



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Inhibición de la actividad del citocromo P450 1A1 por flavonoides.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Ana Lilia Marroquín Pérez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez
[Facultad de Medicina](#)

MÉXICO, Cd. Mx. Agosto 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Esta tesis de maestría se realizó bajo la supervisión del Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre en el laboratorio C-206, departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.



Agradecimientos

Agradezco profundamente a mi tutor, el Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre por el apoyo y confianza que me ha brindado al abrirme las puertas de su laboratorio, por guiarme en el camino de la ciencia y compartir conmigo su conocimiento, enseñarme, corregirme y tenerme paciencia, así como por su calidad humana que me ha impulsado a desarrollarme como mejor científico y mejor ser humano.

A los miembros del Comité tutor por su apoyo académico y las valiosas aportaciones en el desarrollo de esta tesis

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte.

Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez.

A los miembros del jurado por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo y sus excelentes observaciones:

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco.

Dra. Ana María Salazar Martínez.

Dr. Ismael Jaimes Bustos.

Dra. Norma Adriana Valdez Cruz.

Dr. Enrique Hernández García.

Al Dr. Rafael Camacho Carranza por los consejos que me ha brindado tanto académicos como de vida.

A la M. en C. Rebeca Santes Palacios por las innumerables veces que me apoyo en cada duda, experimento y crisis, así como la infinita paciencia que me ha tenido durante el desarrollo de este trabajo. Rebe agradezco enormemente que compartieras tus conocimientos y amistad conmigo.

A la Bióloga Sandra Luz Hernández Ojeda por el apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo y su invaluable amistad

A la Dra. Tzipe Silvia Govezensky Zack por el apoyo estadístico que me brindo durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio C-206 por hacer tan amena mi estancia y compartir su conocimiento conmigo. Sin duda uno de los mejores equipos con quienes he tenido la dicha de trabajar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada como estudiante de maestría para la realización de este trabajo. No. CVU: 699157. Y al programa de Apoyos a los estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo que me concedieron para asistir al International Congress of Toxicology 2016 en Mérida, y al Second International Convencion Immunopharmacology-Vaccipharma 2017 en Cuba.

Dedicatoria

Detrás de cada logro que he tenido siempre han estado ustedes apoyándome, han sido los pilares de mi vida y me han impulsado a llegar a donde me encuentro ahora, por eso mamá, papá, este trabajo es dedicado a ustedes. Con su amor me han enseñado la perseverancia y dedicación, y por eso este logro es suyo. Los amo infinitamente.

A Ulises e Irene, hermanitos hemos crecido y aprendido juntos. Gracias por el apoyo que siempre me han dado. Ya Said mi niño que continúa mostrándome el mundo.

A todos mis tíos y primos, que siempre están presentes apoyándome, ustedes también son mis padres y hermanos.

A mis otras hermanas Gaby y Mitzi, que pese al tiempo y a veces a la distancia, ustedes siempre están presentes en mi vida, en las buenas en las malas, en las locas y en las raras. Las quiero con el alma.

A Emma, Annia y Adri, gracias niñas por esos cafecitos y helados para desahogarnos y celebrar nuestros triunfos, a pesar de la distancia siempre están presentes. Las quiero mucho, gracias por su amistad.

¡A las chicas del C-206, las más guapas de Biomédicas! Rebe, Laurel, Moni, Cyn, Cristy y a Raúl. Gracias por todos los momentos increíbles a su lado, tanto en el laboratorio como fuera de él. Agradezco a cada uno de ustedes por compartir su conocimiento conmigo, por ayudarme académica y personalmente, y por sus observaciones en los seminarios, todos ustedes han contribuido en mi crecimiento como científico y como persona, sin mencionar todos los momentos divertidos en el cine, los cafés, las fiestas tranqui (que no eran tan tranqui), las innumerables risas que se escuchaban por todo el pasillo, los congresos, los viajes y la lista continua. Y por supuesto no puede faltar mamá Sandy, siempre al pendiente de nosotros, gracias por todo el apoyo dentro y fuera del laboratorio, como buena mamá sin decírtelo sabes lo que estamos sintiendo. Gracias por ser mi familia científica.

De manera muy especial quiero dedicar esta tesis a mis abuelitos, los que están con Dios, y a los que aún puedo besar y abrazar. Ustedes son la raíz de todo mi ser. Soy el producto de sus cuentos, de sus dichos, de sus consejos. Los llevo siempre en el corazón ♥

Índice de Contenidos

Lista de Ilustraciones	iii
Lista de Tablas.....	iv
Lista de Abreviaturas	v
Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 Citocromo P450	4
1.2 CYP1A1	5
1.3 Mecanismo catalítico del citocromo P450	8
1.4 Inhibición del CYP	9
1.5 Flavonoides y su interacción con los CYP	11
1.6 Flavonoides como inhibidores del CYP1	13
1.7 Mutagenicidad de flavonoides.....	16
1.8 Ensayo de mutagenicidad (prueba de Ames)	16
1.9 Fracción S9 de hígado humano	18
2. Planteamiento del problema.....	19
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	20
4.1. Objetivo General	20
4.2 Objetivos Particulares	20
5. Metodología	21
5.1 Expresión del CYP1A1 humano en E. coli	21
5.2 Obtención de la fracción membranal de E. coli.....	21
5.3 Determinación de la actividad enzimática	22
5.4 Determinación de la cinética enzimática	23
5.5 Evaluación in silico de la interacción del CYP1A1 con los flavonoides	25
5.6 Prueba de mutagenicidad	25
5.6.1 Verificación de marcadores genotípicos.....	26
5.6.2 Ensayo de Ames	27
5.6.3 Análisis estadístico.....	28
6 Resultados	29

6.1 Efecto de distintos flavonoides sobre la actividad del CYP1A1 humano.....	29
6.2 Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de distintos flavonoides sobre CYP1A1 humano.	29
6.3 Determinación del efecto de flavona, 3-HF y 5-HF sobre la actividad enzimática de CYP1A1 humano	31
6.4 Evaluación in silico de las interacciones de α -naftoflavona con el CYP1A1 humano	34
6.5 Evaluación in silico de las interacciones entre 5-HF, 3-HF, flavona y otros ligandos con el CYP1A1 humano	35
6.6 Efecto del S9 humano en la cepa TA98 y como activador metabólico de la QT.....	43
6.7 Resultados de evaluación de la mutagenicidad de 5-HF, 3-HF y Flavona con y sin activación metabólica de S9 humano a través del ensayo de Ames	45
7. Discusión.....	47
8 Conclusiones.....	51
9 Perspectivas.....	52
10 Referencias	53
Apéndice I	60

Lista de figuras

Figura 1. Enzimas que contribuyen en la activación de procarcinógenos.	3
Figura 2. Resumen de algunas de las diversas funciones de los CYP	4
Figura 3. Porcentaje de participación de algunas familias del citocromo P450 en la biotransformación de compuestos carcinógenos.	6
Figura 4. Estructura tridimensional del CYP1A1 humano y alineamiento de algunos sustratos de CYP1A1.....	7
Figura 5. Ciclo catalítico del citocromo P450.....	9
Figura 6. Inhibición competitiva	10
Figura 7. Inhibición acompetitiva.	10
Figura 8. Inhibición mixta.....	11
Figura 9. Inhibición no competitiva.	11
Figura 10. Estructura básica de los flavonoides	12
Figura 11. Algunas características de la relación estructura actividad de los flavonoides como inhibidores de CYP1.....	14
Figura 12. Estructura química de los flavonoides probados en este trabajo	15
Figura 13. Efecto de la flavona, 3-hidroxi flavona, 5-hidroxi flavona, quercetina, miricetina, luteolina, fisetina, kaempferol e hidrato de morina, sobre la actividad de CYP1A1 humano recombinante.	29
Figura 14. Gráfico de velocidad inicial de reacción del CYP1A1 humano vs concentración de etoxiresorufina.	31
Figura 15. Graficos de velocidad inicial de reacción del CYP1A1 y gráficos de Lineweaver-Burk	32
Figura 16. Modelo de interacción del α -NF en la cavidad del sitio activo del CYP1A1 humano.....	35
Figura 17. Modelo de interacción del 7-etoxiresorufina en la cavidad del sitio activo del CYP1A1 humano, a la izquierda se muestra la representación molecular obtenida a través del programa PyMol (Schrödinger, LLC), en magenta el grupo hemo, en plateado la 7-etoxiresorufina	36
Figura 18.1 Modelos de interacción del 5-HF y 3-HF en la cavidad del sitio activo del CYP1A1 humano.....	37
Figura 19. Modelo de interacción de la 5-HF con el CYP1A1 humano	42
Figura 20. Efecto mutagénico de la QT sin activación metabólica y con activación de S9 de rata y S9 humano, probado en la cepa TA98 de <i>S. typhimurium</i>	44
Figura 21. Efecto mutagénico de la 5-hidroxi flavona sobre la cepa TA98 de <i>S. typhimurium</i>	45
Figura 22. Efecto mutagénico de la 3-hidroxi flavona sobre la cepa TA98 de <i>S. typhimurium</i>	46
Figura 23. Efecto mutagénico de la flavona sobre la cepa TA98 de <i>S. typhimurium</i>	46
Figura 24. Actividad enzimática de CYP1A1 humano recombinante.	60

Figura 25. Alineación de secuencias de aminoácidos de CYP1A1 humano y transposición de la estructura cristalizada del CYP1A1 humano 62

Lista de Tablas

Tabla 1 Concentración inhibitoria media de nueve flavonoides sobre CYP1A1 humano.	30
Tabla 2. Ajuste global de los parámetros cinéticos de los tres flavonoides provados con el CYP1A1 humano.	33
Tabla 3. Ajuste individual de los parámetros cinéticos de los tres flavonoides provados con el CYP1A1 humano.	34
Tabla 4. Datos de acoplamiento molecular de 5-HF, 3-HF y flavona con el CYP1A1 humano.	39
Tabla 5. Comparación del acoplamiento molecular para los tres flavonoides con la inhibición más potente y algunos ligandos del CYP1A1 humano.	40
Tabla 6. Comparación del acoplamiento molecular para los tres flavonoides más potentes con el CYP1A1 humano unido al ligando α -NF.	41
Tabla 7. Datos de acoplamiento molecular de 5-HF, 3-HF y flavona con el CYP1A1 unido al α -NF.	43

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADT	AutoDock Tools
AhR	Receptor de hidrocarburos aril
AKR	Aldo-ceto reductasas
ALA	Ácido delta aminolevulinico
α -NF	α - Naftoflavona
B[a]p	Benzo[a]pireno
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
COX	Ciclooxigenasas
CYP	Citocromo P450
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
ER	7-Etorxiresorufina
EROD	Actividad etoxirresorufina <i>O</i> -deetilasa
FMO	Flavin monooxigenasa
<i>g</i>	Gravedades
<i>h</i>	horas
HAP's	Hidrocarburos aromáticos policiclicos
His ⁻	Auxótrofo de histidina
His ⁺	Autótrofo de histidina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltons
K _i	Constante de inhibición
K _i _c	Constante de inhibición de la enzima libre
K _i _u	Constante de inhibición del complejo enzima-sustrato
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria Bertani
Min	Minutos
NAT	N-acetiltransferasa
PDB	Protein Data Bank
QT	Quercetina
rpm	Revoluciones por minuto
SULT	Sulfotransferasa
TB	Medio Terrific Broth
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
V _{max}	Velocidad máxima
WT	Wild Type
2-AA	2-Aminoantraceno
3-HF	3-hidroxiflavona
5-HF	5-hidroxiflavona
°C	Grados Celsius

Resumen

Los citocromos P450 (CYP) son una super familia de enzimas hemooxigenasas de la fase I del metabolismo que participan ampliamente en la biosíntesis y metabolismo de moléculas endógenas, así como en biotransformación de compuestos xenobióticos. Dentro de estas enzimas, la isoforma CYP1A1 ha sido objeto de interés debido a su capacidad de metabolizar compuestos cuyos metabolitos generados pueden ocasionar daño a través de su interacción con componentes de las células como proteínas, lípidos y ADN, causando eventos mutagénicos o genotóxicos que pueden derivar en procesos carcinogénicos.

Con la finalidad de prevenir el daño que estos eventos pueden ocasionar, se han buscado compuestos capaces de inhibir la actividad del CYP1A1 humano, de manera que se evite la formación de los metabolitos reactivos que esta enzima puede generar. Durante esta búsqueda, se ha enfocado hacia productos naturales tales como los flavonoides, debido al hecho de que son compuestos que se consumen en los alimentos de la dieta diaria, y se ha reportado que poseen propiedades de interés biológico y farmacológico, entre las que se encuentran la captura de radicales libres, efecto sobre señales de transducción y efectos inhibidores o potenciadores sobre enzimas que activan o detoxifican carcinógenos.

En el presente trabajo se probaron nueve flavonoides: quercetina, miricetina, luteolina, fisetina, morin hidrato, kaempferol, 5-hidroxi flavona (5-HF), 3-hidroxi flavona (3-HF) y flavona, para estudiar su capacidad de inhibir a la enzima recombinante CYP1A1 humana obtenida a partir de fracción membranal de *Escherichia coli*. Al determinar la concentración de estos compuestos que inhibe el 50% de actividad de la enzima (CI_{50}), se encontró que hay una relación estructura-actividad en cuanto a la potencia de inhibición, pues se observa que entre menor número de sustituyente OH tenga la molécula y según su posición, mayor será la inhibición que ejerzan sobre la enzima; de tal manera que las moléculas más pequeñas resultaron ser las de mayor potencia: 5-HF, 3-HF y flavona con valores de CI_{50} de 0.03, 0.05 y 0.08 μ M respectivamente.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se decidió realizar la caracterización bioquímica del tipo de inhibición que estos tres flavonoides ejercen sobre el CYP1A1 humano. A través de estudios de cinética enzimática utilizando una curva de concentraciones de cada flavonoide, se determinó que en los tres casos los compuestos actúan como inhibidores no competitivos de esta enzima, con valores de constante de inhibición (K_i) de 69.48 ± 2.44 nM para la 5-HF, 91.97 ± 5.52 nM para la 3-HF y 121.5 ± 9.06 nM para la flavona.

Para identificar la relación que existe entre la estructura y la actividad de los compuestos con el CYP1A1 humano, se realizaron modelos *in silico* de acoplamiento molecular utilizando el modelo cristalográfico del CYP1A1 humano. Este estudio demostró que existen residuos de aminoácidos conservados que parecen ser importantes para el reconocimiento y la orientación de los ligandos. Al realizar el modelo de acoplamiento molecular de los tres flavonoides con la enzima, estos se unen en la cavidad del sitio activo y a la Phe224 que es uno de los residuos conservado. Al parecer su anillo está interactuando con el anillo de los flavonoides tal vez en

un enlace de tipo π - π ; mientras que la porción rotable de los compuestos se encuentra orientada hacia el grupo hemo a una distancia entre 4.8 y 5 Å en los tres modelos. También se llevó a cabo el acoplamiento de los compuestos con la enzima unida a otro ligando (α -NF) para identificar los sitios periféricos donde se unen a la enzima. Estos modelos muestran que los flavonoides tienen preferencia por un sitio ubicado entre las hélices A y K; y en esta posición la 5-HF se encuentra formando un puente de hidrógeno con el residuo de Gln418 de la hélice K.

Finalmente se llevaron a cabo ensayos de mutagenicidad a través de la prueba de Ames utilizando una “mezcla S9 humano” como sistema metabolizador. Estos resultados indicaron que 5-HF, 3-HF y flavona, no son compuestos mutagénicos por sí solos, ni por activación metabólica, demostrando que son relativamente seguros; aunque es necesario realizar más pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar su potencial quimioprotector contra el cáncer.

1. Introducción

Frecuentemente estamos expuestos a distintos compuestos que se encuentran presentes en el ambiente, ya sean de origen natural o antropogénico, muchos de los cuales son capaces de causar efectos perjudiciales en el organismo. Estos compuestos ajenos al organismo se conocen como xenobióticos y algunos de ellos son lipofílicos, lo que dificulta su eliminación.

Con el fin de combatir la acumulación y los efectos adversos que producen los xenobióticos en el organismo, éste efectúa mecanismos de biotransformación, a través de los cuales dichos compuestos se vuelven más hidrofílicos, facilitando su excreción. Este proceso ocurre en dos etapas. La fase I, también llamada de funcionalización, comprende reacciones químicas como oxidación, reducción e hidrólisis que dan lugar a la formación de grupos polares en la molécula incrementando su hidrosolubilidad. Dentro de las enzimas que realizan estas reacciones se encuentran las aldehído deshidrogenasas, azo y nitroreductasas, alcohol deshidrogenasas, epóxido hidrolasas, mono amino oxidasas, flavin monoxidasas, esterasas no específicas y los citocromos P450 (CYP) [1]. Los metabolitos resultantes no solo son más polares que el compuesto original, sino que también son capaces de participar en la fase II del metabolismo.

En la fase II, el metabolito producto de la fase I o bien el xenobiótico directo, se conjuga con un compuesto endógeno como ácido glucorónico, sulfato, metilo, acetilo, glutatión o aminoácidos. El producto resultante es una molécula voluminosa y a menudo más hidrofílica que el compuesto original, lo que facilita su eliminación del organismo [2]. Finalmente, los productos resultantes son excretados en la orina y la bilis.

Aunque ambas fases tienen características diferentes, es fundamental que estén acopladas entre sí, de modo que el metabolismo corresponda a un proceso de detoxificación, evitando la presencia de metabolitos intermediarios, ya que en ciertos casos las reacciones de la fase I generan productos altamente electrofílicos con potencial de reaccionar con macromoléculas como el ADN, lo cual puede generar severos daños en el material genético derivando en procesos carcinogénicos [3].

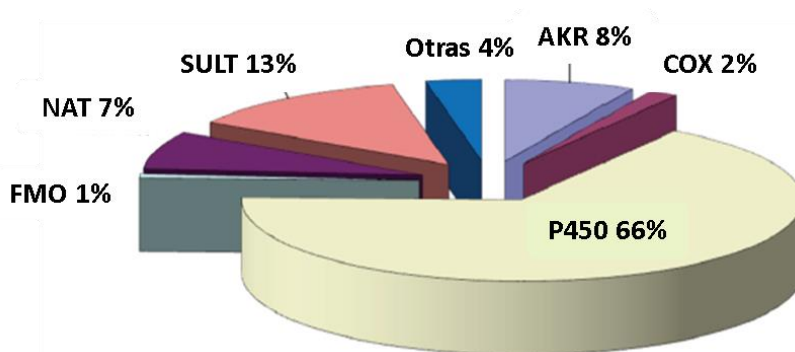


Figura 1. Enzimas que contribuyen en la activación de procarcinógenos. Flavin monooxigenasa (FMO), N-acetiltransferasa (NAT), sulfotransferasa (SULT), Aldo-ceto reductasas (AKR), ciclooxigenasas (COX). Citocromo P450 (P450) Tomada de Rendi y Guengerich, 2012 [4].

El metabolismo tiene un papel importante en la modulación de compuestos con propiedades carcinogénicas, ya que muchos de ellos requieren la activación a su forma electrofílica para ejercer el daño genotóxico capaz de iniciar procesos de carcinogénesis. Las enzimas de la fase de funcionalización están ampliamente involucradas en la activación de este tipo de compuestos [4], dentro de las cuales la superfamilia de los citocromos P450 tienen considerable participación (Ilustración 1). Tomando en cuenta lo anterior, el estudio de esta superfamilia es clave para el desarrollo de estrategias que combatan el cáncer.

Visto de este modo el citocromo P450 juega un papel dual al actuar como enzima detoxificadora de algunos compuestos perjudiciales; mientras que por otro lado se desempeña como activador de compuestos promutágenos

1.1 Citocromo P450

Las proteínas citocromo P450 (CYP) son una superfamilia de enzimas hemoproteínas implicadas en la transformación de compuestos xenobióticos, así como en la biosíntesis y metabolismo de moléculas endógenas [5]. Cada miembro de la superfamilia exhibe distinta actividad metabólica a través de la diversidad estructural de los sustratos que reconocen (Ilustración 2). Los CYP metabolizan alrededor del 80% de los fármacos que pasan por la fase I del metabolismo, contribuyendo más que el resto de las enzimas que participan en esta fase [6].

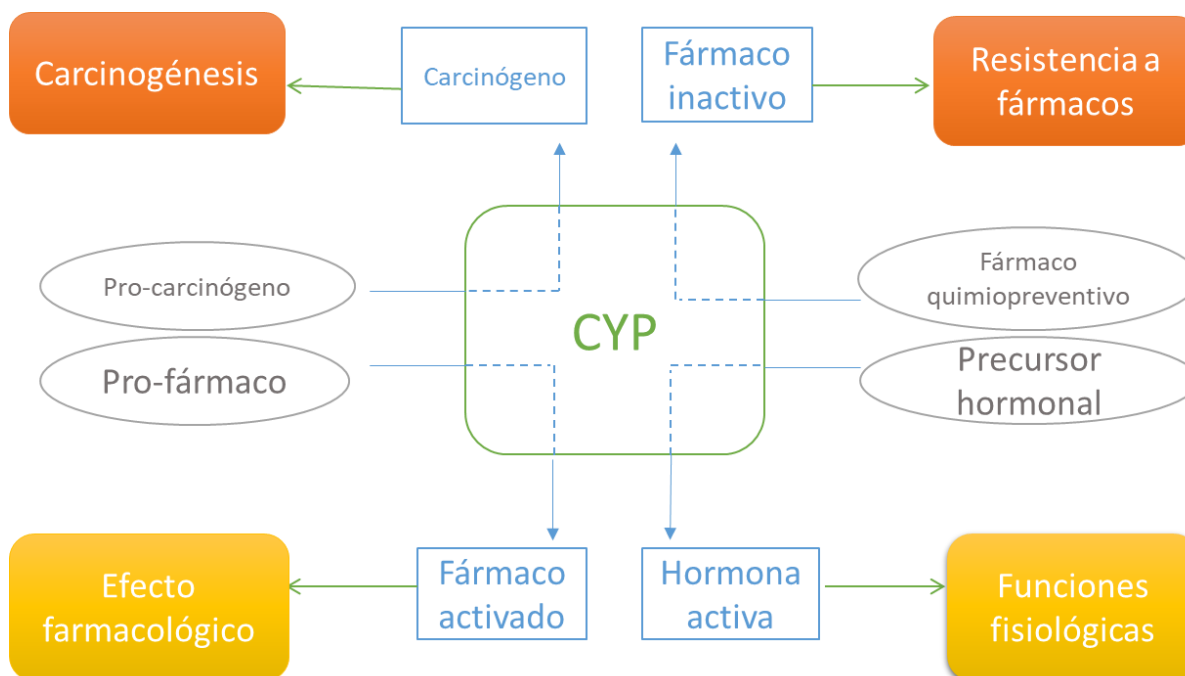


Figura 2. Resumen de algunas de las diversas funciones de los CYP. Modificado de Dong *et al*, 2016 [7]

Los CYP son enzimas ancladas a membranas subcelulares como mitocondria y membrana plasmática, aunque se encuentran principalmente en retículo endoplasmático [6], y se estima que en hepatocitos entre el 12-15% de esta membrana está formada por citocromos P450 [8]. También se ha reportado su presencia en otros órganos y tejidos extrahepáticos como riñón, próstata, piel, epitelio nasal, gónadas, cerebro, pulmón, páncreas y tracto gastrointestinal, entre otros [9].

En humano se han reportado 57 isoformas con diferencias en especificidad catalítica así como en el tejido en que se expresan [10]. Estas proteínas son clasificadas de acuerdo a la similitud que presentan en la secuencia de residuos de aminoácidos y se dividen en familias, subfamilias e isoformas según la propuesta de Nelson y colaboradores (1996). Se agrupan en la misma familia si poseen una similitud mayor a un 40% en su secuencia (independientemente de la especie procedente) y se les designa un número; las subfamilias están compuestas por aquellas enzimas con al menos 55% de similitud y son denominadas con una letra, finalmente a las enzimas individuales deben tener al menos un 3% de diferencia con el resto de las enzimas y se les asigna un número [11].

