



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO ANTIMUTAGÉNICO DE FLAVONOIDES FRENTE A
AMINAS HETEROCÍCLICAS GENERADAS EN EL PROCESO DE
COCCIÓN DE LA CARNE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

CRISTINA JIMÉNEZ LÓPEZ

CIUDAD DE MÉXICO

Noviembre 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. ROGELIO RODRIGUEZ SOTRES
VOCAL: DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
SECRETARIO: DR. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
1° SUPLENTE: DR. FELIX MORALES FLORES
2° SUPLENTE: DR. JOSE ENRIQUE BARQUERA LOZADA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS – UNAM

Circuito Mario de la Cueva s/n, Coyoacán, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, CDMX

ASESOR DEL TEMA:

DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

SUSTENTANTE:

CRISTINA JIMÉNEZ LÓPEZ

Resumen

En 2015 la OMS clasificó a la carne roja como probable carcinógeno para humanos pues existe evidencia sugerente que relaciona su consumo con el cáncer. Estudios anteriores han puesto de manifiesto que el proceso de cocción de la carne genera compuestos con actividad mutagénica notable debido a la presencia de compuestos pertenecientes al grupo genérico de las aminas heterocíclicas: MeIQx, PhIP, 2,4-DiMeIQx. Este grupo de compuestos, junto con otros xenobióticos, son transformados en la fase I del metabolismo por la enzima citocromo P450. Las aminas heterocíclicas son principalmente metabolizadas por la isoforma CYP1A2; el producto resultante es una variedad de metabolitos, algunos de ellos altamente reactivos, capaces de formar enlaces covalentes con biomoléculas incluyendo el DNA, con el potencial de generar mutaciones que pueden resultar en cáncer. Por lo anterior, se han estudiado compuestos con potencial de inhibir el proceso metabólico de la enzima como un método de prevención del cáncer. En este trabajo se estudiaron 3 flavonoides seleccionados por su capacidad de inhibir a la enzima CYP1A1: flavona, 3-hidroxiflavona (3-HF), 5-hidroxiflavona (5-HF) con el fin de determinar su interacción con la segunda isoforma de la subfamilia denominada CYP1A2, a través de ensayos de inhibición enzimática definiendo cuantitativamente la cantidad de flavonoide (inhibidor) necesario para inhibir el 50 % de la actividad enzimática (IC_{50}). También, se estudió el efecto antimutagénico que poseen los flavonoides frente a las aminas heterocíclicas generadas en los procesos de cocción de la carne mediante la prueba de Ames, utilizando fracción S9 de hígado de rata para mimetizar las condiciones metabólicas de los mamíferos. Los resultados de inhibición enzimática mostraron que la isoforma CYP1A2 presenta una mayor sensibilidad hacia la 5-hidroxiflavona con una IC_{50} de 355 nM. Al probar la MeIQx en la prueba de Ames con la 5-HF, la mutagénesis inducida por la amina fue inhibida únicamente un $24\% \pm 6\%$ a una concentración de 500 nM. Se distinguió que la inhibición no aumenta linealmente con la concentración del flavonoide. Bajo las condiciones probadas, se identificó a los flavonoides 5-HF y flavona con un efecto antimutagénico de moderado a potente contra la mutagénesis inducida por el MeIQx. Se proponen ensayos adicionales para establecer si estos flavonoides pueden ser considerados para la prevención de procesos de mutagénesis causados por las aminas heterocíclicas generadas en el proceso de cocción de la carne.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE ANEXOS	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	IV
