romagnolo D F. (2002). Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors. *Environ Mol Mutagen* 39: 235-244.
33. Kane G C, Lipsky J J. (2000). Drug–grapefruit juice interactions. *Mayo Clin Proc* 75: 933-942.
34. Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, Hatano T. (2010). Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem Toxicol* 48: 429-435.
35. Kleiner H E, Xia X, Sonoda J, Zhang J, Pontius E, Abey J, Evans R M, Moore D D, DiGiovanni J. (2008). Effects of naturally occurring coumarins on hepatic drug-metabolizing enzymes in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 232: 337-350.
36. Kuriyan J, Konforti B, Wemmer D. (2013). *The molecules of life: Physical and chemical principles*. Garland Science, 1008 pp.
37. Le Bail J C, Champavier Y, Chuliaa J C, Habrioux G. (2000). Effects of phytoestrogens on aromatase, 3β and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sci* 66: 1281-1291.
38. Le Gal A, Dreano Y, Lucas D, Berthou F. (2003). Diversity of selective environmental substrates for human cytochrome P-450 2A6: alkoxyethers, nicotina, coumarin, N-nitrosodiethylamine, and N-nitrosobenzylmethylamine. *Toxicol Lett* 144: 77-91.
39. Lee C P, Schatz G, Dallner, G. (1981). *Mitochondria and Microsomes*, Addison-Wesley Reading, Massachusetts.
40. Lee H, Yeom H, Kim Y G, Yoon C N, Jin C, Choi J S, Kim B R, Kim D H. (1998). Structure-Related Inhibition of Human Hepatic Caffeine N3-Demethylation by Naturally Occurring Flavonoids. *Biochem Pharmacol* 55: 1369-1375.
41. Lewis B C, Mackenzie P I, Miners J O. (2007). Comparative homology modeling of human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and confirmation of residues involved in 7-ethoxyresorufin O-deethylation by site-directed mutagenesis and enzyme kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys* 468: 58–69.

42. Lewis B C, Mackenzie P I, Miners J O. (2011). Application of homology modeling to generate CYP1A1 mutants with enhanced activation of the cancer chemotherapeutic prodrug dacarbazine. *Mol Pharmacol* 80: 879–888.
43. Lewis D F V, Lake B G, George S G, Dickins M, Eddershaw P J, Tarbit M H, Beresford A P, Goldfarb P S, Guengerich F P. (1999). Molecular modelling of CYP1 family enzymes CYP1A1, CYP1A2, CYP1A6 and CYP1B1 based on sequence homology with CYP102. *Toxicology* 139: 53-79.
44. Li F, Ye L, Lin S M, Leung L K. (2011). Dietary flavones and flavonones display differential effects on aromatase (CYP19) transcription in the breast cancer cells MCF-7. *Mol Cell Endocrinol* 344: 51-58.
45. Lieber C S. (1997). Cytochrome P4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev* 77: 517-544.
46. Lin J H, Lu A Y H. (2001). Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 535-567.
47. Liu J, Ericksen S S, Sivaneri M, Besspiata D, Fisher C W, Szklarz G D. (2004). The effect of reciprocal active site mutations in human cytochromes P450 1A1 and 1A2 on alkoxyresorufin metabolism. *Arch Biochem Biophys* 424: 33-43.
48. Maquardt H, Schäfer S G y McClellan R O. (1999). *Toxicology*. Academic Press, Wileys F. USA, 1330 pp.
49. Maron D M y Ames B D. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res Envir Mutag Related Subj* 113: 173-215.
50. Matsushima T, Sawamura M, Hara K, Sugimura T. (1976). In vitro metabolic activation in mutagenesis. *Testing* 85.
51. Miksys S, Lerman C, Shields P G, Mash D C, Tyndale R F. (2003). Smoking, alcoholism and genetic polymorfisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology* 45: 122-132.
52. Moon J Y, Lee D W, Park K H. (1998). Inhibition of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity in rat liver microsomes by naturally occurring flavonoids: structure-activity relationships. *Xenobiotica* 28: 117-126.