En cuanto a su peso molecular, este oscila entre 50 y 60 kDa. Estudios de cristalización de diferentes CYP revelan que existe una elevada conservación en la topología y la estructura tridimensional de estas enzimas [12]. La estructura general de ellas está constituida por α -hélices y hojas- β en la región que rodea al grupo hemo, mientras que los sitios de unión a la membrana y reconocimiento de sustrato son los que presentan mayor variabilidad [13]. Al mostrar que la región catalítica de la enzima, es decir la del grupo hemo es conservada, refleja un mecanismo común de transferencia de electrones y protones, así como de activación de la molécula de oxígeno [14].

Los miembros de la subfamilia CYP1A juegan un papel importante en el metabolismo de xenobióticos, incluyendo la transformación de contaminantes ambientales a metabolitos reactivos, haciendo relevante el estudio de las enzimas de esa subfamilia.

1.2 CYP1A1

La isoforma CYP1A1 es una enzima con interés médico y biológico ya que es conocida por su capacidad de metabolizar compuestos xenobióticos ya sea de origen natural o sintético (Ilustración 3) y se ha involucrado en la biotransformación de compuestos procarcinógenos que generan metabolitos reactivos capaces de interactuar con el ADN y generar aductos que contribuyen con la mutagénesis y la formación de tumores [15,16].

El gen del CYP1A1 humano consta de 6069 pares de bases, localizado en el locus CYP1A1-CYP1A2 en el cromosoma 15q24.1 [17], presenta baja expresión en hígado y necesita de agentes inductores para que dicha expresión sea cuantificable. Sin embargo, en órganos

extrahepáticos como páncreas, timo, próstata, intestino delgado, colon, útero y glándulas mamarias, se expresa de manera constitutiva [18].

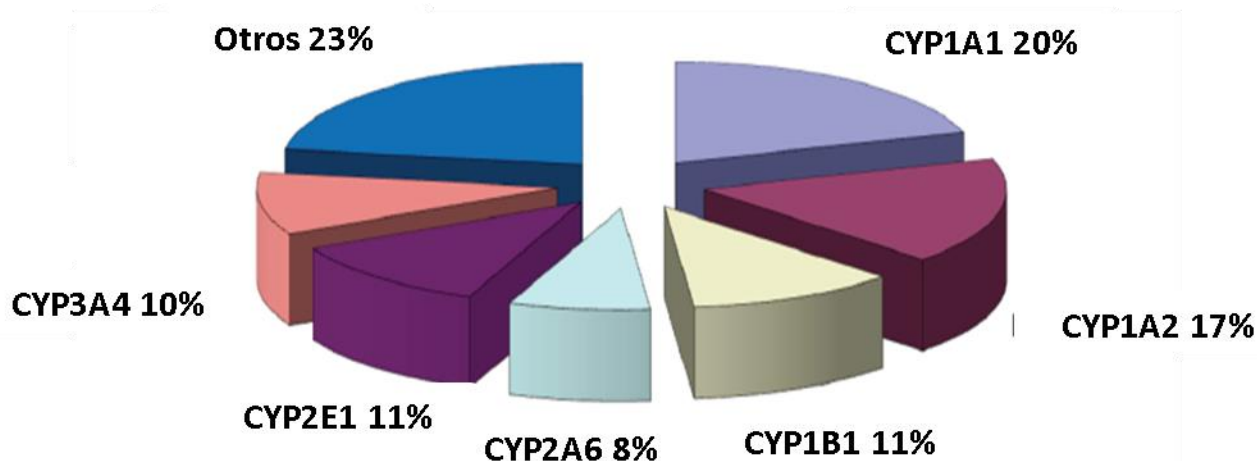


Figura 3. Porcentaje de participación de algunas familias del citocromo P450 en la biotransformación de compuestos carcinógenos. Tomada de Rendi y Guengerich, 2012 [4]

El CYP1A1 humano fue cristalizado por Walsh y colaboradores en 2013, la estructura se obtuvo a una resolución de 2.6 Å en complejo con el inhibidor α -naftoflavona (Ilustración 4), la cual consiste en 512 residuos de amino ácidos y posee un peso molecular de 58.16 kDa. Los sustratos de esta enzima son generalmente compuestos planares que poseen anillos heterocíclicos aromáticos y poliaromáticos. En general los ligandos presentan una forma alargada de 12.3 Å de largo y 4.6 Å de ancho como se muestra en la ilustración 4B [19], medidas que reflejan la cavidad del sitio activo del CYP1A1. Esta arquitectura aromática de los ligandos es esencial para la formación de un enlace π - π entre los sustratos y los residuos de fenilalanina, en especial la Phe224 en la hélice F de la enzima, además permite una mayor flexibilidad en el movimiento del sustrato, así como su unión y orientación en el sitio activo de la enzima [20].

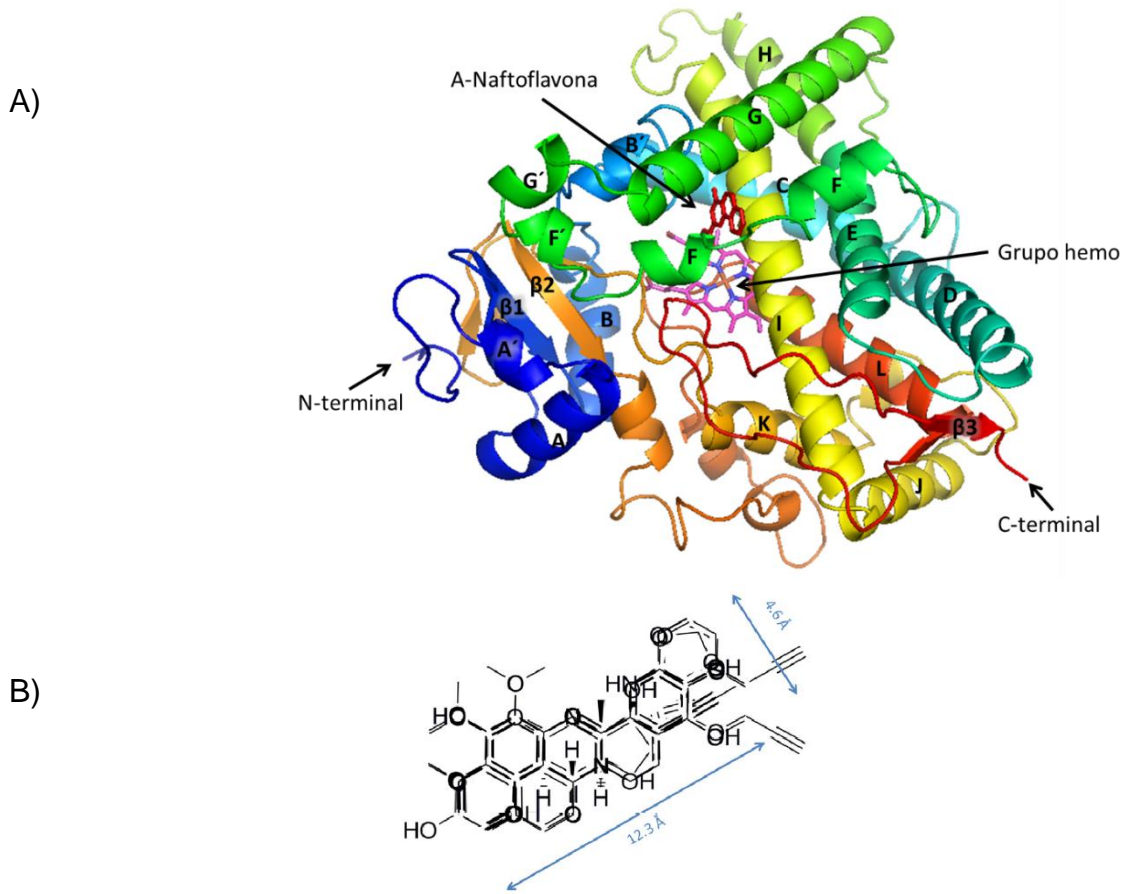


Figura 4. Estructura tridimensional del CYP1A1 humano, en color azul se muestra el N-terminal, en rojo el C-terminal, en bastones rosa el grupo hemo y en bastones rojos el ligando α -naftoflavona, figura creada con PyMOL, Molecular Graphics System, vesion 1.3 Shrödinger. LLC. B) Alineamiento de algunos sustratos de CYP1A1. Reflejan las dimensiones de la cavidad de del sitio activo de la enzima. Tomado de Liu et al., 2013 [19]

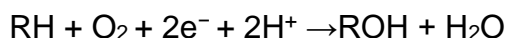
Por lo mencionado, se han reconocido a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), aminas heterocíclicas y aminas aromáticas como sustratos exógenos del CYP1A1 humano [21,22,23]. Algunos de estos compuestos se encuentran en emisiones de combustibles fósiles, alimentos carbonizados, humo de tabaco y otros productos resultantes de la combustión incompleta de la materia orgánica [24]. Se ha descrito que los metabolitos resultantes de la biotransformación de los HAP's por el CYP1A1 son capaces de generar aductos en el DNA dando lugar a eventos mutagénicos, así como aberraciones cromosómicas que contribuyen al proceso carcinogénico [25]. Por otro lado, se ha reportado que estos compuestos además de ser sustratos del CYP1A1 también pueden fungir como inductores de la biosíntesis de esta enzima a través de la vía canónica del receptor de hidrocarburos arilo (AhR). Dos de los agonistas mejor conocidos de esta vía son el benzo[a]pireno (B[a]p) y la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) [26].

El CYP1A1 también es capaz de metabolizar algunos fármacos como el omeprazol y el oltipraz [27], así como otros compuestos obtenidos de la dieta [20], al igual que compuestos endógenos teniendo como ejemplos el 17β-estradiol, el ácido araquidónico o la melatonina [28].

Estudios utilizando técnicas de microarreglos e inmunohistoquímica, han demostrado que el CYP1A1 se expresa constitutivamente en células de tumor de mama. Esta expresión se ha correlacionado con el grado y la progresión del cáncer en varias líneas celulares, lo cual supone que contribuye con la carcinogénesis, proliferación, supervivencia o quimioresistencia de las células con cáncer [29].

1.3 Mecanismo catalítico del citocromo P450

La reacción general para la mayoría de las oxidaciones dependiente de citocromos P450 es la siguiente:



Donde RH representa al sustrato y ROH al metabolito hidroxilado durante el curso de la reacción. Los CYP poseen un grupo prostético de hierro-protoporfirina IX que forman al grupo hemo, éste es el centro catalítico de la enzima; un grupo tiol de una cisteína altamente conservada se coordina con el hierro de manera opuesta al sitio de coordinación con el oxígeno [30].

En la ilustración 5 se muestran las fases intermediarias del ciclo catalítico del CYP que conducen a la hidroxilación del sustrato (H-R); así como los estados de oxidación de hierro en el grupo hemo del CYP durante este proceso. Se indica el ligando hemo proximal (cisteína tiolada indicada como átomo de azufre S ligada al hierro) y como ligando distal una molécula de agua.

En el primer paso (1) la unión del sustrato desplaza a la molécula de agua en el ligando distal; (2) lo que ocasiona un cambio en el spin del hierro del hemo férrico de bajo a alto spin provocando un potencial de hierro más positivo favoreciendo la transferencia de electrones al par redox (es decir el cofactor) para reducir al estado hemo férrico a hemo ferroso. (3) El hemo ferroso une al oxígeno para formar el intermediario oxi-ferroso. (4) Se desprende el segundo electrón del par redox para formar peróxido férrico (5). La protonación produce el compuesto hidroperoxo-férrico. (6) Otra protonación conduce a la ruptura del enlace O₂ y la formación de una molécula de agua. (7) El intermediario restante es una especie oxi-ferril con un radical de porfirina catiónica; es altamente reactivo y se denomina compuesto I, éste ataca al sustrato cercano y efectúa su hidroxilación. (8) La salida del producto R-OH permite que el agua se vuelva a unir para completar el ciclo [31].

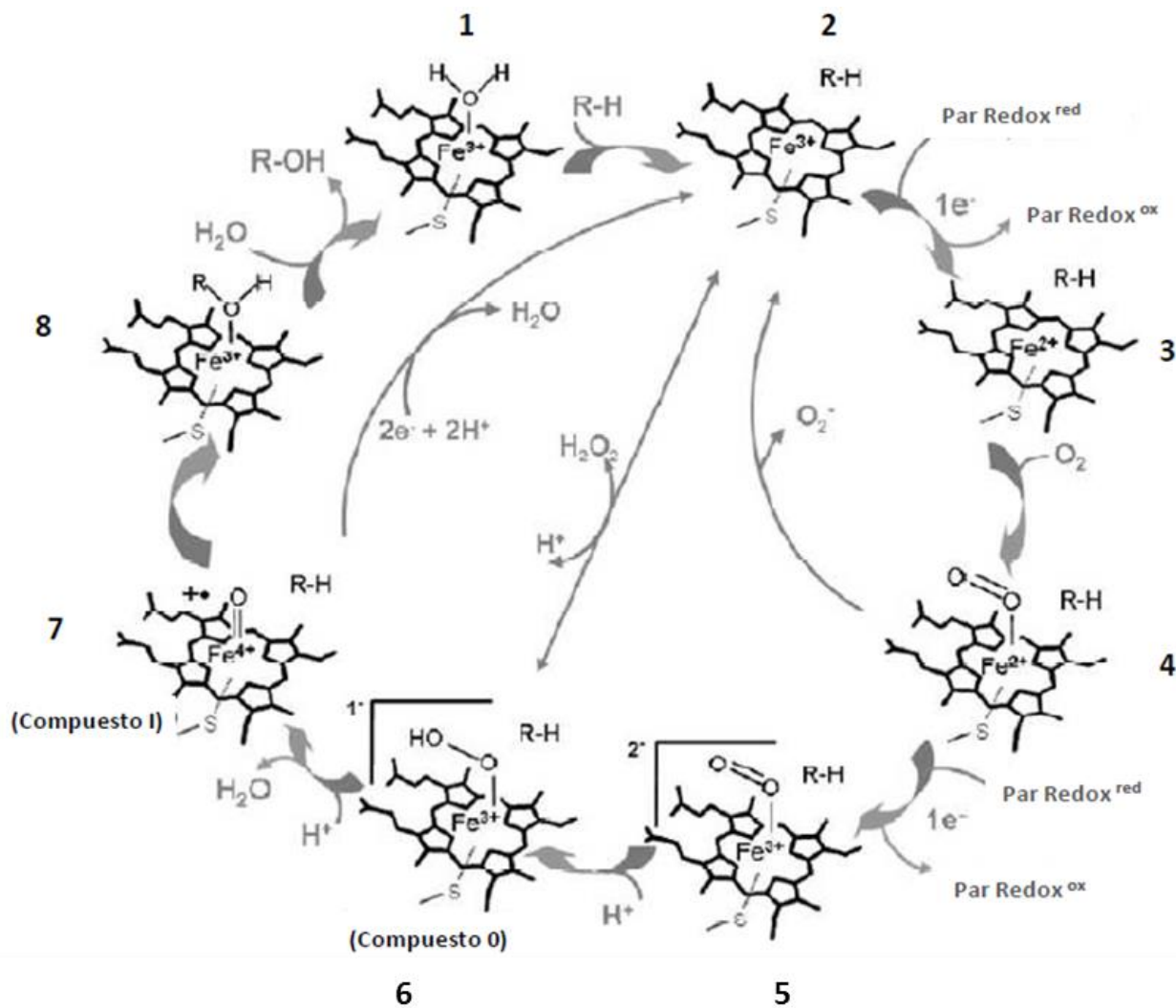


Figura 5. Ciclo catalítico del citocromo P450 Modificado de Munro *et al.*, 2007 [31].

1.4 Inhibición del CYP

Un inhibidor es aquel compuesto que disminuye o detiene la catálisis de una enzima uniéndose a ésta e interfiriendo con la reacción [32]. Los inhibidores se clasifican en dos grandes grupos: el primero de ellos son los inhibidores de tipo irreversibles, los cuales actúan uniéndose a la enzima tan fuertemente que queda bloqueada la actividad de ésta de manera permanente. El segundo grupo son los inhibidores reversibles, los cuales también disminuyen la actividad de una enzima al unirse, sin embargo, el complejo enzima-inhibidor puede disociarse, de tal manera que la enzima nuevamente es funcional. Dentro de los inhibidores reversibles existen cuatro mecanismos de inhibición, los cuales son descritos a continuación:

∞ Inhibidores competitivos, son aquellos que compiten directamente con el sustrato normal por el sitio de unión al sustrato de una enzima. Usualmente este tipo de inhibidor se asemeja al sustrato, o bien, al estado de transición. Este tipo de inhibidor reduce el nivel de enzima libre disponible para la unión al sustrato. La constante de afinidad (K_m) parece mayor, mientras que la velocidad máxima (V_{max}) no se ve afectada. En el gráfico de Lineweaver-Burk esta inhibición se observa como la intersección de todas las líneas en el eje de las ordenadas (figura 6).

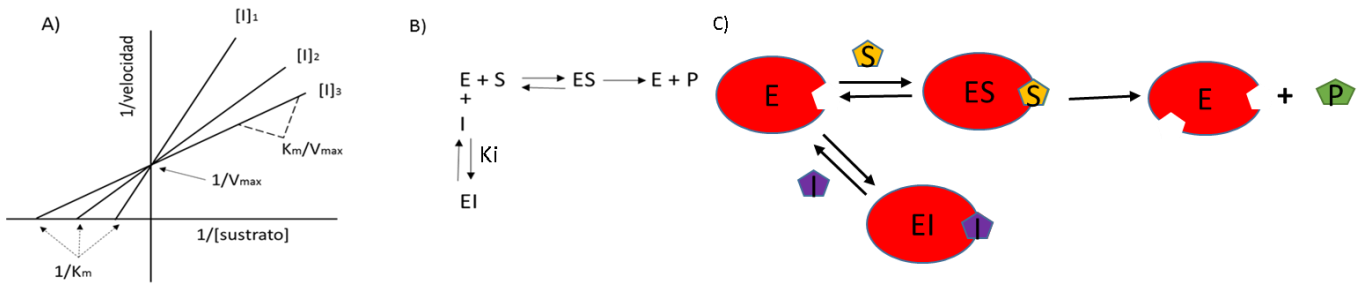


Figura 6. Inhibición competitiva A) Gráfico de Lineweaver-Burk B) Representación del proceso de unión, C) Caricatura del proceso de unión del inhibidor a la enzima. Modificado de Segel, 1976 [33]; Nelson y Cox, 2015 [32]

∞ Inhibidor acompetitivo, se une a un sitio distinto al sitio de unión al sustrato únicamente cuando se ha formado el complejo enzima-sustrato, pero no a la enzima libre, presumiblemente distorsiona el sitio activo y hace que la enzima sea catalíticamente inactiva. Produciendo un complejo sustrato-enzima-inhibidor. En este caso tanto la constante de afinidad (K_m) como la velocidad máxima (V_{max}) disminuyen proporcionalmente, lo que permite que la relación K_m/V_{max} se mantenga. En el gráfico de Lineweaver-Burk esta inhibición se observa como líneas paralelas donde solo se mantiene constante la pendiente (Ilustración 7).

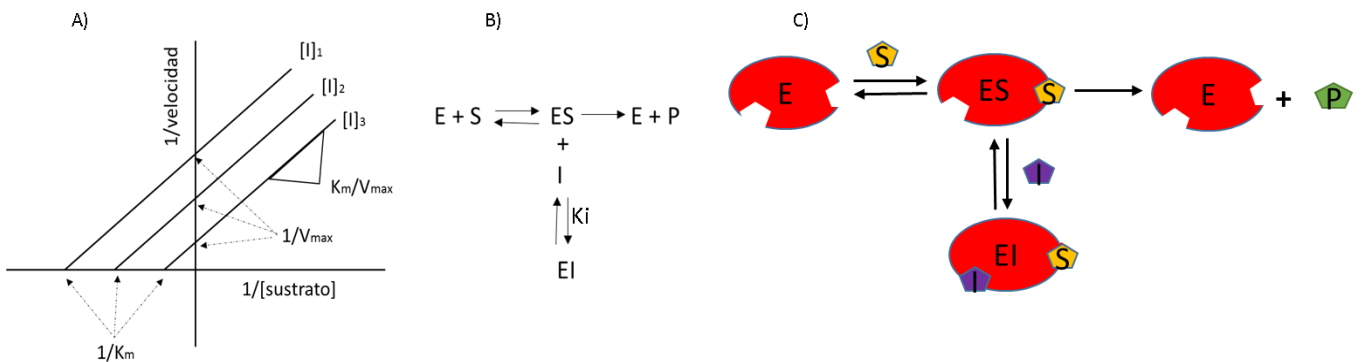


Figura 7. Inhibición acompetitiva A) Gráfico de Lineweaver-Burk B) Representación del proceso de unión, C) Caricatura del proceso de unión del Inhibidor a la enzima. Modificado de Segel, 1976 [33]; Nelson y Cox, 2015 [32].

- ∞ Inhibidor mixto, se une tanto a la enzima sola, como al complejo enzima-sustrato [34]. La afinidad por la enzima libre es diferente a la afinidad por el complejo enzima-sustrato, por lo tanto varía tanto la K_m como la V_{max} sin proporción alguna (Ilustración 8)

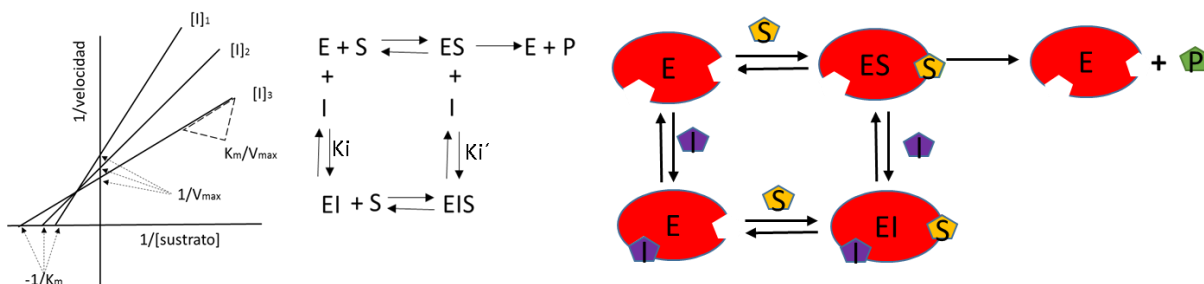


Figura 8. Inhibición mixta A) Gráfico de Lineweaver-Burk B) Representación del proceso de unión, C) Caricatura del proceso de unión del Inhibidor a la enzima. Modificado de Segel, 1976 [33]; Nelson y Cox, 2015 [32].

- ∞ Inhibidor no competitivo, al igual que el inhibidor mixto, este se une tanto a la enzima libre, como al complejo enzima-sustrato en un sitio distinto al sitio activo [34], sin embargo, la afinidad es la misma para ambos casos, de tal modo que la V_{max} presenta variaciones, mientras que la K_m permanece constante (ilustración 9)

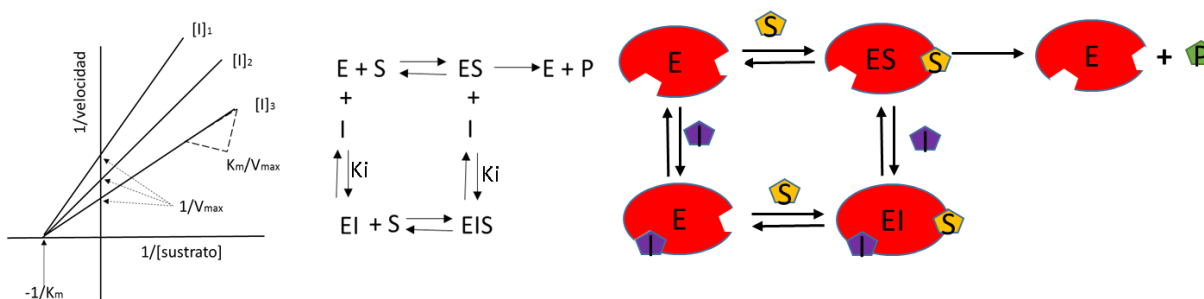


Figura 9. Inhibición no competitiva A) Gráfico de Lineweaver-Burk B) Representación del proceso de unión, C) Caricatura del proceso de unión del Inhibidor a la enzima. Modificado de Segel, 1976 [33]; Nelson y Cox, 2015 [32].