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MARCO TEÓRICO	4
2.1 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS.....	4
2.1.1 <i>Citocromo P450</i>	6
2.1.1.1 Estructura del Citocromo P450	8
2.1.1.2 Mecanismo catalítico de la citocromo P450 oxidasa	9
2.1.1.3 Clasificación de los citocromo P450.....	11
2.2 AMINAS HETEROCÍCLICAS (AHCs)	12
2.2.1 <i>Formación de aminas heterocíclicas</i>	12
2.2.2 <i>Aductos de AHC-DNA</i>	13
2.2.3 <i>Metabolismo de las aminoimidoazoazarenos (AIAs)</i>	16
2.3 FLAVONOIDES	18
2.3.1 <i>Química y metabolismo de flavonoides</i>	18
2.3.2 <i>Interacción entre flavonoides y CYPs</i>	20
2.3.3 <i>Flavonoides como inhibidores del CYP</i>	21
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	24
3.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	24
3.1.1 <i>Determinación de la concentración de proteína microsomal</i>	24
3.1.2 <i>Ensayo de actividad enzimática</i>	25
3.2 ENSAYO DE MUTAGENICIDAD.....	26
3.2.1 <i>Verificación de marcadores genotípicos</i>	26
3.2.2 <i>Ensayo de mutagenicidad - Prueba de Ames</i>	28
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	30
4.1.1 <i>Concentración inhibitoria media (IC₅₀) de la flavona, 3-hidroxiflavona y 5-hidroxiflavona sobre la actividad del CYP1A2</i>	32
4.2 EFECTO ANTIMUTAGÉNICO DE LA 5-HIDROXIFLAVONA EN LA PRUEBA DE AMES	33
4.2.1 <i>Determinación de la cantidad de promutágeno a utilizar en el ensayo de antimutagénesis</i>	33
4.2.2 <i>Efecto antimutagénico de la 5-hidroxiflavona</i>	35
4.3 CURVAS CONCENTRACIÓN-EFECTO SOBRE MUTAGENICIDAD INDUCIDA DE MEIQX.....	36
5 DISCUSIÓN	38
6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	42
REFERENCIAS.....	45
ANEXO 1.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción monooxigenasa mediada por CYP	7
Figura 2. Citocromo P450: estructura cristalina de microsomas humano P450 1A2....	8
Figura 3. Grupo protoporfirina IX hexacoordinado del CYP	8
Figura 4. Ciclo catalítico de la monooxigenación mediada por CYP.	10
Figura 5. Aminoimidazoazaarenos (AIAs) PhIP, MeIQx y 4,8-DiMeIQx producidos en el proceso de cocción de la carne.....	12
Figura 6. Reacción de Maillard que da lugar a la formación del promutágeno PhIP....	13
Figura 7. Aducto PhIP-DNA mayormente formado por el metabolismo de CYP1A2..	14
Figura 8. Vías metabólicas de MeIQx.	17
Figura 9. Esqueleto básico de un flavonoide aglicona.	19
Figura 10. Estructura de la flavona, 3-hidroxiavona y 5-hidroxiavona.	23
Figura 11. Porcentaje de actividad de CYP1A2 a diferentes concentraciones de inhibidor.....	31
Figura 12. Curva dosis-respuesta de cuatro parámetros 4PL log[inhibidor] vs. % actividad.	32
Figura 13. Curva concentración-efecto de 4,8-DiMeIQx y PhIP en la prueba de Ames con preincubación.	34
Figura 14. Efecto Inhibitorio de 5-hidroxiavona sobre los promutágenos PhIP, MeIQx y 4,8-DiMeIQx a una concentración fija de inhibidor	35
Figura 15. Curvas concentración-efecto de la flavona ante el promutágeno MeIQx ..	36
Figura 16. Curvas concentración-efecto de la flavona ante el promutágeno MeIQx ..	36
Figura 17. Curva concentración-efecto de la 3-hidroxiavona ante el promutágeno MeIQx.....	37
Figura 18. Curva concentración-efecto de la 5-hidroxiavona ante el promutágeno MeIQx.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. CI_{50} de los flavonoides probados sobre CYP1A2 de rata.....	32
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Métodos bioquímicos y genéticos	53
--	----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