53. Munro A W, Girvan H M y McLean K J. (2007). Variations on a (t) heme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Nat Prod Rep* 24: 585-609.
54. Nebert D W, Negishi M, Lang M A, Hjelmelend L M, Eisen H J. (1982). The Ah locus, a multigene family necessary for survival in a chemically adverse enviroment: comparison with the immune system. *Adv Genet* 21: 1-52.
55. Nebert D W. (1989). The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation and birth defects. *Crit Rev Toxicol* 20: 153-174.
56. Nelson D L, Cox M M. (2006). *Lehninger Principios de Bioquímica*. 6: 209-212.
57. Nelson D R, Koymans L, Kamataki T, Stegeman J J, Feyereisen R, Waxman D J, Waterman M R, Gotoh O, Coon M J, Estabrook R W, Gunsalus I C, Nebert D W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42.
58. Oesch F, Bentley P, Golan M, Stasiecki P. (1985). Metabolism of benzo(a)pyrene by subcellular fractions of rat liver: evidence for similar patterns of cytochrome P-450 in rough and smooth endoplasmic reticulum but not in nuclei and plasma membrane. *Cancer Res* 45: 4838-4843.
59. Olguín-Reyes S, Camacho-Carranza R, Hernández-Ojeda S, Elinos-Baez M, Espinosa-Aguirre J J. (2012). Bergamottin is a competitive inhibitor of CYP1A1 and is antimutagenic in the Ames test. *Food Chem Toxicol* 50: 3094-3099.
60. Ortíz de Montellano P. (2005). Models and mechanism or Cytochrome P450 action. *Cytochrome P450: Estructure, mechanism and function*. 3th. New York, Plenum Publisher. USA, 659 pp.
61. Poulos T L y Raag R. (1992). Cytochrome P450: crystallograpy, oxygen activation and electron transfer. *FASEB* 6: 674-679.
62. Rendic S. (2002). Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* 34: 83-448.
63. Schwarz D, Roots I. (2003). In vitro assessment of inhibition by natural polyphenols of metabolic activation of procarcinogens by human CYP1A1. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 902-907.

64. Seden K, Dickinson L, Khoo S, Back D. (2010). Grapefruit–drug interactions. *Drugs* 70: 2373-2407.
65. Shou M, Krausz K W, Gonzalez F J, Gelboin H V. (1996). Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo[a, l]pyrene by human recombinant cytochromes P450, lung and liver microsomes. *Carcinogenesis* 17: 2429-2433.
66. Silverman R B. (1988). *Mechanism-based Enzyme Inactivation: Chemistry and Enzymology*. Volumen 1. CRC Press. UK, 288 pp.
67. Sousa M C, Braga R C, Cintra B A S, de Oliveira V, Andrade C H. (2013). In silico metabolism studies of dietary flavonoids by CYP1A2 and CYP2C9. *Food Res Int* 50: 102–110.
68. Stasiecki P, Oesch F, Bruder G, Jarasch E D, Franke W W. (1980). Distribution of enzymes involved in metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons among rat liver endomembranes and plasma membranes. *Eur J Cell Biol* 21: 79-92.
69. Takanaga H, Ohnishi A, Matsuo H, Sawada Y. (1998). Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in caco-2 cells. *Biol Pharm Bull* 21: 1062-1066.
70. Takemura H, Itoh T, Yamamoto K, Sakakibara H, Shimoi K. (2010). Selective inhibition of methoxyflavonoids on human CYP1B1 activity. *Bioorg Med Chem* 18: 6310-6315.
71. Tassaneeyakul W, Guo L Q, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. (2000). Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys* 378: 356-363.
72. Trott O, Olson A J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31: 455-461.
73. VandenBrink, Brooke M, Isoherranen N. (2010). The role of metabolites in predicting drug-drug interactions: Focus on irreversible P450 inhibition. *Curr Opin Drug Discov Devel* 13: 66-77.
74. Walsh A A, Szklarz G D, Scott E E. (2013). Human Cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *J Biol Chem* 288: 12932-12943.

75. Ye L, Chan F L, Chen S, Leung L K. (2012). The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice. *J Nutr Biochem* 23: 1230-1237.
76. Zhou S F, Wang B, Yang L P, Jiu J P. (2010). Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metab Rev* 42: 268-354.