1.5 Flavonoides y su interacción con los CYP

Los flavonoides son moléculas de origen natural, compuestas por tres anillos polifenólicos (Ilustración 10), se clasifican según los sustituyentes que tengan y difieren en los arreglos de hidroxilo, metoxilo y conjugación de glucosídeos entre los anillos A, B y C [35,36]. La relativa seguridad de estos compuestos ha llevado a que se utilicen como agentes terapéuticos tanto en la medicina tradicional como moderna, de la misma manera como suplementos en la dieta para prevenir enfermedades por a sus propiedades. Aunque la ingesta en la dieta de estos compuestos varía según el país, se considera que oscila entre 23 mg y 1 g por día [37]. Estos compuestos provienen de la dieta en forma de O-glicósidos, por lo cual son considerados como no absorbibles de forma directa, pero a través de microorganismos presentes en el colon, son

hidrolizados a su forma de flavonoides libres, de esta forma pueden pasar a través de las paredes del intestino. Hay principalmente dos sitios donde se lleva a cabo el metabolismo de los flavonoides: en el hígado y en el colon, a través de la microbiota que además de liberarlos también los degradan a ácidos fenólicos [35,36].

Actualmente se sabe que los flavonoides poseen diversas propiedades bioquímicas y farmacológicas, las cuales varían según el número y la posición de los sustituyentes hidroxilo y/o metoxilo que posee la molécula [38,39]. Una de las funciones biológicas ampliamente investigadas es su contribución en la prevención del cáncer, la cual se atribuye a distintos mecanismos implicados, entre los cuales se encuentra que atrapan radicales libres, modifican enzimas que activan o detoxifican carcinógenos o inhibiendo estas enzimas [40,41].

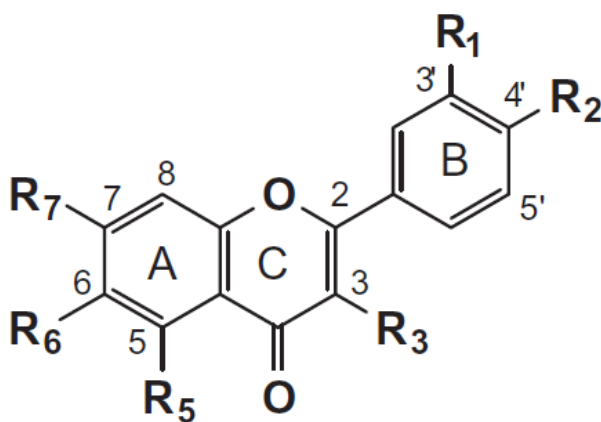


Figura 10. Estructura básica de los flavonoides, donde R_n puede ser sustituido por un grupo hidroxilo (OH) o un grupo metoxilo (OCH_3)

Se ha documentado que estos compuestos interactúan con los CYP en al menos tres formas: (i) los flavonoides inducen la biosíntesis de algunos CYP; (ii) ciertos flavonoides pueden ser metabolizados por estos mismos y (iii) la actividad enzimática de algunos CYP está modulada (ya sea inhibida o estimulada) por estos compuestos [42].

- i. Los flavonoides pueden inducir directamente la expresión de un gen vía receptor específico o estabilizando el mRNA. Se ha reconocido que estos compuestos inducen la expresión de CYP a través de la unión al receptor hidrocarburo aril (AhR), un factor de transcripción activado por ligando [41]. Un ejemplo de ello es la quercetina, capaz de unirse a AhR incrementando la cantidad de mRNA de CYP1A1; por otro, lado el kaempferol actúa como antagonista de AhR inhibiendo la transcripción del mismo gen y la expresión de esta proteína impidiendo que compuestos activadores como el TCDD se unan a este receptor para activarlo [43,44].
- ii. Algunos de los polifenoles metabolizados por CYP son gradualmente hidroxilados y/o O-desmetilados, por ejemplo la galagina (3,5,7-trihidroxi-flavona) es secuencialmente hidroxilada a kaempferol (3,5,7,4'-tetrahidroxi-flavona) y posteriormente a quercetina (3,5,7,3',4'-penta-hidroxi-flavona) por un mecanismo dependiente principalmente del

CYP1A1 [45,46]. Por otra parte los CYP también llevan a cabo reacciones de O-desmetilación sobre estas moléculas, tal es el caso de la hespetina (5,7,3'-trihidroxyflavona-4'-metoxiflavona), donde esta reacción se lleva a cabo en la posición 4' por el CYP1A1 y CYP1B1 [47].

- iii. Finalmente, estos compuestos son capaces de modular la actividad de los CYP de dos maneras, una de ellas es estimulando la actividad de las enzimas, tal es el caso de la α -naftoflavona, la cual puede actuar potenciando la actividad del CYP3A4, mientras que, por otro lado, se sabe que este mismo flavonoide inhibe la actividad catalítica del CYP1A1 y CYP1A2 [48,49].

1.6 Flavonoides como inhibidores del CYP1

La capacidad de los flavonoides como agentes bloqueadores de la actividad de los CYP ha sido ampliamente estudiada ya que puede ser utilizada como una herramienta importante para combatir etapas iniciales de carcinogénesis. Esta propiedad de inhibir a los CYP se encuentra estrechamente relacionada con su estructura. Existen evidencias indicando que particularmente los flavonoides con grupos hidroxilo y metoxilo tienen un elevado potencial y alta selectividad para inhibir enzimas de la familia CYP1; lo cual proyecta importantes implicaciones para la prevención del cáncer, así como otros efectos farmacológicos y tóxicos [50].

Se ha considerado que estas moléculas deben poseer una serie de requerimientos estructurales para actuar como buenos inhibidores de esta familia, dentro de los cuales se encuentra 1) poseer una conformación planar, característica atribuida al doble enlace entre el C2 y C3 del anillo C, 2) un grupo oxo en la posición 4 del mismo anillo, 3) un grupo hidroxilo en la posición C3 [47,51,52]. Estas particularidades son específicas para cada isoforma, por ejemplo, un grupo metoxilo en la posición 4' eleva altamente la capacidad de estas moléculas para inhibir al CYP1B1 [51,53]; mientras que un grupo hidroxilo en la posición 5 incrementa la selectividad para la inhibición del CYP1A2 [54,55]. Se ha demostrado que la adición de un grupo hidroxilo en un esqueleto de 5,7-dihidroxyflavona contribuye a elevar la selección por el CYP1A1 [20, 38]. Así como otras características ejemplificadas en la ilustración 11.

La inhibición de la actividad de 7-etoxirresorufina-O-deetilasa (EROD) es un ensayo bien documentado para cuantificar el potencial de inhibición de actividad de algunas enzimas CYP (entre ellas las de la familia CYP1), en este caso por flavonoides. En el modelo se lleva a cabo la reacción de transformación del sustrato 7-etoxirresorufina en resorufina, un compuesto que emite fluorescencia cuantificable, lo cual resulta útil para cuantificar la actividad catalítica de la enzima [25]. En el caso del CYP1A1 la actividad EROD es más sensible con este sustrato que con otros como la pentoxiresorufina y la metoxiresorufina.

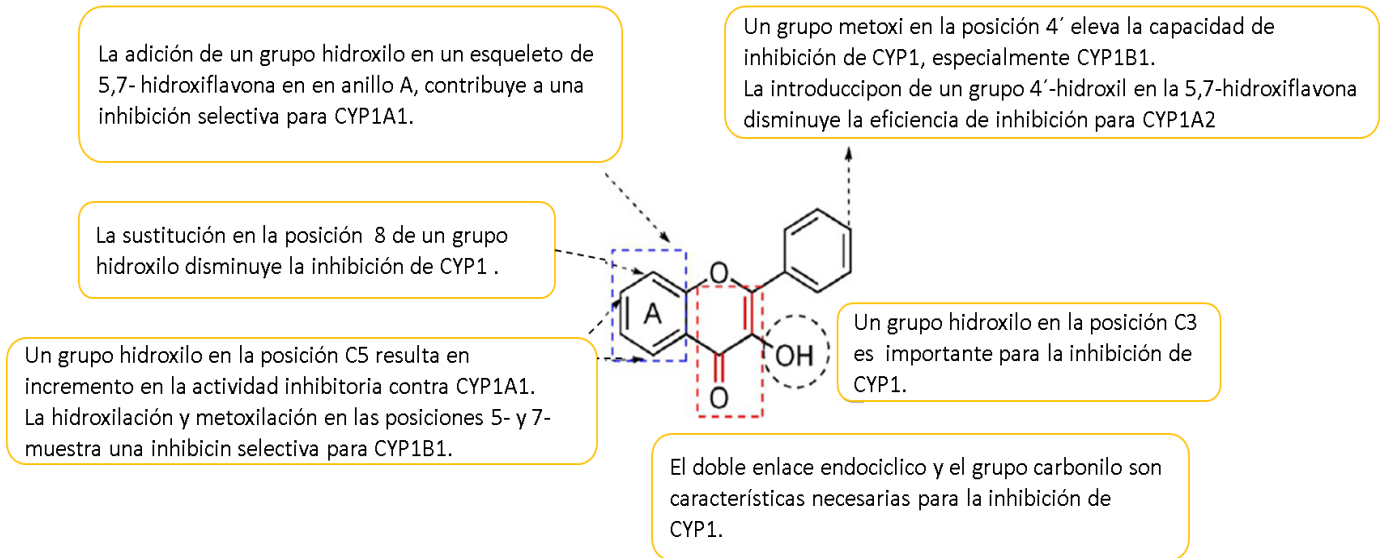


Figura 11. Algunas características de la relación estructura actividad de los flavonoides como inhibidores de CYP1. Modificado de Dong *et al.* 2016 [7]

Los flavonoides utilizados en este estudio son flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, quercetina, miricetina, luteolina, fisetina, kaempferol e hidrato de morina (ilustración 12). Se eligieron estas moléculas debido a la variedad que presentan en posición y número de grupos OH [53,56]; además de que cuentan con algunas de las características que se han postulado necesarias para la inhibición del CYP1A1. La mayoría de estas moléculas se encuentran presentes en la naturaleza, excepto la 3-HF, molécula de origen sintético.

Se ha reportado a la α -naftoflavona (un derivado sintético de flavonoides naturales) como un potente inhibidor de varias enzimas CYP, entre ellas el CYP1A1 [48] y es por esto por lo que es utilizado como un compuesto de referencia para comparar la potencia de inhibición de los flavonoides probados en este trabajo. Sin embargo, se ha demostrado que tiene efectos perjudiciales como el incremento en el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de individuos fumadores. Del mismo modo se ha señalado como agente clastogénico al coíncubarse con microsomas de rata tratadas con TCDD en cultivos de células de ovario de ratón Chino y causar aberraciones cromosómicas [56,57], lo cual demuestra que no es un compuesto viable para ser utilizado como agente quimioprotector contra el cáncer.

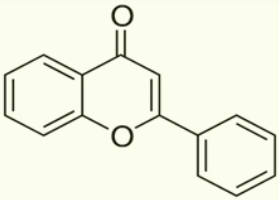
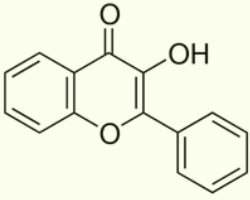
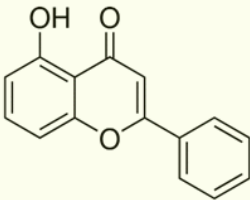
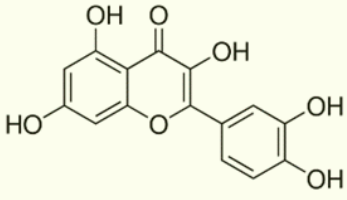
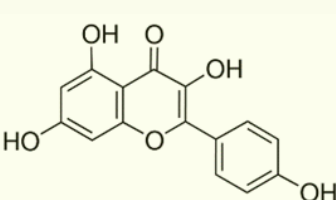
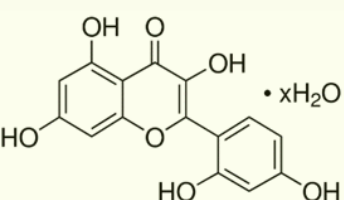
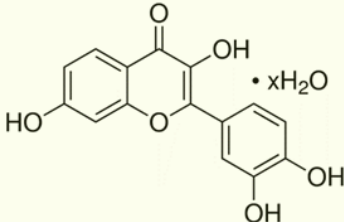
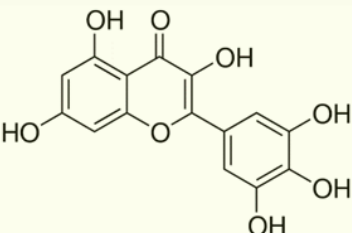
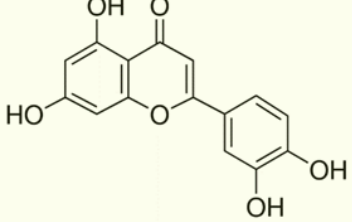
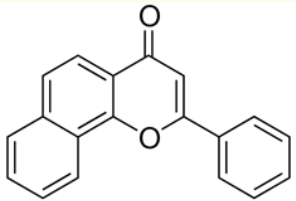
		
Flavone	3-hydroxyflavone	5-hydroxyflavone
		
Quercetin	Kaempferol	Morin hydrate
		
Fisetin	Miricetin	Luteolin
		
α -naftoflavona		

Figura 12. Estructura química de los flavonoides probados en este trabajo: flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, quercetina, miricetina, luteolina, fisetina, kaempferol e hidrato de morina. La α -naftoflavona se utiliza como ejemplo de un potente inhibidor ya conocido del CYP1A1.

1.7 Mutagenicidad de flavonoides.

Como se ha mencionado anteriormente, los flavonoides se han caracterizado en general por tener propiedades benéficas para la salud. Sin embargo, se han reportado efectos adversos, tales como la mutagenicidad y la peroxidación lipídica [59]. La mutagenicidad es la producción de alteraciones en la secuencia de nucleótidos del material genético (ADN) que da lugar a una modificación permanente de la constitución hereditaria. Esta característica de los flavonoides depende del número y de la posición de los grupos hidroxilo en el anillo B. Por otro lado, las reacciones de hidroxilación mediadas por los CYP en estas moléculas también pueden aumentar la genotoxicidad de las mismas.

En 1978, MacGregor y Jurd establecieron algunos requerimientos estructurales generales para la mutagenicidad de estos fitoquímicos a través de un estudio en el cual consideraron la relación estructura-actividad de estos compuestos. Sugieren que la estructura de los anillos de flavonoides deben poseer I) un grupo libre hidroxilo en la posición 3, II) un doble enlace en las posiciones 2 y 3, III) un grupo ceto en la posición 4 y IV) una estructura que permita que el protón del grupo 3-hidroxilo se tautomerice a un compuesto 3-ceto [56]. Posteriormente a través de ensayo del Ames también se determinaron otras características como la presencia de grupos hidroxilo libres ya sea originalmente presentes o metabólicamente formados, en las posiciones 3 y 7 del anillo, así como al menos un grupo hidroxilo en el anillo B (ver ilustración 9) [60,61].

Se postula que la genotoxicidad de los flavonoides está asociada con la formación de especies reactivas de oxígeno resultantes de la autooxidación de estas moléculas. Un ejemplo de ello es la quercetina, que puede oxidarse vía enzimática o química a una especie de quinona de carácter pro-oxidante, capaz de unirse de manera covalente al ADN [56,62].

1.8 Ensayo de mutagenicidad (prueba de Ames)

Las mutaciones, son cambios en la secuencia de nucleótidos que componen el ADN. Un evento de mutagenicidad puede ser causado por agentes que generan cambios puntuales donde se modifica, inserta o elimina una base. En el primer caso una base es sustituida por otra del mismo tipo (transición), o bien remplazada por una base diferente (transversión). Por otro lado, el corrimiento de marco de lectura ("frameshift") es el resultado de la adición o eliminación de nucleótidos.

Diversos agentes químicos pueden ser causantes de las mutaciones, y para ello existe pruebas para determinar la seguridad de los compuestos. La prueba de Ames es un ensayo bacteriano desarrollado por el Dr. Bruce Ames en 1975 [63], en el cual se determina el potencial mutagénico de los compuestos utilizando como modelo cepas de *Salmonella typhimurium*, caracterizadas porque cada cepa de prueba contiene un tipo diferente de mutación en el operón

de histidina, impidiendo que las bacterias sinteticen este aminoácido, es decir, son auxótrofas de histidina (His⁻), esta mutación es reversible ya sea de manera espontánea o inducida por un agente químico [64]. Adicionalmente, las bacterias cuentan con otras mutaciones que incrementan su sensibilidad ante agentes mutagénicos:

- ∞ La mutación en el gen **rfa** causa la pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos, favoreciendo la permeabilidad a moléculas de mayor de tamaño que de manera normal no entran a la bacteria [64].
- ∞ El gen **uvrB** codifica para el sistema de reparación por escisión de bases; al ser eliminado este sistema de reparación, las bacterias son más sensibles a las modificaciones causadas en el ADN. Esta delección implica al operón de biotina, lo cual ocasiona que la bacteria también presente deficiencia de esta vitamina [64,65].
- ∞ El plásmido **factor R**, pKM101 incrementa la vía de reparación por la DNA polimerasa error-prone cuyo mecanismo tiende a errores; este sistema un sistema que se presenta de forma normal en estos organismos a través de los genes mucAB. Este sistema favorece la mutagénesis química y espontánea. Este plásmido sólo lo tiene algunas cepas, entre ellas las de uso común como: TA97, TA98, TA100 y TA102 [64,66].

La prueba de Ames se fundamenta en que el compuesto mutagénico revertirá la condición mutante de His⁻ a His⁺, reflejando el crecimiento bacteriano en placas con medio de cultivo ausente de histidina. El resultado se considera positivo cuando el número de revertantes inducidas es igual o superior al doble del número de colonias revertantes espontaneas del control negativo.

La cepa TA98 detecta varios mutágenos que actúan por corrimiento del marco de lectura o "frameshift". Los mutágenos frameshift pueden estabilizar varias bases corridas que usualmente ocurren en secuencias repetidas o "hot-spots" de DNA, resultando en una mutación que reestablece el marco de lectura. El tipo de mutación que posee en el operón histidina es la *hisD3052*, esta mutación se encuentra en el gen *hisD* el cual codifica para histidinol deshidrogenasa, posee la secuencia $\frac{-GCGCGCGC-}{-CGCGCGCG-}$, son 8 residuos repetidos de -GC- cerca del sitio -1 de la mutación frameshift. Este tipo de mutaciones, son revertidas por mutágenos como el 2-nitrofluoreno y la daunomicina. El plásmido de factor R también le otorga resistencia a la ampicilina a esta cepa [64,66].

Comúnmente para hacer más sensible esta prueba se emplea la adición de un homogenado de hígado de rata (fracción S9) tratadas con compuestos como el Aroclor 1254 o la β-naftoflavona que favorecen la expresión de citocromos P450. Éstas y otras enzimas de fase I y II son capaces

de biotransformar compuestos pro-mutágenos a su forma activa; debido a que las bacterias no cuentan con los mismos sistemas metabólicos que los mamíferos y otros vertebrados, resulta una herramienta útil para determinar aquellos compuestos que requieren activación metabólica para ejercer su acción mutagénica [65,67].

1.9 Fracción S9 de hígado humano

Desde que se estableció el ensayo de Ames, se han desarrollado modificaciones para hacer que esta prueba sea más sensible y de ser posible con mayor fidelidad hacia lo que ocurre en los seres humanos; una de estas modificaciones ha sido la inclusión de la fracción S9 humana que sustituye a la fracción S9 de ratas inducidas como sistema metabólico. Esto se debe a que existen importantes diferencias entre las enzimas humanas y las de rata, incluyendo cuestiones de actividad como de afinidad a los compuestos, además de que la fracción S9 humana puede reflejar con mayor precisión lo que ocurriría en los seres humanos [68,69].

La fracción S9 es preparada a partir de un homogenado de hígado en una solución de 0.15 M KCl, el sobrenadante se obtiene a través de centrifugación a 9000 g, y contiene una parte microsomal con proteínas citocromo P450, flavín monooxigenasas (FMO), esterasas, amidasas y epóxido hidrolasas, así como enzimas de fase II como la glucoroniltransferasa (UGT). Pueden ser preparados a partir de un solo donador, o de una mezcla de donadores. Para que estas enzimas tengan actividad catalítica es necesario adicionar cofactores con el NADPH, necesario para la actividad del CYP [69,70].

Entre las desventajas de utilizar este relativamente nuevo sistema metabólico, se encuentra la dificultad para adquirir el material humano, la variabilidad en la actividad de los lotes de S9, ya que en el caso del S9 de rata, se obtiene de animales en condiciones controladas, cosa que no sucede con los donadores humanos puesto que existen muchos factores como la edad, sexo, peso, variabilidad genotípica, entre otras, que pueden afectar la capacidad para metabolizar xenobióticos, así como baja actividad enzimática del S9 humano comparada con aquella del S9 de ratas inducidas [71].

El uso de S9 humano en ensayo de mutagenicidad también es valioso porque demuestra que las enzimas de hígado humano están jugando un papel crítico al momento de activar promutágenos o detoxificarlos. Y el hecho de utilizar enzimas de hígado humano los posibles riesgos genotóxicos en el mismo modelo, además de que, se pueden comparar variaciones en la magnitud de mutagenicidad medida con S9 humano, S9 de rata inducida y S9 de rata no inducida [70,72,73].

2. Planteamiento del problema

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son unos de los compuestos con mayor presencia en el ambiente, pues derivan del humo de tabaco, productos de la combustión de gasolina y diésel, alimentos carbonizados y otros productos resultantes de la combustión incompleta de la materia orgánica. Estos compuestos son metabolizados principalmente por la familia de CYP1A y sobre todo la isoforma CYP1A1. Se ha descrito que el resultado de la interacción del CYP1A1 y los HAP's pueden ser metabolitos capaces de generar aductos en el DNA, causando eventos mutagénicos y aberraciones cromosómicas que contribuyen con el proceso carcinogénico.

La identificación de moléculas de origen natural capaces de inhibir enzimas involucradas en el metabolismo y activación de carcinógenos, tales como el CYP1A1 abre la posibilidad de contar con fármacos que podrían prevenir cáncer.

Los flavonoides son fitoquímicos que han demostrado tener efectos inhibitorios sobre los citocromos P450, y entre estos compuestos, se ha descrito que las flavonas poseen más especificidad por la subfamilia CYP1A [50]

Con base en estos antecedentes, se proponen nueve flavonoides tanto de origen natural como sintético: flavona, 3-hidroxiavona, 5-hidroxiavona, quercetina, miricetina, luteolina, fisetina, kaempferol e hidrato de morina, los cuales difieren entre sí en la cantidad y posición de sustituyentes OH en su esqueleto. Aquellos que sean los mejores candidatos con un mayor potencial de inhibición para el CYP1A1 y con bajo o nulo efecto mutagénico, podrán ser propuestos como agentes quimiopreventivos de cáncer.

Ante la posibilidad de que estos flavonoides funcionen como agentes quimioprotectores y el CYP1A1 como un blanco terapéutico, resulta relevante definir el tipo de inhibición que estos compuestos llevan a cabo sobre la enzima.

Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se han realizado con metabolismo de roedores, por lo que trabajar con enzimas del metabolismo humano abre nuevas posibilidades en la investigación de mutágenos y carcinógenos ambientales y muestra de manera más fiel el comportamiento que podría tener esta interacción entre los flavonoides y el CYP1A1 en los humanos.

3. Hipótesis

La potencia de inhibición de los flavonoides estará dada en función de la cantidad de sustituyentes OH en su estructura. Estos inhibidores son semejantes a los sustratos del CYP1A1, los cuales no cuentan con sustituyentes OH en su estructura. Por tanto, asumimos que, dentro de los flavonoides probados, aquellos con menor número de grupos OH, ejercerán mayor inhibición sobre el CYP1A1 humano. Ya que la estructura de los flavonoides probados se asemeja a la de los sustratos del CYP1A1, la inhibición ejercida será de tipo competitiva, de tal modo que los inhibidores se unirán al sitio activo.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Identificar a los flavonoides con una mayor potencia de inhibición de CYP1A1 humano y una baja o nula mutagenicidad.

4.2 Objetivos Particulares

- ∞ Inducir al CYP1A1 humano recombinante en cultivo de *Escherichia coli* DH5α transformada con el plásmido apropiado.
- ∞ Obtener la fracción membranal bacteriana.
- ∞ Medir la actividad del CYP1A1 humano en la fracción membranal bacteriana mediante el ensayo EROD.
- ∞ Determinar la CI_{50} de 3-hidroxi flavona, 5-hidroxi flavona, flavona, quercetina, miricetina, luteolina, fisetina, kaempferol e hidrato de morina sobre CYP1A1.
- ∞ Caracterizar la cinética enzimática de los flavonoides que resultaron tener mayor potencial de inhibición.
- ∞ Determinar *in silico*, mediante estudios de acoplamiento molecular, las interacciones del sustrato e inhibidores con el CYP1A1 humano de los flavonoides que resultaron tener mayor potencial de inhibición.
- ∞ Determinar la capacidad mutagénica de los flavonoides que resultaron tener mayor potencial de inhibición mediante la prueba de Ames con y sin mezcla S9 humano.

5. Metodología

5.1 Expresión del CYP1A1 humano en *E. coli*

Para obtener la proteína CYP1A1 humana necesaria para esta investigación, se utilizaron bacterias construidas y donadas por Dr. Peter Guengerich de la Universidad de Vanderbilt en Tennessee, EUA. Dichas bacterias corresponden a *Escherichia coli* DH5 α que poseen el vector pcW donde fue insertado el gen que codifica para CYP1A1 humano [74].

Se realizó el cultivo de células *E. coli* DH5 α transformadas que sobreexpresan CYP1A1 en medio sólido Luria Bertani (LB) suplementado con ampicilina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se toma una colonia aislada con la cual fue inoculada en 10 mL de medio líquido LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se dejó crecer a 37 °C; transcurridas 16 h se inocularon en 1 L de medio TB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tiamina (1 mM) y elementos traza (6.75 mg/L de FeCl_3 , 1mg/L de ZnCl_2 , 1 mg/L de CaCl_2 , 1 mg/mL de CuCl_2 y 25 μL de HCl concentrado), se incubaron durante 5 h a 30 °C en agitación de 150 rpm. Transcurrido el tiempo se adicionaron los inductores isopropil β -D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y ácido delta aminolevulónico (ALA) a una concentración final de 0.5 mM y se continuó la incubación durante 20 h a 30 °C, 150 rpm.

5.2 Obtención de la fracción membranal de *E. coli*

Para la obtención de la fracción membranal el cultivo se centrifugó a 4 000 g durante 15 min a 4 °C y fue colectada la biomasa. El botón resultante se resuspendió 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), con 5 mL de amortiguador por cada 100 mL de cultivo, posteriormente se diluyó dos veces con agua y se adicionó la lisozima hasta una concentración final de 0.1 mg/mL, se agitó ligeramente y se incubó en hielo durante 30 min para efectuar la hidrólisis de membranas.

Nuevamente se centrifugó a 40 000 g durante 14 min a 4 °C para recuperar los esferoplastos y el botón resultante se resuspendió nuevamente en amortiguador B (solución de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.4, conteniendo acetato de magnesio 6 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y glicerol 20% v/v) en una proporción de 2 mL de amortiguador por cada 100 mL de cultivo. Se adicionaron los 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.

A continuación, las células se lisaron utilizando un sonicador de aguja al 70% de su capacidad máxima, a intervalos de 1 min durante 10 minutos.

Finalmente, el lisado se centrifugó a 10 000 g durante 20 min a 4 °C, recuperando el sobrenadante que fue sometido a una última centrifugación de 100 000 g por 90 min. Se recuperó el botón y se resuspendió en el mínimo volumen posible de amortiguador B, por último, se almacenó a -80 °C

5.3 Determinación de la actividad enzimática

Los ensayos de actividad enzimática se llevaron a cabo mediante la capacidad de O-deetilasa que posee el CYP1A1. El sustrato utilizado fue 7-etoxirresorufina que es metabolizado por el CYP1A1 por acción EROD (etoxirresorufina O-deetilasa) y tiene como producto la resorufina compuesto cuantificable mediante fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de emisión de 590 nm [75].

Se realizó una curva patrón mezclando 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 o 1000 pmoles de resorufina en amortiguador de Tris-base 50 mM y cloruro de magnesio 25 mM pH 7.6 en un volumen final de 200 µL.

La reacción enzimática se llevó a cabo en una placa de 96 pozos con una mezcla de amortiguador de Tris-base 50 mM y cloruro de magnesio 25 mM pH 7.6, 50 µM de 7-Etoxirresorufina disuelto en DMSO, 40 µg de fracción membranal y en su caso, una curva de concentración de cada flavonoide disuelto en DMSO.

La mezcla se incubó durante 3 min a 37 °C. A continuación, se comenzó la reacción enzimática al adicionar 50 µM de NADPH disuelto en amortiguador. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 200 µL.

La formación del producto se evaluó cada 20 s durante 15 min a 37 °C 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.

Para determinar la actividad enzimática con cada concentración de inhibidor se realizaron triplicados, expresando los resultados en porcentaje respecto a la actividad del control. Cada punto es el promedio de tres experimentos independientes con su respectivo error estándar. Para establecer la Concentración Inhibitoria Media CI_{50} , se determina la concentración de inhibidor que disminuye la actividad enzimática al 50%, a través del análisis de las curvas de concentración-efecto utilizando el programa GraphPad Prism 6 para Windows. Se realizó el ajuste no lineal de datos a la siguiente ecuación para un inhibidor parcial [76].

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

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 del inhibidor.

CI₅₀ es la concentración inhibitoria media.

5.4 Determinación de la cinética enzimática

Los ensayos de actividad enzimática se llevaron a cabo mediante la capacidad de O-deetilasa que posee el CYP1A1. El sustrato utilizado fue 7-etoxirresorufina.

La cinética enzimática de CYP1A1 se llevó a cabo en una mezcla de amortiguador pH 7.6 (Tris-base 50 mM y cloruro de magnesio 25 mM), diferentes concentraciones de 7-etoxirresorufina (0.15, 0.32, 0.42, 1.25, 2.50, 3.75, 5, 10 μM) disuelto en DMSO y 40 μg de fracción membranal.

Para la cinética de inhibición se emplearon las siguientes concentraciones de los flavonoides que resultaron ser los inhibidores más potentes. Para la 5-hisroxiflavona: 45, 90, 180 y 270 nM; para la 3-hidroxiflavona: 30, 60, 90 y 120 nM y para la flavona 40, 80, 160 Y 420 nM.

Se realizaron triplicados para las determinaciones de la actividad enzimática para cada concentración de inhibidor en presencia de diferentes concentraciones de sustrato. Los resultados son expresados en pmol de resorufina formada por minuto por mg de proteína (pmol resorufina/min*mg proteína).

La determinación de los parámetros cinéticos V_{max}, K_m y K_i se realiza a través del programa GraphPad Prism 6, versión para Windows; se realizó un ajuste por regresión no lineal de los datos de velocidad inicial de reacción en función de la concentración de sustrato en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de inhibidor con las siguientes ecuaciones:

- Michaelis-Menten

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

- Inhibición competitiva

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

- Inhibición no competitiva

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

- Inhibición acompetitiva

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

- Inhibición mixta

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

Donde:

v_o es la velocidad inicial de reacción.

[S] es la concentración de sustrato

[I] indica la concentración del inhibidor (flavona, 3-hidroxiflavona o 5-hidroxiflavona)

K_{ic} es la constante de inhibición de la enzima libre

K_{iu} indica la constante de inhibición del complejo enzima-sustrato.

Fue asignado como el modelo de inhibición preferente aquel que mostró mayor coeficiente de relación y menor valor absoluto de la suma de errores al cuadrado derivados del ajuste no lineal, y fue ilustrado con el gráfico de dobles recíprocos.

5.5 Evaluación *in silico* de la interacción del CYP1A1 con los flavonoides

Las estructuras químicas de los ligandos se tomaron de la base de datos ChemSpider de la Real Sociedad de Química, posteriormente se ajustó el formato en el programa OpenBabel.

A través de la base de datos Protein Data Bank se obtuvo la estructura tridimensional del CYP1A1 que cuenta con el código PDB 4I8V.pdb (ilustración 4A), y empleando el programa PyMOL Molecular Graphics System, version 1.3 Schrödinger, LLC. se modificó para eliminar el ligando con el cual fue co-cristalizado, así como para adecuar la molécula para llevar a cabo el acoplamiento molecular.

Con el programa AutoDockTools (ADT) versión 1.5.6, se realizó la incorporación de todos los átomos de hidrógeno no polares y la asignación de las cargas Gasteiger a la proteína y a los ligandos, generando los archivos.pdbqt correspondientes. A partir de estos, utilizando el programa AutoDockVina [77], se llevó a cabo la obtención de los archivos que contienen las conformaciones tridimensionales de los ligandos con las macromoléculas, donde se eligieron aquellas que presentaron las energías de unión calculadas más negativas.

Los cálculos son hechos para proteína fija y ligando flexible empleando el algoritmo genético lamarckiano. El sitio de acoplamiento para el CYP1A1 humano se estableció con las siguientes dimensiones del centro en X: -20.056, Y: 39.099, Z: -35,592 Å, con un espaciamiento de 1.0 Å, tamaño de X: 60, Y: 46, Z: 54 Å.

Se utilizaron los programas de PyMOL (Schrödinger, LLC) y LigPlot (EMBL-EBI) para el análisis de los resultados del acoplamiento molecular y la preparación de las figuras correspondientes.

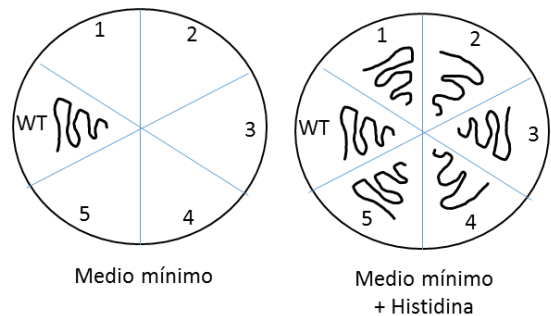
5.6 Prueba de mutagenicidad

Se utiliza la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* en la prueba de Ames, la cual fue donada por el Dr. Bruce Ames de la Universidad de California, Berkeley, C.A. USA. Se empleó la Quercetina (QT) como control positivo de mutagenicidad, y como sistema enzimático de activación metabólica se utiliza S9 de hígado humano comprado de Moltax. Lote: 3827; mezcla de hígado de cinco donadores masculinos.

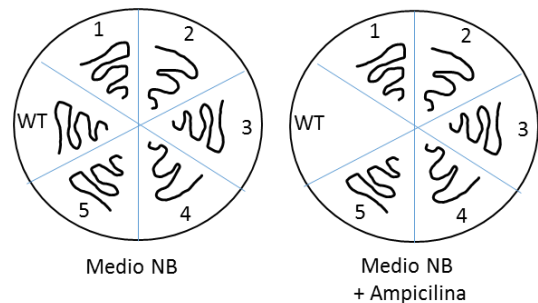
5.6.1 Verificación de marcadores genotípicos

De un cultivo de reserva congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se tomó una muestra y se sembró en una caja Petri con medio solido Nutrient Broth suplementada con ampicilina ($25\text{ }\mu\text{g/mL}$), y se incubó durante 72 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez que han crecido, se seleccionaron 5 colonias aisladas y cada una es sembrada en un tubo con 5 mL de medio Nutrient Broth No.2 OXOID liquido suplementado con ampicilina ($25\text{ }\mu\text{g/mL}$) durante 16 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación constante de 150 rpm.

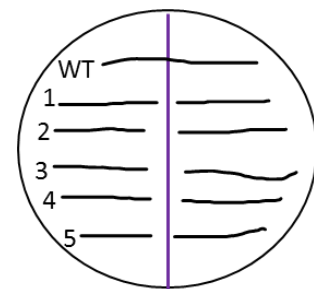
- ∞ Requerimiento de histidina: Con un aplicador de madera se inocularon las 5 colonias seleccionadas en dos cajas Petri que contiene medio mínimo de Voguel-Bonner, una de ellas suplementada con $320\text{ }\mu\text{L}$ de una solución de Histidina 0.1 M / Biotina 0.5 mM . Para verificar que poseen la mutación *hisD3052* las bacterias deben crecer solo en la caja con el medio suplementado con histidina.



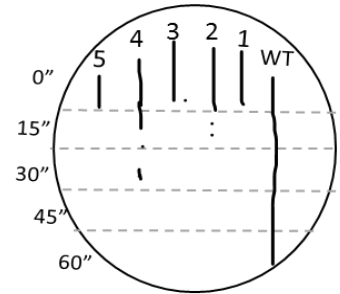
- ∞ Presencia del plásmido: Con un aplicador de madera se inocularon las 5 colonias seleccionadas en dos cajas Petri que contiene medio NB, una de ellas suplementada con ampicilina ($25\text{ }\mu\text{g/mL}$). Para verificar la presencia del plásmido pKM101 las bacterias deben crecer en ambas cajas, mostrando resistencia a la ampicilina.



- ∞ Sensibilidad al cristal violeta: En una caja Petri con medio NB se colocó una línea de cristal violeta (0.1%) que cruce la caja, una vez seca se siembran en líneas las 5 colonias seleccionadas, de manera que cada una cruce la línea de cristal violeta transversalmente. Para cerciorarse de la presencia del marcador *rfa*, se debe observar un halo de inhibición de crecimiento bacteriano en la periferia de la línea de cristal violeta.



- ∞ Sensibilidad a la luz UV: Con un aplicador de madera se siembra una línea recta de cada cultivo en una caja Petri con medio NB, se cubrió con papel aluminio una sección perpendicular a las líneas de cultivo y posteriormente la caja es irradiada con luz UV (longitud corta) a una distancia de 20 cm, durante 15 seg, el papel se va recorriendo cada 15 segundos, de tal forma que queden con 60, 45, 30, 15 y 0 segundos acumulados de irradiación. Para corroborar la presencia del marcador *uvrB*, debe haber inhibición de crecimiento en las secciones con mayor exposición a la luz UV.



- ∞ Frecuencias espontanea: Se colocaron 100 μ L de cultivo bacteriano en un tubo con 2 mL de agar de superficie, previamente suplementado con Histidina 1 Mm /Biotina 0.5 mM a 45 °C. Se homogenizó agitando suavemente y fue vertido en una caja de medio mínimo Vogel-Bonner. Se incubó a 37 °C durante 48 y se contaron las colonias revertantes.

Para realizar el ensayo de Ames, se seleccionó el cultivo que presentó las mejores respuestas en los marcadores.

5.6.2 Ensayo de Ames

Para realizar la prueba de mutagenicidad se colocó un cultivo de 10 mL de medio Nutrient Brot No.2 OXOID líquido adicionando ampicilina (25 μ g/mL) durante 16 h a 37 °C con agitación constante de 150 rpm.

En un tubo ependorff de 2 mL se agregaron 100 μ L de *Salmonella typhimurium*; los controles contenían 10 μ L de Quercetina (15 nmol) con y sin 500 μ L de S9 humano. Los tratamientos contenían 100 μ L de *Salmonella typhimurium* 10 μ L de 5-HF, 3-HF y flavona disueltos en DMSO, el primero a concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1 y 1 μ mol, mientras que la 3-HF y la flavona a 0.01, 0.1, 1 y 5 μ mol, los tres probados con y sin activación metabólica de S9 de hígado humano 500 μ L, en un volumen final de 1 mL con una mezcla de amortiguador de fosfato. La mezcla fue preincubada durante 20 minutos a 37 °C con agitación de 150 rpm. Una vez transcurrido el tiempo la mezcla fue vertida en tubos que contienen 2 mL de agar de superficie, se agitaron suavemente y se vertieron en cajas Petri con medio mínimo suplementadas con Histidina 0.1 mM/ Biotina 0.5 Mm, una vez que ha polimerizado el agar de superficie las cajas fueron

incubadas a 37 °C durante 48 h y transcurrido el tiempo las colonias fueron contadas de forma manual.

Cada caja Petri se observó a través del microscopio óptico para ver el crecimiento de fondo y verificar que los compuestos no tuvieran efecto toxico en *S. typhimurium*.

5.6.3 Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron por duplicado, cada uno contenía triplicado de cada tratamiento., se utilizó el programa estadístico GrapPhad Prism. Como prueba estadística de empleó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la como post hoc la prueba de Tuckey con una $p \leq 0.05$ para diferencias entre tratamientos. Los resultados se expresan como el promedio de dos experimentos independientes \pm desviación estándar (D.E).

6 Resultados

6.1 Efecto de distintos flavonoides sobre la actividad del CYP1A1 humano.

Los resultados de la actividad del CYP1A1 humano en presencia de los nueve flavonoides probados, muestran que estos compuestos ejercen inhibición de tipo dosis-dependiente sobre la actividad de la enzima. Particularmente la flavona, 3-hidroxiflavona y 5-hidroxiflavona muestran un alto potencial de inhibición respecto a los otros flavonoides, ejerciendo su acción a concentraciones menores a 10 μM , como se muestra en la figura 13.

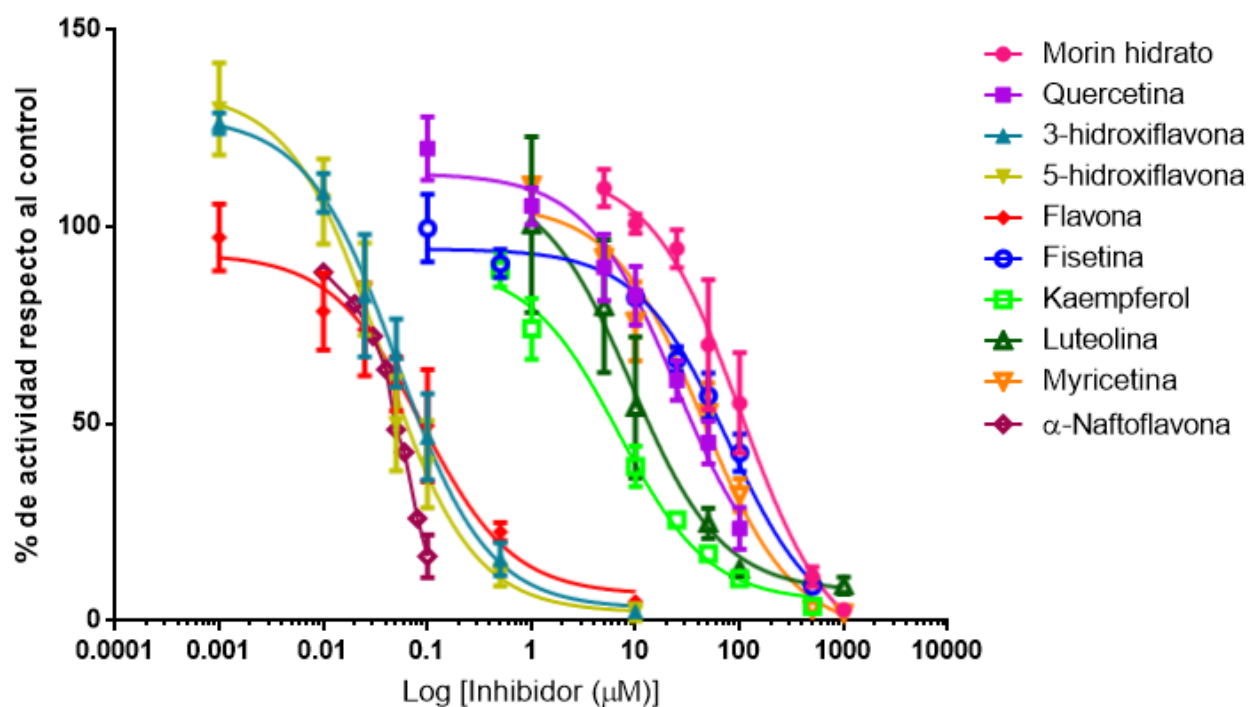
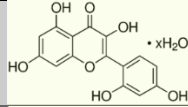
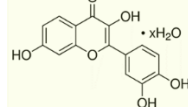
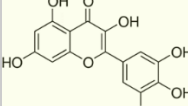
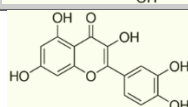
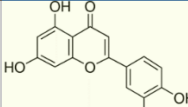
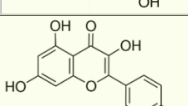
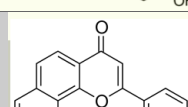
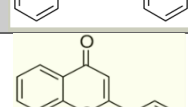
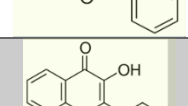
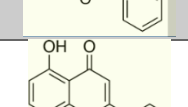


Figura 13. Efecto de la flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, quercetina, miricetina, luteolina, fisetina, kaempferol e hidrato de morina, sobre la actividad de CYP1A1 humano recombinante. Cada punto es el promedio de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

6.2 Concentración inhibitoria media (CI_{50}) de distintos flavonoides sobre CYP1A1 humano.

Se calculó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los flavonoides probados, para determinar cuáles compuestos presentan mayor potencial como inhibidores del CYP1A1 humano. Estos resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 Concentración inhibitoria media de nueve flavonoides sobre CYP1A1 humano.

Compuesto	Cl ₅₀ (μM) ± D.E.	Posición de OH	Estructura
Morin hidrato	102.50 ± 20.58	C ₃ , C ₅ , C ₇ , C _{2'} , C _{4'}	
Fisetina	76.95 ± 12.09	C ₃ , C ₇ , C _{3'} , C _{4'}	
Myricetina	43.56 ± 7.87	C ₃ , C ₅ , C ₇ , C _{3'} , C _{4'} , C _{5'}	
Quercetina	24.44 ± 6.06	C ₃ , C ₅ , C ₇ , C _{4'} , C _{5'}	
Luteolina	9.15 ± 3.18	C ₅ , C ₇ , C _{4'} , C _{5'}	
Kaempferol	6.90 ± 1.25	C ₃ , C ₅ , C ₇ , C _{4'}	
α-naftoflavona	0.29 ± 0.138	Anillo D	
Flavona	0.08 ± 0.021	-----	
3-hidroxi flavona	0.05 ± 0.007	C ₃	
5-hidroxi flavona	0.03 ± 0.005	C ₅	

*Los resultados de la α-naftoflavona se obtuvieron anteriormente en el laboratorio y se añaden únicamente con fines comparativos, en esta investigación solo se probaron los nueve flavonoides mencionados anteriormente.

La Cl₅₀ más baja se observa con 5-hidroxi flavona, seguida de 3-hidroxi flavona y flavona con concentraciones de 35, 51 y 88 nM respectivamente. Como se muestra en la tabla 1, estas son las moléculas probadas más pequeñas, dichos compuestos contienen solo uno o ningún grupo OH en su estructura. Por otro lado, los compuestos con mayor número de grupos OH resultaron ser menos efectivos como inhibidores del CYP1A1 humano.

Estos resultados indican que la estructura de los flavonoides influye en la potencia de inhibición del CYP1A1 humano, mostrando que a menor número de grupos OH, hay mayor potencia de inhibición.

6.3 Determinación del efecto de flavona, 3-HF y 5-HF sobre la actividad enzimática de CYP1A1 humano

Con el objetivo de determinar los parámetros cinéticos de V_{max} y K_m del CYP1A1 humano, se realizó un ajuste no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten de la velocidad de reacción inicial de la enzima, en función de la concentración de sustrato 7-etoxirresorufina (figura 14). Los valores cinéticos obtenidos fueron una V_{max} de 167.1 ± 5.2 pmol/min*mg proteína y una K_m de 0.59 ± 0.07 μ M.

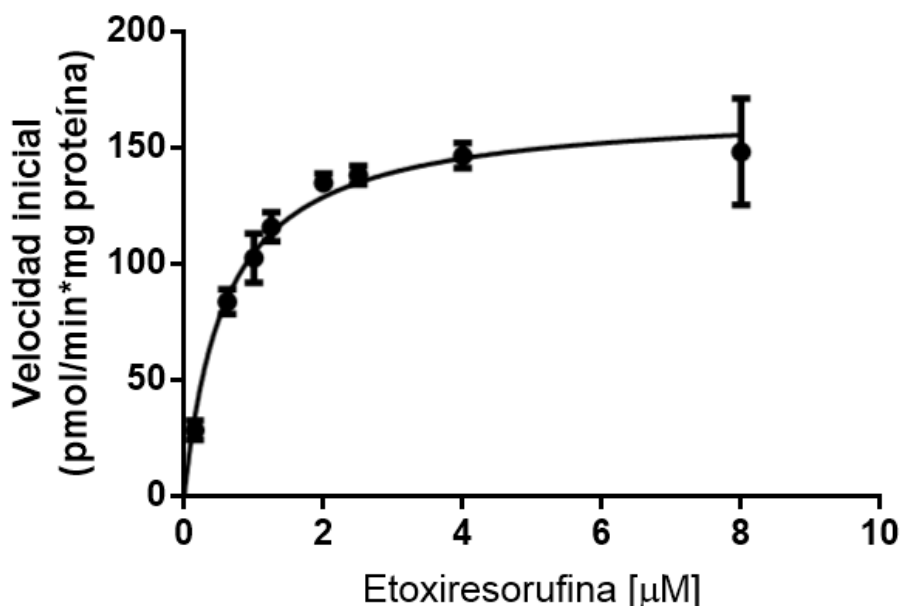


Figura 14. Gráfico de velocidad inicial de reacción del CYP1A1 humano vs concentración de etoxirresorufina. Se realizó un ajuste por regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten.

Con base en los resultados anteriores, se realizó la cinética enzimática en presencia de los compuestos con los que se obtuvieron las IC_{50} más bajas. En la figura 15 se representa el resultado de este ensayo que muestra el efecto inhibitorio sobre el CYP1A1 humano, de los tres flavonoides probados en distintas concentraciones: 45, 90 180 y 270 nM para 5-hidroxiavona, 30, 60 90 y 120 nM para la 3-HF y finalmente 40, 80, 160 y 240 nM para la flavona. Del mismo modo se realizó una regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten de los datos obtenidos para determinar los parámetros cinéticos de V_{max} , K_m y K_i para cada caso.

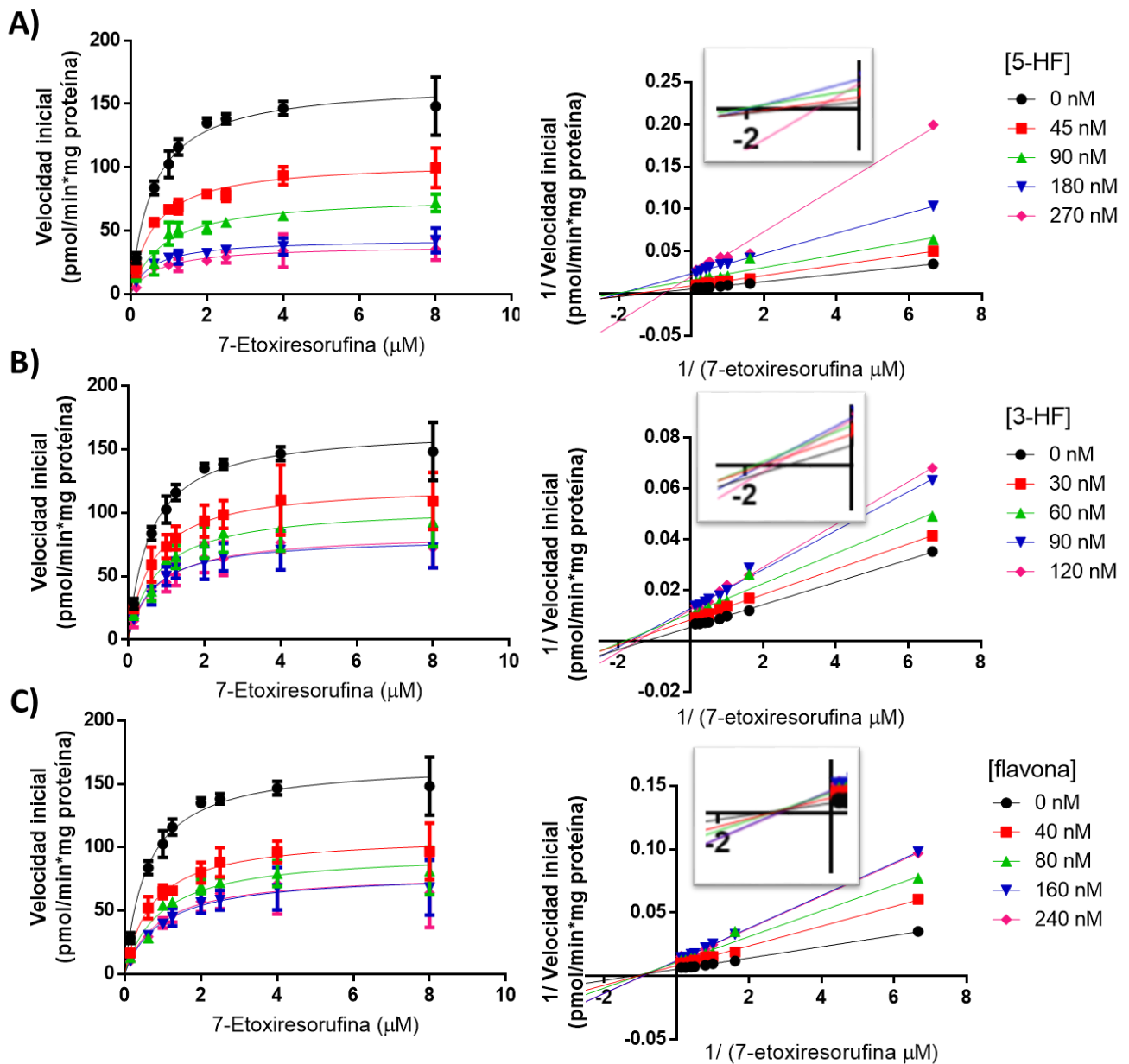
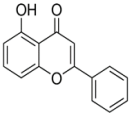
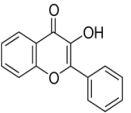
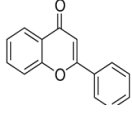


Figura 15. Izquierda: Gráficos de velocidad inicial de reacción del CYP1A1 en ausencia y presencia de los distintos inhibidores. Derecha: Gráficos de Lineweaver-Burk (dobles recíprocos), muestran la intersección de las rectas en los ejes del gráfico. A) Efecto inhibitorio de la 5-hidroxi flavona, B) Efecto inhibitorio de la 3-hidroxi flavona, C) Efecto inhibitorio de la flavona sobre la actividad del CYP1A1 humano.

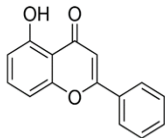
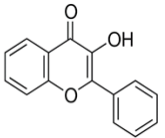
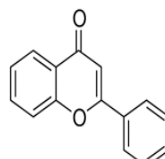
Del ajuste de datos a las ecuaciones de velocidad inicial comparando los diferentes tipos de inhibidor (competitivo, acompetitivo, no competitivo y mixto), se determinó el tipo de inhibición que presenta cada uno de los flavonoides probados que se muestra en las tablas 2 y 3 junto a los parámetros cinéticos determinados para cada compuesto.

Tabla 2. Ajuste global de los parámetros cinéticos de los tres flavonoides probados con el CYP1A1 humano.

Compuesto	CI 50 (μM)	Estructura	R ²	Km (μM)	Vmax (pmol/min* mg prot)	Ki (nM)	Tipo de inhibición	
Control		Control		0.59 ± 0.07	167.1 ± 5.20			
5-HF	0.051		Mejor ajuste	0.9696	0.618 ± 0.04	169.1 ± 3.21	69.48 ± 2.44	No Competitiva
3-HF	0.035		Mejor ajuste	0.9073	0.645 ± 0.05	168.1 ± 4.59	91.97 ± 5.52	No Competitiva
Flavona	0.088		Mejor ajuste	0.8711	0.711 ± 0.08	164.9 ± 5.85	121.5 ± 9.06	No Competitiva

En la figura 15 se presentan los gráficos de Lineweaver-Burke o dobles recíprocos, en donde el intersección de las líneas en el eje de las abscisas es igual a $-1/K_m$, mientras que la intersección de las líneas en el eje de las ordenadas es igual a $1/V_{max}$. La intersección de las líneas entre sí, en el eje de la ordenada indica una inhibición de tipo no competitiva, donde el valor de la V_{max} disminuye, mientras que la K_m es constante, es decir que estos flavonoides no afectan la afinidad de la enzima por el sustrato, mientras que la velocidad máxima de reacción se ve disminuida.

Tabla 3. Ajuste individual de los parámetros cinéticos de los tres flavonoides provados con el CYP1A1 humano.

Compuesto	Cl ₅₀ (μM)	Estructura	Tipo de inhibición	R ²	Ki	Conc. Inhib. (nM)	Vmax (pmol/min* mg prot)	Km (nM)
Control							167.1 ± 5.20	0.59 ± 0.07
5-HF	0.051		No Competitiva	0.969	69.48 ± 2.44	45	104.4 ± 3.76	0.60 ± 0.08
						90	77.44 ± 4.44	0.84 ± 0.16
						180	43.31 ± 2.33	0.56 ± 0.12
						270 *	38.42 ± 3.28	0.70 ± 0.21
3-HF	0.035		No Competitivo	0.907	91.97 ± 5.52	30	122.4 ± 7.54	0.63 ± 0.14
						90	105.3 ± 7.05	0.77 ± 0.18
						60	80.74 ± 5.41	0.64 ± 0.16
						120 *	83.92 ± 5.50	0.73 ± 0.17
Flavona	0.088		No Competitivo	0.871	121.5 ± 9.06	40	109.5 ± 5.63	0.71 ± 0.13
						80	95.96 ± 5.59	0.92 ± 0.17
						160	79.90 ± 6.47	0.96 ± 0.24
						240*	79.65 ± 8.34	0.88 ± 0.30

6.4 Evaluación *in silico* de las interacciones de α-naftoflavona con el CYP1A1 humano

Para determinar que el acoplamiento molecular se llevara a cabo del mismo modo que en el modelo cristalizado, se realizó el control utilizando como sustrato α-naftoflavona (α-NF), molécula con la cual el CYP1A1 humano fue co-cristalizada originalmente. Resultado de esto encontramos que α-NF se une en el mismo sitio que en la enzima cristalizada, así como en la misma posición, lo que indica que el modelo y el programa funciona correctamente. El anillo B de la α-NF se encontró orientado hacia el Fe del grupo hemo, a una distancia de 4.8 Å como lo muestra la línea amarilla punteada de la ilustración 15, mientras que el anillo A está formando un enlace de tipo π-π con el anillo de la Phe 224 (en verde) de la hélice F, tal como lo reportan Walsh y colaboradores [78].

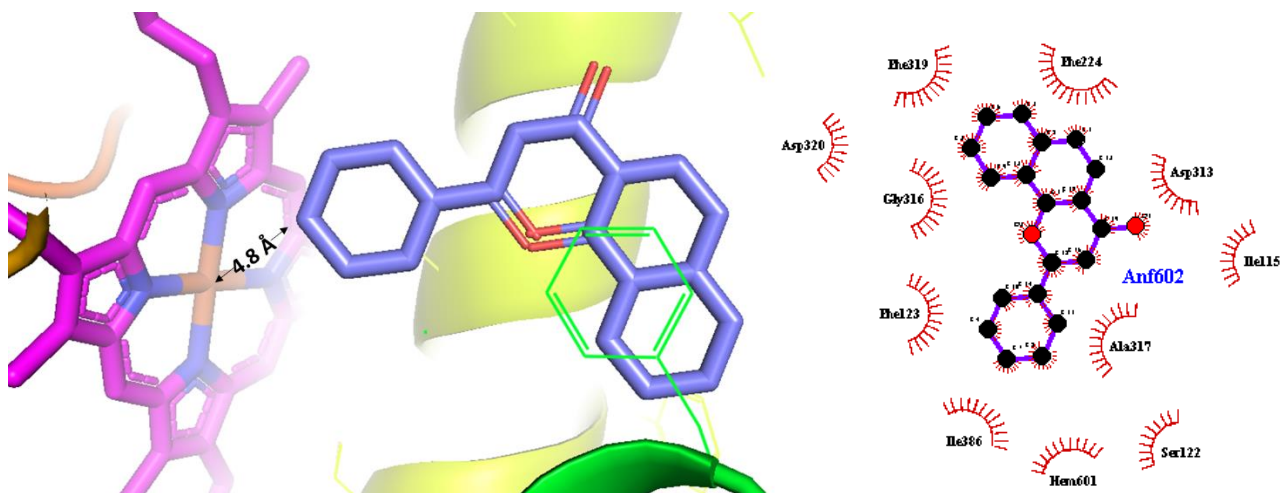


Figura 16. Modelo de interacción del α -NF en la cavidad del sitio activo del CYP1A1 humano, a la izquierda se muestra la representación molecular obtenida a través del programa PyMol (Schrödinger, LLC), en magenta el grupo hemo, en azul metálico el α -NF.

Como lo muestra el panel izquierdo de la ilustración, todos los residuos de aminoácidos con los cuales interacciona el α -NF son no polares, por lo tanto, refleja un carácter hidrofóbico en la cavidad del sitio activo de la enzima.

La energía de unión obtenida de este acoplamiento es de -15.4 kcal/mol lo cual indica una interacción ligando-enzima favorable.

6.5 Evaluación *in silico* de las interacciones entre 5-HF, 3-HF, flavona y otros ligandos con el CYP1A1 humano

Se llevó a cabo el acoplamiento molecular de la 7-etoxiresorufina con el CYP1A1 humano para verificar que el sustrato se uniera al sitio activo en el modelo, e identificar las interacciones con los residuos de aminoácidos circundantes. El resultado de este acoplamiento muestra una unión energéticamente favorable para la interacción de esta molécula en el sitio activo de la enzima de -10.5 kcal/mol, hecho fundamental para que la reacción de catálisis a resorufina se lleve a cabo. Del mismo modo, se observa que las interacciones en su mayoría son con residuos de aminoácidos de cadena lateral no polar, en su mayoría fenilalaninas (Ilustración 16). Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado por Santes-Palacios en 2015 [79].

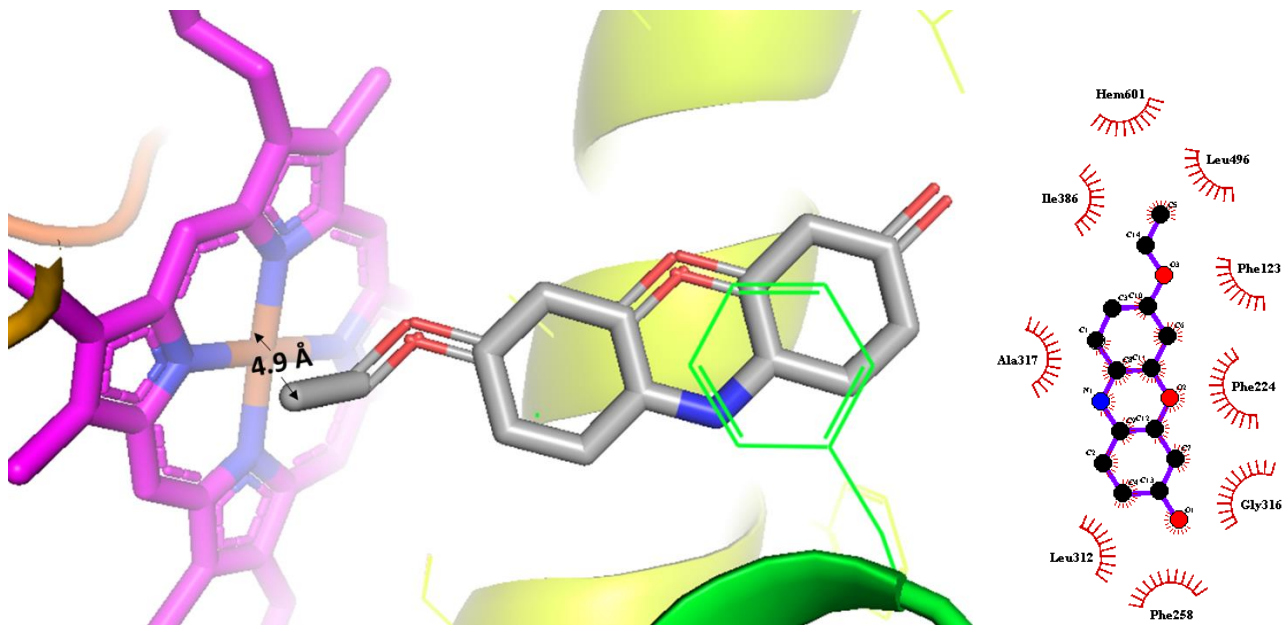


Figura 17. Modelo de interacción del 7-etoxiresorufina en la cavidad del sitio activo del CYP1A1 humano, a la izquierda se muestra la representación molecular obtenida a través del programa PyMol (Schrödinger, LLC), en magenta el grupo hemo, en plateado la 7-etoxiresorufina.

Posteriormente se realizó el mismo procedimiento para 5-HF, 3-HF y flavona, así como para B[a]p, ya que este último es un ligando del CYP1A1 humano interesante para comparar, debido a sus efectos biológicos. El resultado de estas pruebas de acoplamiento es que los flavonoides se unen tanto al sitio activo como a otras regiones de la enzima, siendo la zona del sitio activo la que presenta mayor energía de unión en todos los casos.

El arreglo espacial de 5-HF, 3-HF y flavona que se obtuvo con el acoplamiento molecular en el sitio activo, es muy similar al que se observa con el ligando con que se co-cristalizó (α -NF). La porción rotatable de estas moléculas se encuentra interaccionando con el grupo hemo de la enzima a una distancia entre 4.8 y 5 Å, mientras que las zonas más voluminosas se encuentran en la parte distal, como se muestran en la figura 18.1. La energía de unión es muy similar entre la 5-HF, 3-HF y flavona, siendo de -12.4, -12.5 y -12.2 kcal/mol respectivamente.

En la figura 18.1 y 18.2 se muestra la imagen de los modelos que tuvieron la energía de unión más baja, lo que indica el mejor acomodo espacial.

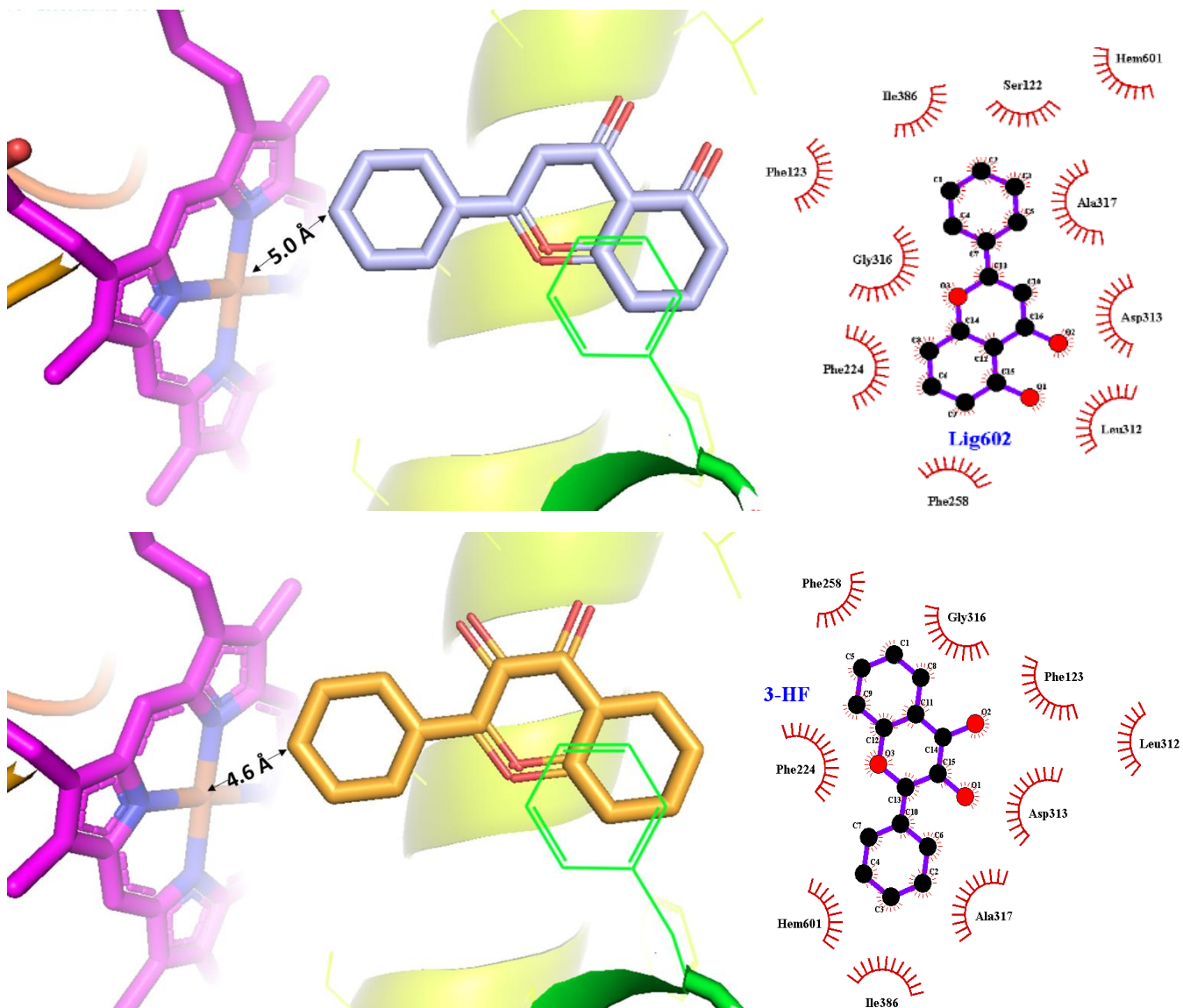


Figura 18.1 Modelos de interacción del 5-HF (superior) y 3-HF (inferior) en la cavidad del sitio activo del CYP1A1 humano, a la izquierda se muestra la representación molecular obtenida a través del programa PyMol, en magenta el grupo hemo, en azul claro la 5-HF y en naranja la 3-HF, la línea punteada amarilla representa la distancia entre el Fe del hemo y la porción rotable de los flavonoides, en verde se observa el anillo de la fenilalanina (Phe 224).

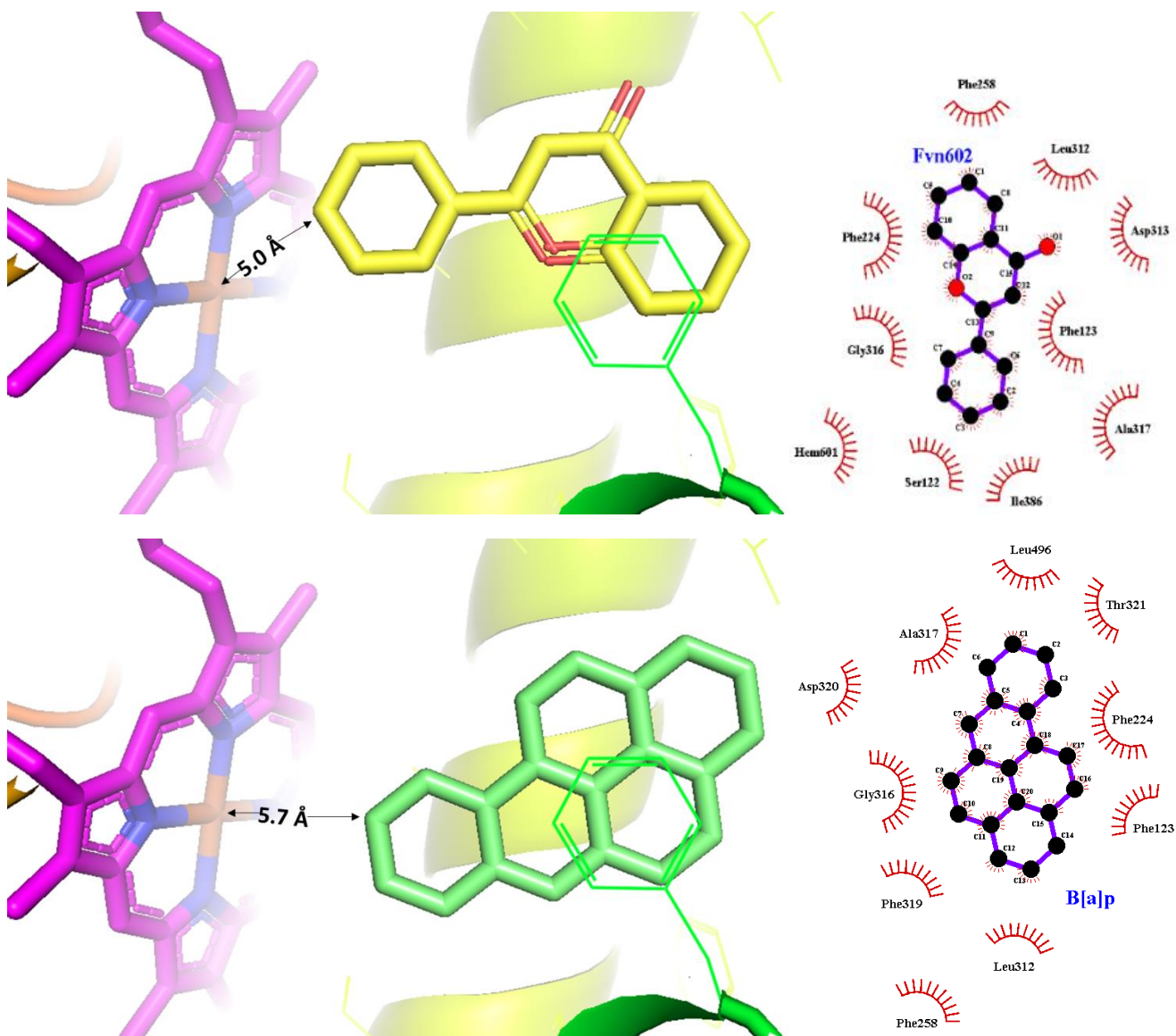


Figura 18.2 continuación Modelos de interacción del Flavona (superior) y B[a]p (inferior) en la cavidad del sitio activo del CYP1A1 humano, a la izquierda se muestra la representación molecular obtenida a través del programa PyMol, en magenta el grupo hemo, en amarillo la Flavona y en verde el B[a]p, la línea punteada amarilla representa la distancia entre el Fe del hemo y la porción rotable de los flavonoides, en verde se observa el anillo de la fenilalanina (Phe 224).

Por otro lado, aunque el B[a]p se une de manera similar a los compuestos anteriores, entre el Fe del hemo y el anillo de éste existe mayor distancia que con los otros compuestos, siendo ésta de 5.7 Å. También se observa que interactúa con mayor número de residuos que los flavonoides, lo cual explica que tenga una energía de unión más favorable de -15.3 kcal/mol, resultando un ligando potente para el CYP1A1 humano.

En la Tabla 4 se muestran los resultados arrojados por el programa Autodock Vina [77]. El modelo de 5-hidroxi flavona fue el que presentó menos modos de unión, no así la flavona que muestra siete modos de unión. A pesar de ello, las energías de unión no tienen una variación.

Tabla 4. Datos de acoplamiento molecular de 5-HF, 3-HF y flavona con el CYP1A1 humano.

Resultados de Docking Molecular									
Modo de unión	5-HF			3- HF			Flavona		
	Afinidad (kcal/mol)	Distancia del mejor modelo		Afinidad (kcal/mol)	Distancia del mejor modelo		Afinidad (kcal/mol)	Distancia del mejor modelo	
		Rmsd l.b	Rmsd u.b		Rmsd l.b	Rmsd u.b		Rmsd l.b	Rmsd u.b
1	-12.4	0.000	0.000	-12.5	0.000	0.000	-12.2	0.000	0.000
2	-11.4	1.738	2.616	-12.4	1.013	5.432	-12.2	1.633	6.289
3				-12.3	1.336	6.041	-12.2	1.347	5.615
4				-12.0	1.861	3.469	-11.9	1.486	3.020
5				-11.7	1.410	5.246	-11.8	1.816	3.235
6							-11.4	1.480	5.892
7							-11.1	2.049	3.656

Rmsd l.b: Desviación media cuadratica en relación con el enlace superior

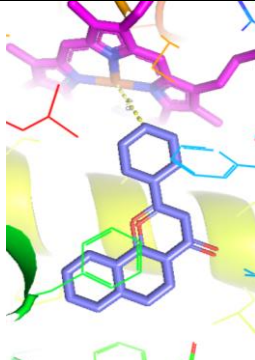
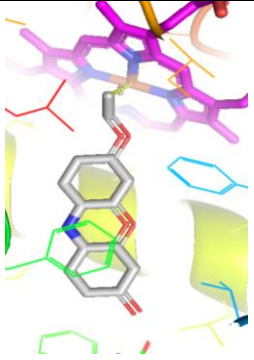
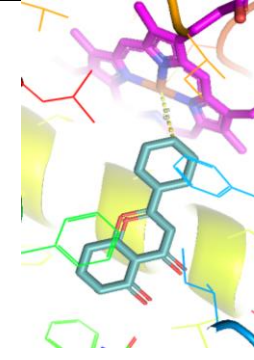
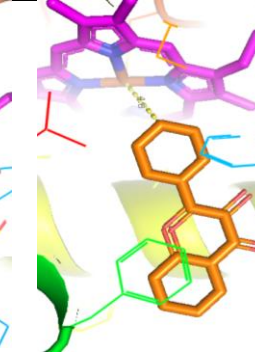
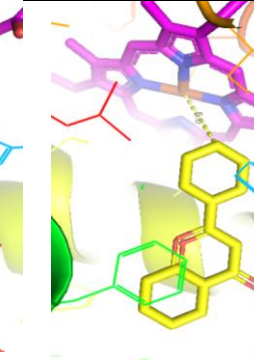
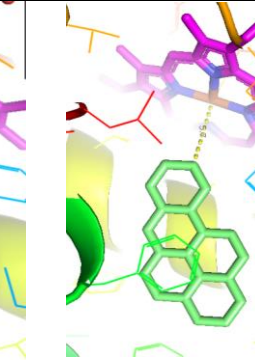
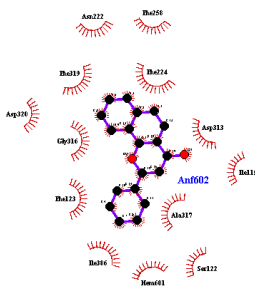
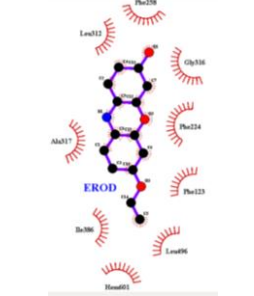
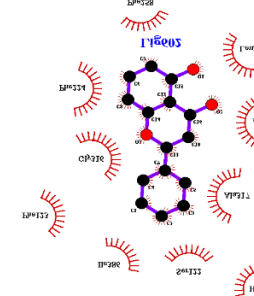
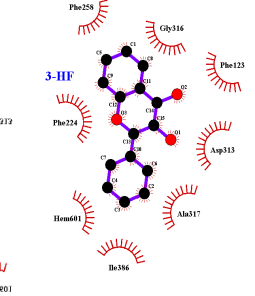
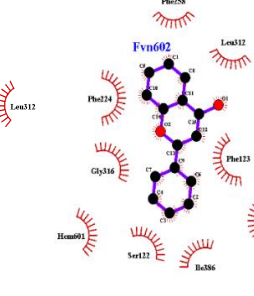
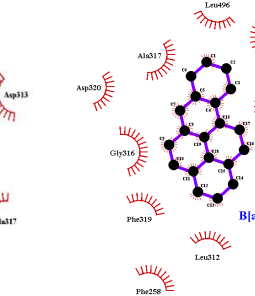
Rmsd u.b: Desviación media cuadratica en relación con el enlace inferior

Al analizar las energías de unión de todos los compuestos, se puede observar la α -NF y el B[a]p son los ligandos que presentan la energía de unión más negativa, es decir, la más favorable. Aunado a esto, cabe destacar que éstas son las moléculas que poseen mayor número de interacciones con los aminoácidos del sitio; por el contrario, la 7-etoxiresorufina es el ligando que presentó menor número de interacciones, así como la energía de unión menos favorable. Los flavonoides probados poseen una energía de unión muy similar entre ellos.

Al comparar el número de residuos que interaccionan con los ligandos, podemos encontrar que algunos de ellos son recurrentes, se observa que hay al menos siete residuos en común que comparten interacción con todas las moléculas: Phe258, Gly316, Phe224, Ile386, Ala317, Asp313 y Phe123. Esto sugiere que deben ser importantes para el reconocimiento molecular del ligando. Los flavonoides probados comparten al menos siete de los ocho residuos con los que interaccionan

En la Tabla 5 se presentan los resultados de los acoplamientos moleculares mencionados de modo comparativo.

Tabla 5. Comparación del acoplamiento molecular para los tres flavonoides con la inhibición más potente y algunos ligandos del CYP1A1 humano.

Compuesto	α -Naftoflavona	7-Etoxirresorufina	5-Hidroxiflavona	3-Hidroxiflavona	Flavona	Benzo[a]pireno	
Modelo de acoplamiento molecular							
Modelo de interacción con residuos de aminoácidos de CYP1A1 humano							
Energía de unión estimada (kcal/mol)	-15.4	-10.5	-12.4	-12.5	-12.2	-15.3	
Residuos de aminoácidos que interaccionan	Ile115, Ser122, Asp320, Phe319, Asn222, Phe123, Phe258 , Phe224 , Asp313 , Ala317 , Ile386 , Gly316	Phe123, Leu496, Leu312, Ile386 , Phe258 , Gly316 , Phe224 , Ala317	Ser122, Leu312, Ala317 , Asp313 , Phe224 , Gly316 , Phe123 , Ile386 , Phe258	Phe258, Leu312, Phe123 , Ala317 , Phe224	Phe258, Leu312, Phe123 , Ala317 , Phe224	Leu312, Ser122, Phe258 , Phe123 , Ile386 , Gly316 , Asp313	Leu496, Thr321, Leu321, Phe319, Asp320, Phe224 , Phe123 , Phe258 , Gly316 , Ala317

Por otro lado, con base en los resultados de la cinética enzimática, tomando en cuenta que el modelo de inhibición preferido es de tipo no competitivo, también se realizó el acoplamiento molecular empleando la molécula del CYP1A1 humano acoplada al ligando α -NF para identificar otros sitios a los que se pudieran unir los flavonoides.

El resultado de este acoplamiento es que todos los flavonoides se unen preferentemente al mismo sitio periférico de la enzima con orientaciones muy similares entre las cadenas A y K. De nueva cuenta la mayoría de los aminoácidos con los que interactúan son no polares contando principalmente con glicinas, tal como lo muestra la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación del acoplamiento molecular para los tres flavonoides más potentes con el CYP1A1 humano unido al ligando α -NF.

Compuesto	5-Hidroxi flavona	3-Hidroxi flavona	Flavona
Modelo de acoplamiento molecular			
Modelo de interacción con residuos de aminoácidos de CYP1A1 humano			
Energía de unión estimada (kcal/mol)	-7.2	-7.3	-7.1
Residuos de aminoácidos que interaccionan	Asp 417, Gln 413, Gln 68, Ser 64, Trp 412, Leu 61, Arg65, Gln 418	Leu 61, His 416, Asp 417, Gln 68, Gln 418, Ser 64, Arg 65, Trp 412	Arg 65, Leu 61, Trp 412, Gln 68, Ser 64, Gln 413, Gln 418, Asp 417

Un resultado interesante de este acoplamiento es que el modelo de la 5-HF muestra que se da la formación de un puente de hidrógeno de 3.3 Å entre el grupo OH del flavonoide y la Gln418 de la cadena K, evento que no ocurre en los modelos con los otros dos compuestos. Este resultado podría ser la explicación de que en los ensayos de cinética enzimática la 5-HF sea el compuesto con mayor potencia de inhibición para el CYP1A1 humano, en reacción con los otros dos probados que no muestran interacciones de este tipo.

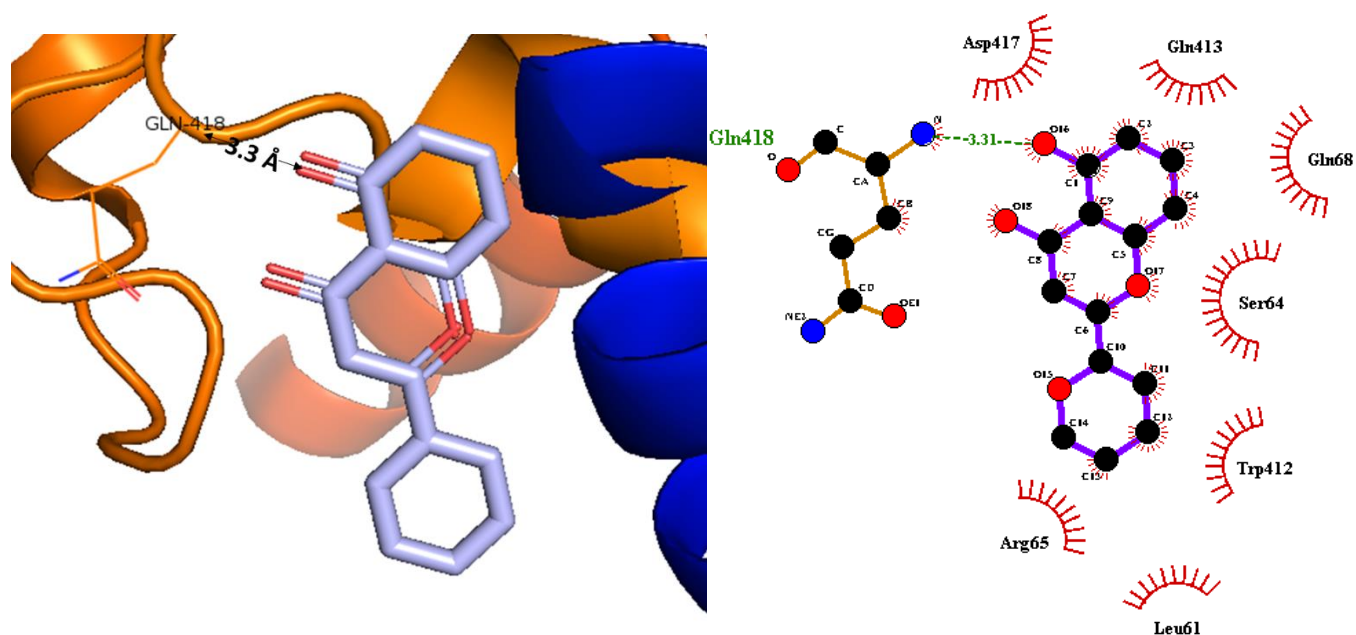


Figura 19. Modelo de interacción de la 5-HF (azul) con el CYP1A1 humano, en el panel derecho se muestra la representación molecular obtenida a través del programa PyMol (Schrödinger, LLC), donde en color naranja se representa la hélice K y en azul fuerte la hélice A, la línea punteada representa el puente de hidrógeno entre el sustituyente OH de la 5-HF y la Gln 418. En el panel izquierdo se muestran las interacciones obtenidas a través del programa LigPlot (EMBL-EBI), donde se muestra de manera clara el puente de hidrógeno, así como los residuos con los que está interactuando este flavonoide.

En la tabla 5 se muestra los resultados de este segundo acoplamiento arrojados por el programa Autodock Vina [77]. Los compuestos presentan más formas de unión que en el modelo anterior, aunque las energías de unión son más bajas, incluso en la 5-HF que presenta un puente de hidrógeno. Esto podría deberse a que interactúan en una zona superficial de la proteína y no en una cavidad como lo es el sitio activo. Los resultados arrojados por el programa LigPlot (EMBL-EBI) muestran que los compuestos interactúan con menor número de residuos que en el sitio activo.

Tabla 7. Datos de acoplamiento molecular de 5-HF, 3-HF y flavona con el CYP1A1 unido al α -NF.

Resultados de Docking Molecular									
Modo de unión	5-HF			3- HF			Flavona		
	Afinidad (kcal/mol)	Distancia del mejor modelo		Afinidad (kcal/mol)	Distancia del mejor modelo		Afinidad (kcal/mol)	Distancia del mejor modelo	
		Rmsd l.b	Rmsd u.b		Rmsd l.b	Rmsd u.b		Rmsd l.b	Rmsd u.b
1	-7.2	0.000	0.000	-7.3	0.000	0.000	-7.1	0.000	0.000
2	-7.1	46.938	48.114	-7.3	1.103	5.432	-7.0	46.996	48.166
3	-7.0	47.412	49.243	-7.1	46.930	48.165	-7.0	46.889	48.086
4	-6.9	1.298	2.532	-7.0	47.051	48.192	-7.0	2.898	4.553
5	-6.9	1.467	6.168	-6.9	32.397	33.193	-6.9	46.967	48.066
6	-6.7	32.766	34.662	-6.9	46.718	47.873	-6.8	1.755	5.735
7	-6.7	34.071	36.122	-6.7	17.520	19.022	-6.7	32.439	33.280
8	-6.7	31.888	33.840	-6.6	29.963	30.824	-6.5	47.177	48.266
9	-6.6	30.964	32.642	-6.5	17.447	19.610	-6.5	26.030	28.480

Rmsd l.b: Desviación media cuadratica en relación con el enlace superior

Rmsd u.b: Desviación media cuadratica en relación con el enlace inferior

6.6 Efecto del S9 humano en la cepa TA98 y como activador metabólico de la QT.

Para poder utilizar el S9 humano como activador metabólico, primero se probó si esta mezcla ejercía algún efecto mutagénico por si sola en la cepa TA98 de *S. typhimurium*. Los resultados indicaron que, aunque se ve un ligero aumento en el número de colonias revertantes utilizando S9 humano, no existen diferencias significativas. Según el Sistema de Monitoreo Ambiental (EPA por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, para determinar que un compuesto está actuando como agente mutagénico, éste debe aumentar al menos al doble el número de revertantes que el control [80].

Para verificar que el S9 humano funcionara como sistema metabólico efectivo para activar compuestos promutagénicos, se incubó con quercetina (QT): flavonoide conocido por sus propiedades mutagénicas en *S. typhimurium* al ser coincubado con un sistema metabólico como el S9 de rata.

Los resultados indicaron que al coincubar QT (15 nmol) con mezcla S9 humano aumentan el número de colonias revertantes de manera significativa, en comparación con los tratamientos

sólo con QT o solo con S9 humano, los cuales no tuvieron diferencias significativas respecto al cultivo de *S. typhimurium* sola; mostrando que el S9 humano funciona correctamente como un activador metabólico de compuestos promutagénicos.

Por otro lado, al coincubar QT con mezcla S9 de rata el número de revertantes también aumentó significativamente, incluso con mayor número de revertantes que el cultivo de QT con S9 humano. La razón de este comportamiento puede deberse a que el S9 de rata utilizado, es un homogenado de animales tratados con compuestos como Aroclor 1252 y β -naftoflavona, que sobreexpresan a los CYP, mientras que el S9 humano es obtenido de donantes con una expresión basal de las diferentes isoformas expresadas en este órgano.

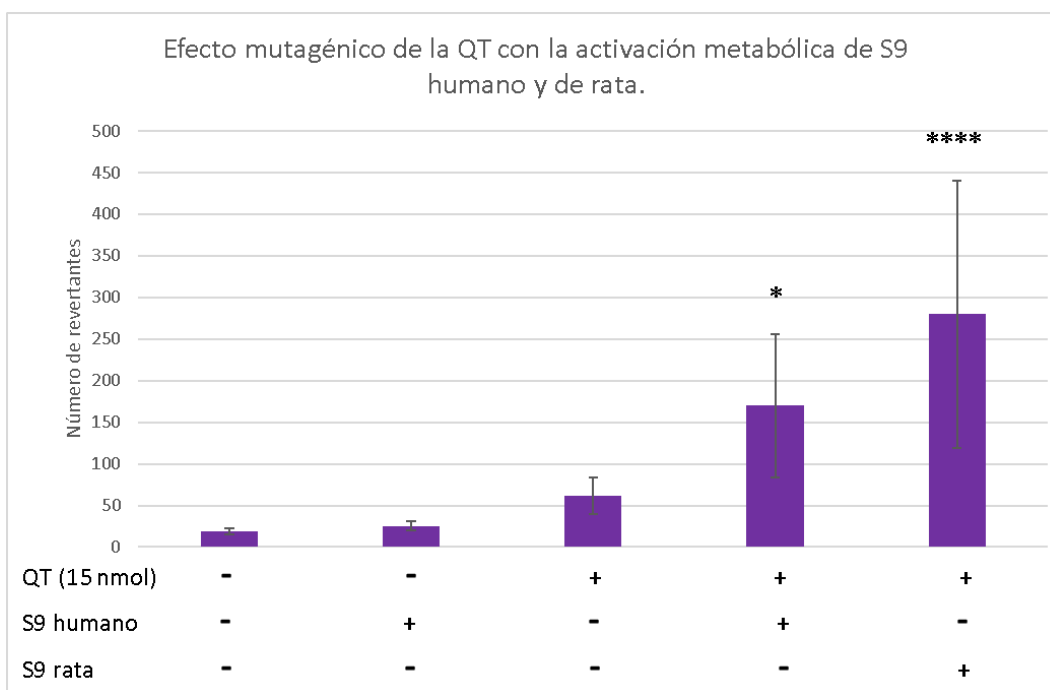


Figura 20. Efecto mutagénico de la QT sin activación metabólica y con activación de S9 de rata y S9 humano, probado en la cepa TA98 de *S. typhimurium*. Cada barra del gráfico es el resultado del promedio de colonias revertantes de His⁺ de seis experimentos independientes \pm la desviación estándar. * y **** indican diferencias significativas con el control sin QT, S9 humano ni S9 de rata, con una $p \leq 0.05$.

6.7 Resultados de evaluación de la mutagenicidad de 5-HF, 3-HF y Flavona con y sin activación metabólica de S9 humano a través del ensayo de Ames

Una vez probado que la mezcla S9 de humano funcionaba como activador metabólico, se realizaron ensayos con 5-HF, 3-HF y flavona, para evaluar si estos compuestos son posibles promutagénos que se puedan activar con enzimas del metabolismo humano.

La 5-HF se probó en concentraciones de 1, 0.1, 0.01 y 0.001 nmol/placa, con y sin activación metabólica de S9 humano. Los resultados indican que este compuesto no ejerce mutagenicidad dosis-dependiente en ninguno de los dos casos. Se observa un comportamiento lineal en los dos tratamientos (Ilustración 21). Las cajas de cultivo fueron observadas al microscopio óptico para verificar que hubiera crecimiento de fondo; lo cual indica que no hay toxicidad por parte de los compuestos.

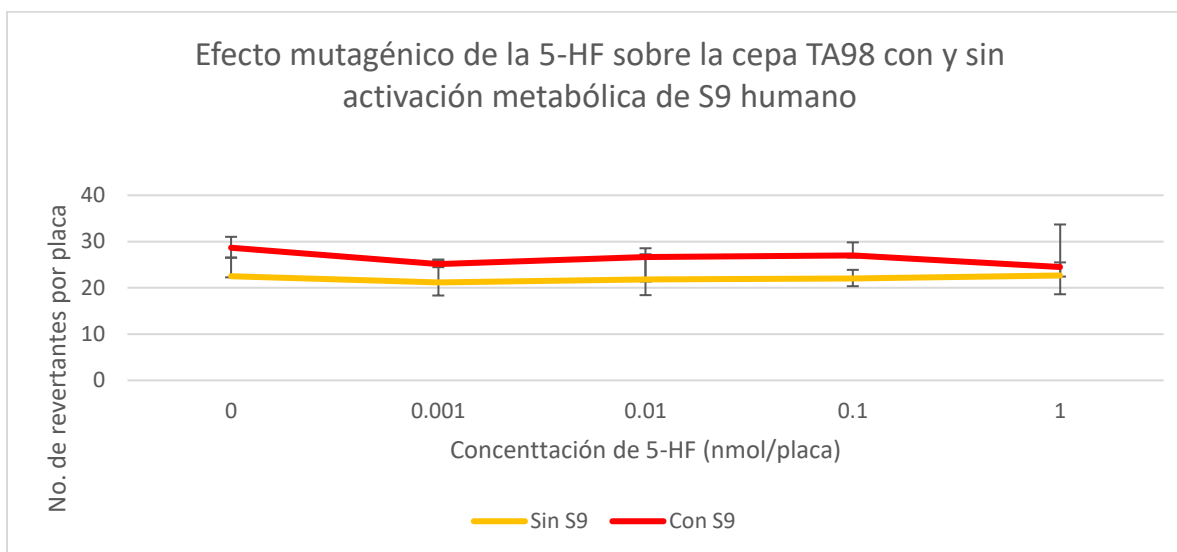


Figura 21. Efecto mutagénico de la 5-hidroxi flavona sobre la cepa TA98 de *S. typhimurium* con activación metabólica de S9 humano (línea roja) y sin activación (línea amarilla) en la prueba de Ames. Cada punto en el gráfico es el resultado del promedio de colonias revertantes de His⁺ de dos experimentos independientes por triplicado \pm la desviación estándar. *Diferencias significativas con el control (0 nmol de 5-HF) con una $p \leq 0.05$.

La 3-HF se probó en las concentraciones de 0.01, 0.10, 1.0 Y 1 nmol/placa. De igual manera, ninguna de ellas tuvo efecto mutagénico con la cepa TA98 de *S. typhimurium* en ambos tratamientos, es decir, con y sin activación metabólica de S9 humano (Ilustración 22). Del mismo modo que la 5-HF, en las cajas de cultivo vistas al microscopio óptico no se observa efecto tóxico en la cepa.

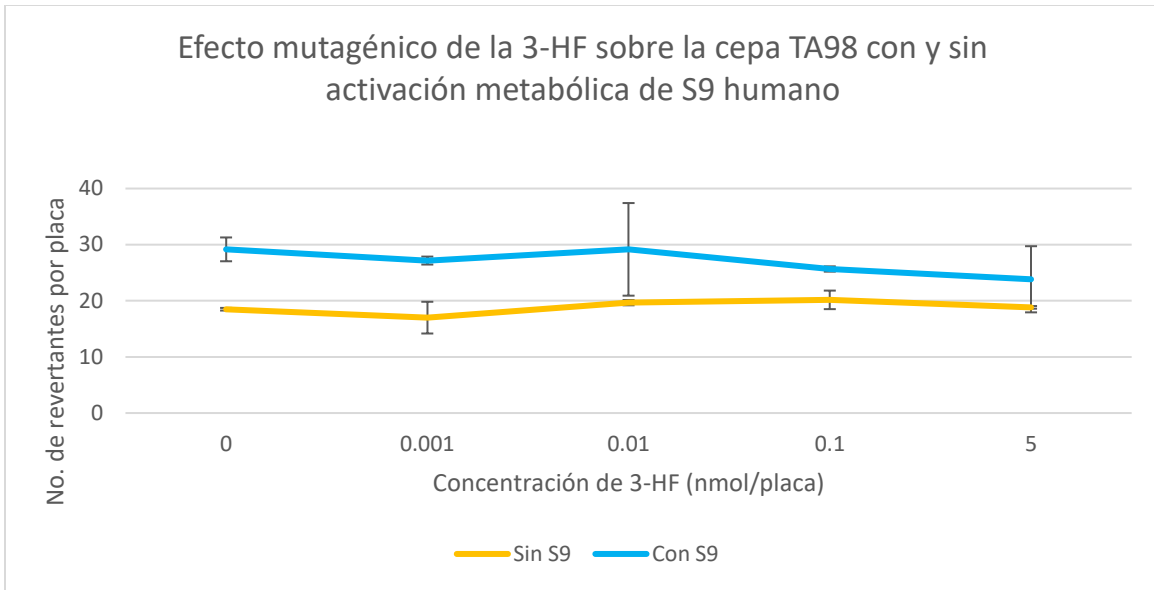


Figura 22. Efecto mutagénico de la 3-hidroxi flavona sobre la cepa TA98 de *S. typhimurium* con activación metabólica de S9 humano (línea azul) y sin activación (línea amarilla). Cada punto en el gráfico es el resultado del promedio de colonias revertantes de His⁺ de dos experimentos independientes por triplicado ± la desviación estándar. *Diferencias significativas con el control (0 nmol de 5-HF) con una $p \leq 0.05$.

Finalmente, se realizó la prueba de mutagénesis con la flavona en las concentraciones de 0.01, 0.10, 1.0 Y 1 nmol/placa, no existiendo diferencias significativas entre el control y los tratamientos, así como tampoco las hay entre los cultivos con S9 humano y sin éste. Del mismo modo que los dos ensayos anteriores, en las cajas de cultivo vistas al microscopio óptico, no mostraron efecto tóxico en la cepa.

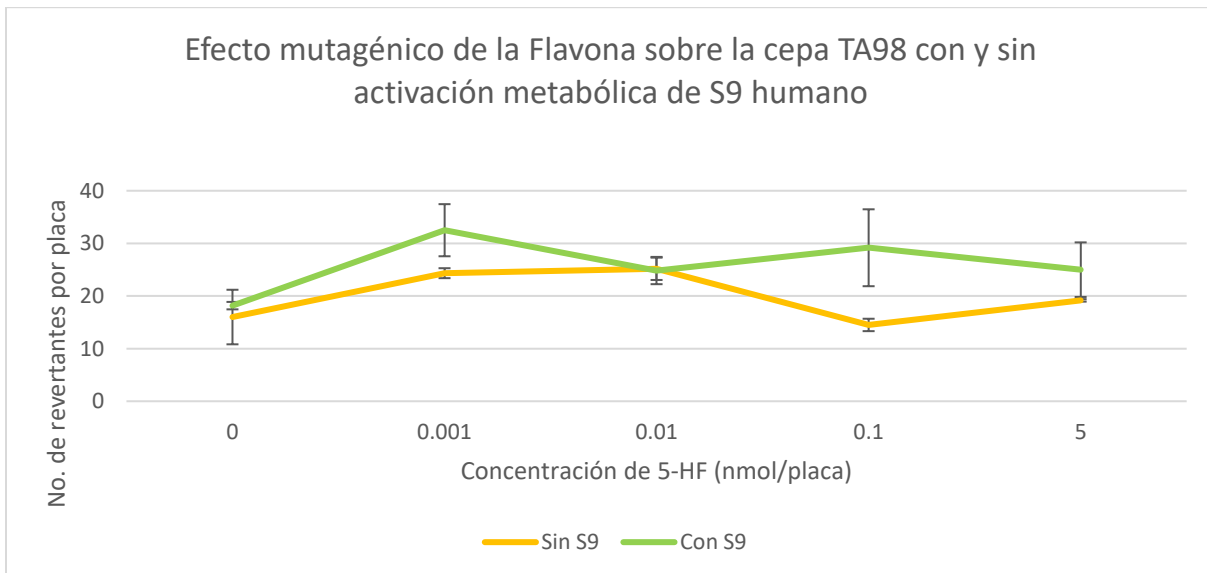


Figura 23. Efecto mutagénico de la flavona sobre la cepa TA98 de *S. typhimurium* con activación metabólica de S9 humano (línea anaranjada) y sin activación (línea amarilla). Cada punto en el gráfico es el resultado del promedio de colonias revertantes de His⁺ de dos experimentos independientes por triplicado ± la desviación estándar. *Diferencias significativas con el control (0 nmol de 5-HF) con una $p \leq 0.05$.

7. Discusión

Se presume que los flavonoides consumidos en la dieta, poseen diversos atributos de interés biológico y farmacológico, entre ellos el potencial antioxidante, el efecto que tienen sobre señales de transducción y el efecto inhibitor o potenciador de actividad de algunas enzimas [41,53]. Estas características han sido ampliamente estudiadas ya que juegan un papel significativo en el efecto quimioprotector de estos compuestos contra el cáncer.

Se ha evaluado el efecto de algunos flavonoides como potenciales inhibidores de enzimas involucradas en el proceso de carcinogénesis como el CYP1A1 debido a su semejanza con la estructura de algunos de sus ligandos (HAP y aminas aromáticas, encontrados en emisiones de combustibles fosiles, alimentos carbonizados y humo de tabaco, entre otros productos) [24]; la gran mayoría de estos ensayos se han realizado con enzimas provenientes de rata [45 – 47]. Sin embargo, existen diferencias importantes en las estructuras y la afinidad de los ligandos entre las isoformas de rata y humano. Estas enzimas difieren en un 21% en su secuencia de aminoácidos, incluyendo el sitio activo de la enzima; diferencia que puede resultar un factor importante al momento de interpolar a humanos los resultados obtenidos en modelos animales. En la figura 25 del Apéndice I, se muestran las diferencias entre las isoformas del CYP1A1 humano y de rata. [79], [81].

En este trabajo se probaron nueve flavonoides con diferente número y posición de grupos OH en su estructura, para determinar cuáles de ellos eran inhibidores potentes del CYP1A1 humano involucrado en el metabolismo de compuestos xenobióticos procarcinogénicos, y establecer si existe una relación entre la potencia de inhibición y la estructura de estos polifenoles. Esto se realizó bajo la hipótesis de que a menor número de grupos OH, habría mayor afinidad por la enzima, basándose en que la α -naftoflavona, un derivado sintético de flavonoides naturales, es un potente inhibidor del CYP1A1, aunque se ha demostrado que éste compuesto posee efectos adversos como el aumento en el intercambio de comátidas hermanas en linfocitos, y causar aberraciones cromosómicas en células de ovario de ratón [56,57].

En los ensayos *in vitro*, utilizando fracción membranal de *Escherichia. coli* que sobreexpresa al CYP1A1 humano, se determinó que las IC_{50} de mayor potencia las presentaron aquellos flavonoides que tienen menor número de sustituyentes OH; destacando la 5-HF, 3-HF y flavona. Los dos primeros poseen únicamente un grupo OH en la posición 5 y 3 respectivamente, mientras que el último carece de cualquier grupo. Las potencias de inhibición que estos compuestos presentaron fueron de $0.03 \pm 0.005 \mu\text{M}$ para la 5-HF, $0.05 \pm 0.007 \mu\text{M}$ para la 3-HF y $0.08 \pm 0.021 \mu\text{M}$ para la flavona (Tabla 1). Ensayos reportados en microsomas de linfoblastoides B que expresan al CYP1A1 humano indican concentraciones de 3-HF, 5-HF y flavona en el mismo orden de magnitud de para determinar la IC_{50} de la actividad MROD en esta enzima [50].

Dado que los compuestos que presentaron la inhibición más potente, son de origen natural y se encuentran en plantas como la *prímula sp*, y *dionisya sp*, para el caso de la 5-HF [82], [83], así como las *artemisia* y *blumea* para la flavona [84], [85], se procedió a realizar la caracterización bioquímica del tipo de inhibición que estos compuestos ejercen sobre el CYP1A1 humano. Se determinó que la enzima de humano CYP1A1 recombinante expresada en la fracción membranal de *E. coli*, presenta una cinética de tipo michaeliana con los siguientes parámetros: V_{max} de 167.1 ± 5.2 pmol/min*mg proteína y una K_m de 0.59 ± 0.07 μ M. Estos resultados concuerdan con los reportados por Guo *et. al.* [74]. Al comparar estos parámetros con los obtenidos por Santes-Palacios en 2015, se observa una V_{max} de 92 ± 1 pmol/min*mg proteína y una K_m de 0.13 ± 0.001 μ M obtenidos a partir de supersomas de células de insectos infectados con baculovirus [79], encontramos que los parámetros obtenidos en el presente trabajo se encuentran en el mismo orden de magnitud que los determinados por Santes-Palacios.

Estas diferencias en los parámetros pueden deberse a que las enzimas provienen de diferente origen, es decir, bacterias y células de insecto. Se ha reportado que existen diferencias en los sistemas de expresión procariota y eucariota, donde la NADPH:oxidoreductasa tiene mayor abundancia en los supersomas de insecto que en la fracción membranal de bacteria, a pesar de que la expresión de la enzima CYP1A1 humano sea la misma en ambas; lo mismo ocurre con la citocromo b_5 y su reductasa (NADP:citocromo b_5 reductasa) cuyos niveles son menores que la NADPH:oxidoreductasa en los sistemas bacterianos [86]. En ese estudio se demuestra que ambos sistemas difieren en la reacción de catálisis de B[a]p, encontrando la formación de siete metabolitos en el sistema de supersoma, mientras que con la expresión en bacterias solo se encuentran cinco de estos, reflejando la diferencia catalítica de los sistemas según el origen [86].

La composición lipídica de la membrana juega un papel importante en la actividad de la enzima ya que afecta su orientación y su ensamble como proteína membranal [87]. Se ha descrito que el CYP1A1 se encuentra localizada preferentemente en regiones de la membrana desorganizadas, las cuales presentan altos niveles de ácidos grasos insaturados, mientras que CYP1A2 se localiza en regiones ordenadas ricas en colesterol, esfingomiélin y ácidos grasos saturados. Construcciones quiméricas de CYP1A1 y CYP1A2 probadas en células HEK293T muestran que el CYP1A1 que contiene parcialmente el N-terminal del CYP1A2 tiene preferencia por regiones ordenadas de la membrana. Mientras que el CYP1A2 con N-terminal parcial del CYP1A1 ya no se localiza en regiones ordenadas [88], [89].

Continuando con la determinación del tipo de inhibición, se encontró que en los tres casos las moléculas actúan como inhibidores de tipo no competitivo de la enzima. Esto indica que se pueden unir tanto a la enzima libre, como al complejo enzima sustrato, manteniendo la misma afinidad en ambas formas de modo que no se afecta la K_m , mientras que la V_{max} de la enzima se observa disminuida. No se hallaron antecedentes del tipo de inhibición que estos compuestos ejercen en citocromos de humano o rata. Esto muestra la innovación del trabajo y el aporte de

estos estudios, ya que el conocimiento de compuestos capaces de inhibir a esta enzima, sobre todo de origen humano, es un campo de investigación en crecimiento, enfocado a la búsqueda de agentes quimiopreventivos de enfermedades como el cáncer.

En correspondencia con los valores obtenidos de CI_{50} , la 5-HF se mostró como el inhibidor más potente de los tres compuestos con una K_i de 69.48 ± 2.44 nM, reflejando una fuerte unión de este compuesto con la enzima, seguido de la 3-HF con 91.97 ± 5.52 nM y flavona con 121.5 ± 9.06 nM. Tanto los resultados de CI_{50} como los de cinética, sugieren que la estructura de estas moléculas está estrechamente ligada con su actividad biológica; para complementar los estudios *in vitro*, se decidió realizar modelos *in silico* de las interacciones entre la enzima y estos compuestos inhibidores.

Al analizar los modelos de acoplamiento molecular, observamos que existen residuos recurrentes que, al parecer, debido a la polaridad que poseen favorecen las interacciones con estos flavonoides en la cavidad de sitio activo. El hecho de que varios de estos residuos se conserven en el acoplamiento de los tres compuestos, indica que son relevantes para el reconocimiento y la orientación de los mismos. En ensayos utilizando como sustratos naringenina y dihidroxibergamotina reportan la participación de varios residuos que en el presente trabajo se encontró interactúan con los flavonoides probados [81]. Tal es el caso de la Phe224, la cual fue un residuo conservado que probablemente está formando un enlace π - π entre su anillo aromático y el de los flavonoides, tal como ocurre con el ligando α -NF [78][81]. También encontramos que a mayor número de residuos interactuando con el ligando, la fuerza de unión es más potente. Esto se observa en los modelos con los diferentes ligandos que se probaron, siendo los de mayor fuerza de unión y mayor número de interacciones la α -NF y B[a]p, seguidos de los tres flavonoides y finalmente la 7-etoxiresorufina. Los tres flavonoides presentan una orientación en la cavidad del sitio activo similar a la que se observa con la α -NF, donde la porción rotatable de estas moléculas se encuentra orientada hacia el grupo hemo a una distancia entre 4.8 y 5 Å en todos los casos.

Por otro lado, también se realizó un acoplamiento molecular donde la enzima ya estuviera unida a un sustrato (α -NF) para ilustrar la inhibición no competitiva. En esos modelos de acoplamiento los flavonoides se unen en un sitio periférico de la enzima entre las hélices A y K, en el cual interactúan con menor número de residuos. Debido a que este sitio no es una cavidad, esto se reflejó en una menor fuerza de unión a la enzima. Sin embargo, también se conservan residuos que parecen ser importantes para el reconocimiento de la molecular. En este modelo de acoplamiento, se encontró que la 5-HF está formando un puente de hidrógeno de 3.3 Å entre el grupo OH de la posición 5 y Gln418 de la hélice K; esto concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos cinéticos, donde este compuesto fue el que presentó mayor potencia de inhibición de la enzima.

Para complementar estos estudios se decidió realizar pruebas de mutagenicidad a través de la prueba de Ames. Como una primera forma de asegurarse que estos flavonoides pueden utilizarse de forma segura como agentes quimioprotectores sin riesgos perjudiciales como la mutagenicidad tanto del compuesto por sí mismo, como de metabolitos formados por su biotransformación en el hígado.

Para estos ensayos se utilizó la fracción S9 de hígado humano como sistema metabolizador con el fin de tener una respuesta cercana a lo que ocurre en el cuerpo humano. Se empleó la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* como cepa de prueba, mientras que para el control positivo se eligió la QT porque es un flavonoide que se sabe tiene poca mutagenicidad por sí solo y requiere ser biotransformado metabólicamente a su forma activa para ejercer mayor efecto mutagénico. De esta forma también se pudo determinar que la mezcla de S9 humano está actuando correctamente como sistema metabolizador. En la ilustración 20 se muestra que al coincubar QT con mezcla S9 humano aumenta el número de colonias revertantes de *S. typhimurium*, demostrando que esta mezcla funciona correctamente como un activador metabólico de compuestos promutagénicos.

Al realizar estas pruebas de mutagenicidad con los flavonoides seleccionados, los resultados indican que ninguno de los tres compuestos ejerce mutagenicidad dosis-dependiente, así como tampoco lo hacen al ser coincubados con el sistema metabólico S9 humano. Estos resultados indican que los flavonoides probados: 3-HF, 5-HF y flavona, no son agentes mutagénicos ni promutagénicos en este sistema de prueba, a pesar de que cuentan con algunas características que se ha reportado como necesarias para tener esta actividad, tales como el doble enlace en la posición 2 y 3, el grupo ceto en la posición 4, así como poseer un grupo libre hidroxilo en la posición 3 (en el caso de la 3-HF)[7], [47], [51]–[53].

Por otro lado, se ha reportado que algunos flavonoides tienen un efecto protector ante agentes mutagénicos. Estudios anteriores muestran que algunos flavonoides pueden suprimir fuertemente la mutagenicidad de aminas heterocíclicas como la 3-amino-1-metil-5H-piridol[4,3-b] índole (Trp-P-2), el cual es un producto formado durante los procesos de cocción de algunos alimentos (como carnes, pescados y alimentos ricos en proteínas o derivado del humo de tabaco), a través de la inhibición de la enzima CYP1A1, principal enzima involucrada en la biotransformación de este compuesto a su forma activa. De 17 flavonoides probados por Kanazawa y colaboradores, la flavona resultó tener el mejor efecto antimutagénico contra el Trp-P-2, con una IC_{50} de $0.29 \mu\text{M}$ [90]. Una vez más esos resultados concuerdan con lo que se encontró en el presente trabajo, demostrando que los flavonoides son potentes agentes con las características necesarias para ser propuestos como agentes quimioprotectores ante agentes xenobióticos.

8 Conclusiones

Los flavonoides ejercen un efecto sobre el CYP1A1 humano con una relación de estructura-actividad; demostrando que los compuestos con menor número de grupos OH en su estructura son los inhibidores más potentes de esta enzima.

La 5-HF, 3-HF y flavona son los compuestos probados en este trabajo con mayor fuerza de inhibición del CYP1A1 humano con K_i de 69.48 ± 2.44 nM, 91.97 ± 5.52 nM y 121.5 ± 9.06 nM respectivamente y los tres presentan inhibición de tipo no competitiva.

Por su parte, los modelos *in silico* muestran que existen residuos de aminoácidos que se conservan durante la interacción con estos diferentes ligandos, señalando relevancia para el reconocimiento y la orientación molecular. En la cavidad del sitio activo la Phe224 juega un papel importante ya que al parecer su anillo forma enlaces con los anillos de los flavonoides modelados; mientras que fuera del sitio activo se unen preferentemente entre las hélices A y K donde también hay residuos conservados durante las tres interacciones; en el caso de la 5-HF destaca la Gln418 de la hélice K ya que el modelo predice la formación de un puente de hidrógeno con este flavonoide.

Los estudios de mutagenicidad demostraron que estos compuestos no son agentes mutagénicos, mientras que la literatura indica que tienen una poderosa actividad antimutagénica ante agentes pro-mutágenos que son metabolizados a su forma activa principalmente por el CYP1A1.

Este trabajo sugiere que la 5-HF, 3-HF y la flavona en concentraciones nanomolar, son compuestos que pueden ser propuestos como buenos candidatos para actuar como agentes quimioprotectores. Aunque aún hace falta realizar estudios para profundizar en los efectos que pueden tener, se ve una luz del potencial que estos compuestos tienen para prevenir ciertos tipos de cáncer.

9 Perspectivas

Aún hace falta camino por recorrer en esta investigación, realizar estudios tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes sistemas experimentales aportaría conocimiento sobre el panorama de los beneficios que estos compuestos pueden ofrecer a la salud humana y en cuestiones de quimiopreención.

En estudios *in vitro*:

- En bacterias realizar ensayos de la antimutagenicidad que presentan estos compuestos ante agentes promutagénicos metabolizados por el CYP1A1, tales como HAP y aminos aromáticas para complementar los datos que se encontraron en literatura.
- En líneas celulares de cáncer se puede estudiar el efecto que tienen estos compuestos directamente en la modulación de enzimas CYP, como la expresión de mRNA, cuantificación proteica y actividad de estas, así como la modulación de algunos marcadores tumorigénicos.

En estudios *in vivo*:

- En ratones se podría evaluar la función quimioprotectora de estos compuestos, en un sistema completo, sería interesante ver los efectos de una dieta con estos compuestos antes, durante y después de la exposición a pro-carcinógenos metabolizados por el CYP1A1 como el B[a]p, así como la observación de cortes histopatológicos que revelen el estado de los órganos con el tratamiento.

10 Referencias

- [1] H. Marquardt, S. Schäferd, R. O. McClellan, and F. Welsch, *Toxicology*, 1st ed. Academic Press, 1990.
- [2] P. Jancova, P. Anzenbacher, and E. Anzenbacherova, "Phase II drug metabolizing enzymes," *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, vol. 154, no. 2, pp. 103–116, 2010.
- [3] N. Plant, *Molecular toxicology*. BIOS Scientific Publishers, 2003.
- [4] S. Rendic and F. P. Guengerich, "Contributions of Human Enzymes in Carcinogen Metabolism," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 24, pp. 1316–1383, 2012.
- [5] Y. Fujii-Kuriyama and J. Mimura, "Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 338, no. 1, pp. 311–317, Dec. 2005.
- [6] I. Costas, "Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics," 2005.
- [7] J. Dong, Q. Zhang, Q. Cui, G. Huang, X. Pan, and S. Li, "Flavonoids and Naphthoflavonoids: Wider Roles in the Modulation of Cytochrome P450 Family 1 Enzymes," *ChemMedChem*, vol. 11, no. 19, pp. 2102–2118, Oct. 2016.
- [8] K. Ruckpaul, H. Rein, and J. Blanck, "Regulation mechanisms of the endoplasmic cytochrome P-450 systems of the liver]," *Biomed. Biochim. Acta*, vol. 44, no. 3, pp. 351–79, 1985.
- [9] M. Uhlen *et al.*, "Tissue-based map of the human proteome," *Science (80-.)*, vol. 347, no. 6220, pp. 1260419–1260419, Jan. 2015.
- [10] J. T. Groves, "Models and mechanisms of cytochrome P450 action," in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry: Third edition*, P. R. Ortiz de Montellano, Ed. Boston, MA: Springer US, 2005, pp. 1–43.
- [11] D. R. Nelson *et al.*, "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature.," *Pharmacogenetics*, vol. 6, no. 1, pp. 1–42, Feb. 1996.
- [12] S. E. Graham and J. A. Peterson, "How Similar Are P450s and What Can Their Differences Teach Us?," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 369, no. 1, pp. 24–29, Sep. 1999.
- [13] O. Gotoh, "Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 1, pp. 83–90, Jan. 1992.
- [14] P. A. Williams, J. Cosme, V. Sridhar, E. F. Johnson, and D. E. McRee, "Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity.," *Mol. Cell*, vol. 5, no. 1, pp. 121–31, Jan. 2000.

- [15] G. N. Wogan, S. S. Hecht, J. S. Felton, A. H. Conney, and L. A. Loeb, "Environmental and chemical carcinogenesis," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 473–486, Dec. 2004.
- [16] S. Rendic and F. P. Guengerich, "Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals.," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 28, no. 1, pp. 38–42, Jan. 2015.
- [17] Z. Jiang *et al.*, "Toward the evaluation of function in genetic variability: Characterizing human SNP frequencies and establishing BAC-transgenic mice carrying the human CYP1A1_CYP1A2 locus," *Hum. Mutat.*, vol. 25, no. 2, pp. 196–206, Feb. 2005.
- [18] A. Dey, J. E. Jones, and D. W. Nebert, "Tissue- and cell type-specific expression of cytochrome P450 1A1 and cytochrome P450 1A2 mRNA in the mouse localized in situ hybridization," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 58, no. 3, pp. 525–537, Aug. 1999.
- [19] J. Liu, J. Sridhar, and M. Foroozesh, "Cytochrome P450 Family 1 Inhibitors and Structure-Activity Relationships," *Molecules*, vol. 18, no. 12, pp. 14470–14495, Nov. 2013.
- [20] J. Cui and S. Li, "Inhibitors and prodrugs targeting CYP1: a novel approach in cancer prevention and therapy.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 21, no. 5, pp. 519–52, 2014.
- [21] T. Shimada *et al.*, "Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs.," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 24, no. 5, pp. 515–22, May 1996.
- [22] T. Shimada, Y. Oda, E. M. Gillam, F. P. Guengerich, and K. Inoue, "Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009.," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 29, no. 9, pp. 1176–82, Sep. 2001.
- [23] Q. Ma and A. Y. H. Lu, "CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Evolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 35, no. 7, pp. 1009–1016, Apr. 2007.
- [24] B. D. Jeffy, R. B. Chirnomas, and D. F. Romagnolo, "Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors.," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 39, no. 2–3, pp. 235–44, 2002.
- [25] M. Shou, K. W. Krausz, F. J. Gonzalez, and H. V. Gelboin, "Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene by human recombinant cytochromes P450, lung and liver microsomes.," *Carcinogenesis*, vol. 17, no. 11, pp. 2429–33, Nov. 1996.
- [26] H. Bao, M. Vepakomma, and M. A. Sarkar, "Benzo(a)pyrene exposure induces CYP1A1 activity and expression in human endometrial cells.," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 81, no. 1, pp. 37–45, May 2002.
- [27] A. Anwar-Mohamed, R. H. Elbekai, and A. O. El-Kadi, "Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism," *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 5, no. 5, pp. 501–521, May 2009.

- [28] D. Schwarz *et al.*, "Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 67, no. 8, pp. 1445–1457, Apr. 2004.
- [29] S. Fortin *et al.*, "Activation of Phenyl 4-(2-Oxo-3-alkylimidazolidin-1-yl)benzenesulfonates Prodrugs by CYP1A1 as New Antimitotics Targeting Breast Cancer Cells," *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 12, pp. 4963–4982, Jun. 2017.
- [30] T. L. Poulos and R. Raag, "Cytochrome P450cam: crystallography, oxygen activation, and electron transfer.," *FASEB J.*, vol. 6, no. 2, pp. 674–9, Jan. 1992.
- [31] A. W. Munro, H. M. Girvan, and K. J. McLean, "Variations on a (t)heme--novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 24, no. 3, pp. 585–609, Jun. 2007.
- [32] D. L. Nelson, A. L. Lehninger, and M. M. Cox, *Lehninger principios de bioquímica*. Omega, 2015.
- [33] I. H. Segel, *Biochemical calculations : how to solve mathematical problems in general biochemistry*. Wiley, 1976.
- [34] I. H. Segel, *Enzyme kinetics : behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. Wiley, 1975.
- [35] P. C. Hollman and M. B. Katan, "Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man.," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 51, no. 8, pp. 305–10, 1997.
- [36] J. Barnes, L. A. Anderson, and J. D. Phillipson, "St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties.," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 53, no. 5, pp. 583–600, May 2001.
- [37] G. R. Beecher, "Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake.," *J. Nutr.*, vol. 133, no. 10, p. 3248S–3254S, Oct. 2003.
- [38] H.-J. Kim, S. B. Lee, S.-K. Park, H. M. Kim, Y. I. Park, and M.-S. Dong, "Effects of hydroxyl group numbers on the B-ring of 5,7-dihydroxyflavones on the differential inhibition of human CYP 1A and CYP1B1 enzymes," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 28, no. 10, pp. 1114–1121, Oct. 2005.
- [39] M. Tsujimoto, M. Horie, H. Honda, K. Takara, and K. Nishiguchi, "The structure-activity correlation on the inhibitory effects of flavonoids on cytochrome P450 3A activity.," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 32, no. 4, pp. 671–6, Apr. 2009.
- [40] M. C. Canivenc-Lavier, M. F. Vernevaut, M. Totis, M. H. Siess, J. Magdalou, and M. Suschetet, "Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver.," *Toxicology*, vol. 114, no. 1, pp. 19–27, Nov. 1996.
- [41] H. Shih, G. V. Pickwell, and L. C. Quattrochi, "Differential Effects of Flavonoid Compounds on Tumor Promoter-Induced Activation of the Human CYP1A2 Enhancer," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 373, no. 1, pp. 287–294, Jan. 2000.
- [42] T. Walle, Y. Otake, J. A. Brubaker, U. K. Walle, and P. V Halushka, "Disposition and

- metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers.," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 51, no. 2, pp. 143–6, Feb. 2001.
- [43] Z. C. Kang, S.-J. Tsai, and H. Lee, "Quercetin Inhibits Benzo[a]Pyrene-Induced DNA Adducts in Human Hep G2 Cells by Altering Cytochrome P-450 1A1 Gene Expression," *Nutr. Cancer*, vol. 35, no. 2, pp. 175–179, Nov. 1999.
- [44] H. P. Ciolino, P. J. Daschner, and G. C. Yeh, "Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially.," *Biochem. J.*, vol. 340 (Pt 3), pp. 715–22, Jun. 1999.
- [45] I. D. Silva, A. S. Rodrigues, J. Gaspar, R. Maia, A. Laires, and J. Rueff, "Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol.," *Mutagenesis*, vol. 12, no. 5, pp. 383–90, Sep. 1997.
- [46] I. D. Silva, A. S. Rodrigues, J. Gaspar, A. Laires, and J. Rueff, "Metabolism of galangin by rat cytochromes P450: relevance to the genotoxicity of galangin.," *Mutat. Res.*, vol. 393, no. 3, pp. 247–57, Oct. 1997.
- [47] H. Doostdar, M. D. Burke, and R. T. Mayer, "Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1," *Toxicology*, vol. 144, no. 1–3, pp. 31–38, Apr. 2000.
- [48] W. Tassaneeyakul *et al.*, "Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 265, no. 1, pp. 401–7, Apr. 1993.
- [49] F. P. Guengerich *et al.*, "Interactions of ingested food, beverage, and tobacco components involving human cytochrome P450 1A2, 2A6, 2E1, and 3A4 enzymes.," *Environ. Health Perspect.*, vol. 102 Suppl 9, pp. 49–53, Nov. 1994.
- [50] S. Zhai, R. Dai, F. K. Friedman, and R. E. Vestal, "Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids.," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 26, no. 10, pp. 989–92, Oct. 1998.
- [51] H. Takemura, T. Itoh, K. Yamamoto, H. Sakakibara, and K. Shimoi, "Selective inhibition of methoxyflavonoids on human CYP1B1 activity," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 18, no. 17, pp. 6310–6315, Sep. 2010.
- [52] J. Y. Moon, D. W. Lee, and K. H. Park, "Inhibition of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity in rat liver microsomes by naturally occurring flavonoids: Structure-activity relationships," *Xenobiotica*, vol. 28, no. 2, pp. 117–126, Jan. 1998.
- [53] V. P. Androutsopoulos, A. Papakyriakou, D. Vourloumis, A. M. Tsatsakis, and D. A. Spandidos, "Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes," *Pharmacol. Ther.*, vol. 126, no. 1, pp. 9–20, Apr. 2010.
- [54] J. Sridhar, J. Liu, M. Foroozesh, and C. L. K. Stevens, "Insights on Cytochrome P450 Enzymes and Inhibitors Obtained Through QSAR Studies," *Molecules*, vol. 17, no. 12, pp. 9283–9305, Aug. 2012.

- [55] H. Shimada *et al.*, "Differential mechanisms for the inhibition of human cytochrome P450 1A2 by apigenin and genistein," *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, vol. 24, no. 4, pp. 230–234, Jul. 2010.
- [56] J. T. MacGregor and L. Jurd, "Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*," *Mutat. Res.*, vol. 54, no. 3, pp. 297–309, Dec. 1978.
- [57] M. J. Andries, G. W. Lucier, J. Goldstein, and C. L. Thompson, "Involment of cytochrome P-450c in a-naphthoflavone metabolism by rat liver microsomes," *Mol. Pharmacol.*, vol. 37, pp. 990–995, 1990.
- [58] M. Andries, G. W. Lucier, K. Lundgren, and C. L. Thompson, "Metabolic activation of α -naphthoflavone by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin-induced rat liver microsomes," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 67, no. 1–2, pp. 33–47, 1988.
- [59] S. C. Sahu and G. C. Gray, "Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation," *Cancer Lett.*, vol. 85, no. 2, pp. 159–64, Oct. 1994.
- [60] I. D. Silva, J. Gaspar, G. G. da Costa, A. S. Rodrigues, A. Laires, and J. Rueff, "Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 124, no. 1, pp. 29–51, Jan. 2000.
- [61] J. Rueff, J. Gaspar, and A. Laires, "Structural requirements for mutagenicity of flavonoids upon nitrosation. A structure-activity study," *Mutagenesis*, vol. 10, no. 4, pp. 325–8, Jul. 1995.
- [62] J. P. Brown, "A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds," *Mutat. Res.*, vol. 75, no. 3, pp. 243–77, May 1980.
- [63] D. M. Maron and B. N. Ames, "Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test," *Mutat. Res.*, vol. 113, no. 3–4, pp. 173–215, May 1983.
- [64] D. M. Maron and B. N. Ames, "Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test," *Mutat. Res.*, vol. 113, no. 3–4, pp. 173–215, May 1983.
- [65] K. Mortelmans and E. Zeiger, "The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay," *Mutat. Res.*, vol. 455, pp. 29–60, 2000.
- [66] J. McCann, N. E. Spingarn, J. Kabori, and B. N. Ames, "Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 72, no. 3, pp. 979–83, Mar. 1975.
- [67] R. E. McMahon, J. C. Cline, and C. Z. Thompson, "Assay of 855 Test Chemicals in Ten Tester Strains Using a New Modification of the Ames Test for Bacterial Mutagens," *CANCER Res.*, vol. 39, pp. 682–693, 1979.
- [68] P. Beaune, R. Lemestré-Cornet, P. Kremers, A. Albert, and J. Gielen, "The *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test: comparison of human and rat livers as activating systems," *Mutat. Res. Toxicol.*, vol. 156, no. 3, pp. 139–146, Jun.

1985.

- [69] A. Hakura, S. Suzuki, and T. Satoh, "Improvement of the Ames Test Using Human Liver S9 Preparation," in *Optimization in Drug Discovery*, Totowa, NJ: Humana Press, 2004, pp. 325–336.
- [70] A. Hakura, S. Suzuki, and T. Satoh, "Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test.," *Mutat. Res.*, vol. 438, no. 1, pp. 29–36, Jan. 1999.
- [71] J. A. Cox, M. D. Fellows, T. Hashizume, and P. A. White, "The utility of metabolic activation mixtures containing human hepatic post-mitochondrial supernatant (S9) for *in vitro* genetic toxicity assessment," *Mutagenesis*, vol. 31, no. 2, pp. 117–130, Mar. 2016.
- [72] A. Hakura *et al.*, "Use of human liver S9 in the Ames test: assay of three procarcinogens using human S9 derived from multiple donors.," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 37, no. 1, pp. 20–7, Feb. 2003.
- [73] A. Hakura *et al.*, "Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds," *Mutagenesis*, vol. 20, no. 3, pp. 217–228, May 2005.
- [74] Z. Y. Guo, E. M. J. Gillam, S. Ohmori, R. H. Tukey, and F. P. Guengerich, "Expression of Modified Human Cytochrome P450 1A1 in Escherichia coli: Effects of 5' Substitution, Stabilization, Purification, Spectral Characterization, and Catalytic Properties," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 312, no. 2, pp. 436–446, Aug. 1994.
- [75] M. D. Burke, S. Thompson, C. R. Elcombe, J. Halpert, T. Haaparanta, and R. T. Mayer, "Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 34, no. 18, pp. 3337–45, Sep. 1985.
- [76] R. A. Copeland, *Enzymes : a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. Wiley, 2000.
- [77] O. Trott and A. J. Olson, "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading," *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 2, p. NA-NA, 2009.
- [78] A. A. Walsh, G. D. Szklarz, and E. E. Scott, "Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 18, pp. 12932–12943, 2013.
- [79] R. Santes-Palacios, "Caracterización bioquímica de la dihidroxibergamotina como inhibidor de citocromo p450," Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- [80] L. D. Claxton and S. Toney, "Interim procedures for conducting the Salmonella/microsomal mutagenicity assay (Ames test)," *Environmental Protection Agency*. p. 39, 1983.
- [81] R. Santes-Palacios, A. Romo-Mancillas, R. Camacho-Carranza, and J. J. Espinosa-Aguirre, "Inhibition of human and rat CYP1A1 enzyme by grapefruit juice compounds," *Toxicol. Lett.*, vol. 258, pp. 267–275, Sep. 2016.

- [82] K. M. Valant-Vetschera, T. D. Bhutia, and E. Wollenweber, "Chemodiversity of exudate flavonoids in *Dionysia* (Primulaceae): A comparative study," *Phytochemistry*, vol. 71, no. 8–9, pp. 937–947, Jun. 2010.
- [83] K. M. Valant-Vetschera, T. D. Bhutia, and E. Wollenweber, "Exudate flavonoids of *Primula* spp: structural and biogenetic chemodiversity.," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 4, no. 3, pp. 365–70, Mar. 2009.
- [84] L. Wenjun and C. Liming, "Method for preparing artemisia leaf total chromocor," 11-Dec-2007.
- [85] L. Huibin, W. Xiao, L. Weifa, X. Zhenchao, T. Wenming, and W. Hongguan, "Total chromocor extract of *blumea riparia* as well as pharmaceutical composition and preparing method thereof," 28-Nov-2007.
- [86] M. Stiborová *et al.*, "Comparison of human cytochrome P450 1A1-catalysed oxidation of benzo[a]pyrene in prokaryotic and eukaryotic expression systems," *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.*, vol. 148, no. 11, pp. 1959–1969, Nov. 2017.
- [87] L. Brignac-Huber, J. R. Reed, and W. L. Backes, "Organization of NADPH-cytochrome P450 reductase and CYP1A2 in the endoplasmic reticulum--microdomain localization affects monooxygenase function.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 79, no. 3, pp. 549–57, Mar. 2011.
- [88] E. E. Scott *et al.*, "The Role of Protein-Protein and Protein-Membrane Interactions on P450 Function," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 44, no. 4, pp. 576–590, Mar. 2016.
- [89] J. W. Park, J. R. Reed, and W. L. Backes, "The Localization of Cytochrome P450s CYP1A1 and CYP1A2 into Different Lipid Microdomains Is Governed by Their N-terminal and Internal Protein Regions.," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 49, pp. 29449–60, Dec. 2015.
- [90] K. Kanazawa, T. Yamashita, H. Ashida, and G. Danno, "Antimutagenicity of flavones and flavonols to heterocyclic amines by specific and strong inhibition of the cytochrome P450 1A family.," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 62, no. 5, pp. 970–7, May 1998.

Apéndice I

En la figura 24 se muestra un gráfico de la actividad del CYP1A1 humano recombinante obtenido a partir de fracción membrana, se realizó este ensayo exploratorio para determinar la cantidad apropiada de proteína que presenta la mejor actividad en las condiciones de los ensayos. Con base en esto, se seleccionó la concentración de 40 μg de proteína para los ensayos subsecuentes.

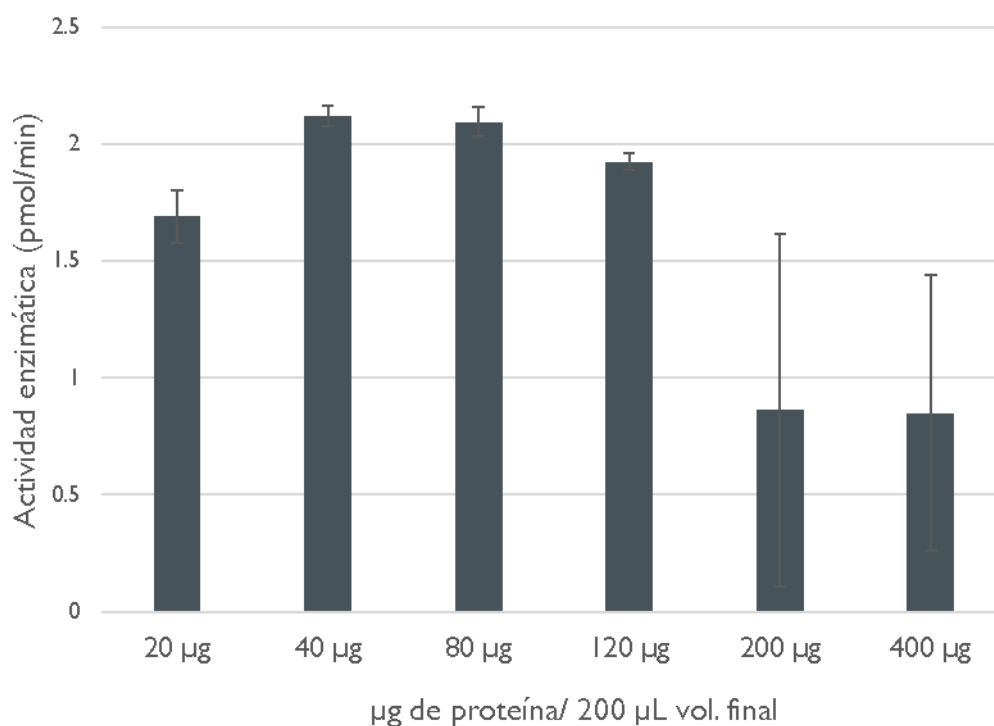


Figura 24. Actividad enzimática de CYP1A1 humano recombinante expresada en pmol/min, a diferentes cantidades de proteína, utilizando como sustrato 7-etoxiresorufina 50 μM , amortiguador Tris base 50 mM y cloruro de magnesio 25 mM con un pH de 7.5. Después de incubar durante 3 min a 37 $^{\circ}\text{C}$, se adiciono NADPH 50 μM , teniendo un volumen final de mezcla de reacción de 200 μL .

A través de un análisis de las secuencias de las enzimas del CYP1A1 humano y de rata, se encontró que poseen un 77.5% de identidad y un 88% de similitud (Figura 25 panel superior). Por otra parte, la estructura del CYP1A1 de rata aún no ha sido cristalizada, sin embargo, en 2015 Santes-Palacios realizó un modelo computacional de esta enzima, y la comparó con la estructura cristalizada del CYP1A1 humano. La predicción de estos modelos es que las estructuras de ambos CYP son similares, aunque sugiere la presencia de modificaciones en la proximidad de las hélices y asas hacia el grupo hemo, tal como se muestra en la figura 25 panel inferior [79].

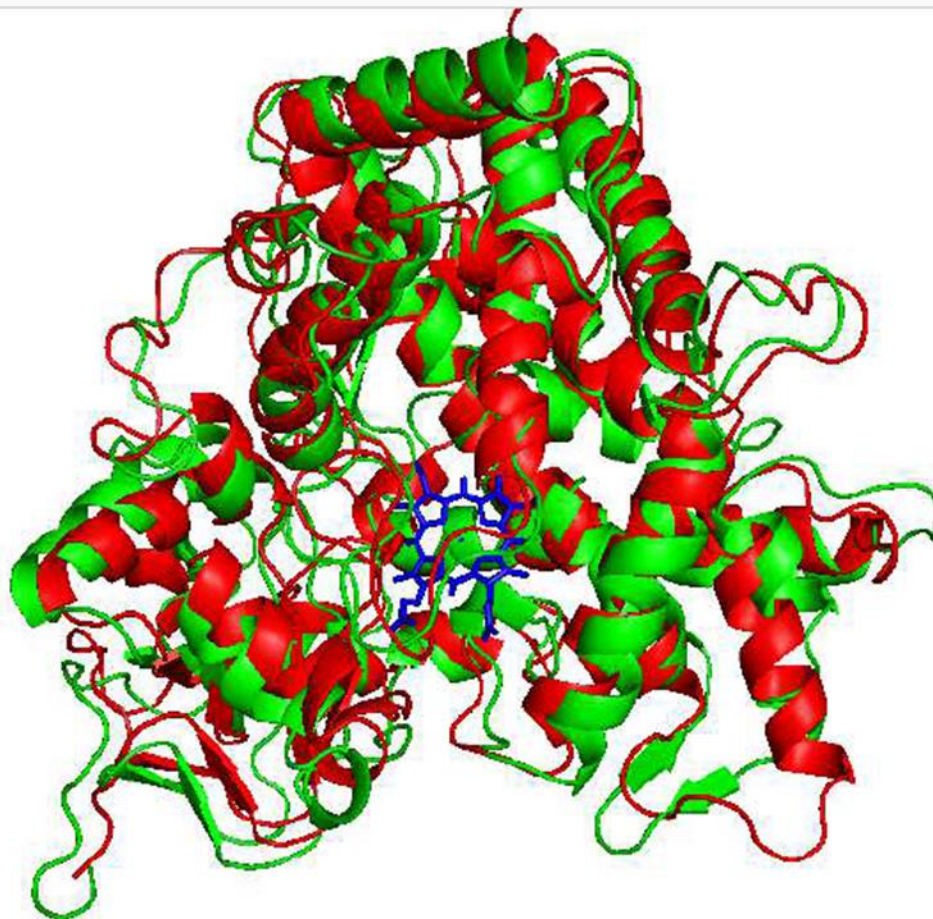


Figura 25. Alineación de secuencias de aminoácidos de CYP1A1 humano (Query) y de rata (Subjct). Los recuadros rojos, indican los residuos que forman parte del sitio catalítico (Panel superior). Transposición de la estructura cristalizada del CYP1A1 humano (color rojo) con el modelo de rata (color verde), en azul se esquematiza el grupo hemo de las enzimas. (Tomadas de Santes-Palacios, 2015 [79])