3-HF	3-hidroxiflavona
4,8-DiMeIQx	2-Amino-3,4,8-trimetil-3H-imidazo[4,5-f]quinoxalina
5-HF	5-hidroxiflavona
AHC	Aminas heterocíclicas
AhR	Receptor de hidrocarburos de arilo
AIA	Aminoimidazoazaarenos
AIA-DNA	Aductos aminoimidazoazaarenos-DNA
AKR	Aldo-ceto reductasas
Apc	Adenomatous polyposis coli
B[a]p	Benzo[a]pireno
COX	Ciclooxigenasas
CYP	Citocromo P450
CYP1A1	Citocromo P450 familia 1 subfamilia A miembro 1
CYP1A2	Citocromo P450 familia 1 subfamilia A miembro 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FMO	Flavin monooxigenasas
Fracción S9	Fracción de sobrenadante obtenida mediante centrifugación a 9000 g
GST	Glutation S-transferasa
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
MeIQx	2-Amino-3,8-dimetilimidazo [4,5-f] quinoxalina
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAT	N-acetiltransferasas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PhIP	2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-b)piridina
SULT	Sulfotransferasas

Capítulo 1

1 INTRODUCCIÓN

La exposición a agentes tóxicos capaces de ocasionar daño en el material genético es inevitable. Diariamente estamos expuestos a una abundante cantidad de químicos en el ambiente, en nuestra dieta y en artículos de higiene personal. A estos compuestos foráneos que entran al cuerpo pero que no están normalmente presentes en él y no tienen un rol fisiológico se les conoce como xenobióticos¹. En esta definición también se encuentran los fármacos, estimulantes sociales como la nicotina y el alcohol, entre otros químicos tóxicos a los que estamos expuestos involuntariamente.

Los xenobióticos existen desde antes de la vida del ser humano en la tierra, y desde entonces, la acumulación de xenobióticos ha sido incompatible con la supervivencia. Los mecanismos generales de protección contra xenobióticos comprenden: (i) la prevención de la entrada de los xenobióticos al torrente sanguíneo u órganos evitando su absorción o distribución, (ii) la eliminación física (excreción vía urinaria, bilis, saliva, piel, entre otros fluidos) y (iii) la eliminación química (metabolismo o biotransformación)¹. En este último caso, los xenobióticos son modificados en el cuerpo en productos, también llamados metabolitos, hacia compuestos que tienden a ser más solubles en agua, por ende, más fácilmente excretables. No obstante, algunos de estos metabolitos pueden ser altamente reactivos, más tóxicos o más lipofílicos que el xenobiótico principal. Los metabolitos reactivos reaccionan espontáneamente con biomoléculas como el DNA, dañándolo y propiciando mutaciones que pueden desencadenar la carcinogénesis². Las reacciones causadas por metabolitos reactivos son llamadas reacciones post-enzimáticas y tienen un gran significado toxicológico.

En octubre de 2015, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó a la

carne roja como *probablemente carcinogénico para humanos* pues existe evidencia que relaciona su consumo con el cáncer. Estos resultados se dieron a conocer a través de un comunicado de prensa^a donde se resumen los resultados de un estudio que analiza en conjunto los datos de estudios clínicos realizados por un grupo de 22 expertos de 10 países en donde tomaron en cuenta más de 800 investigaciones epidemiológicas. No obstante, el primer manifiesto de agentes causantes de mutaciones contenidas en la carne se presentó en 1975, hace más de 40 años, por un grupo de investigación en el Centro Nacional de Cáncer en Tokio³. Desde entonces, diversos estudios han demostrado que el proceso de cocción de la carne genera compuestos con actividad mutagénica notable debido a la presencia de compuestos pertenecientes al grupo genérico de las aminas heterocíclicas (AHCs)^{4,5,6}. La mutagenicidad se refiere a la inducción de cambios permanentes en la secuencia de DNA de un organismo, que puede derivar en un cambio hereditario en la características de los sistemas vivos⁷. El grupo de las aminas heterocíclicas y varios otros xenobióticos no son mutagénicos *per se*, sino que, al ser transformados, se activan para ejercer sus efectos mutagénicos. Esta transformación química es principalmente llevada a cabo por la segunda isoforma de la subfamilia CYP1 denominada CYP1A2 perteneciente al mayor grupo de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, el citocromo P450 (CYP). Ciertos productos resultantes de la actividad enzimática de CYP1A2 son metabolitos altamente reactivos, capaces de formar enlaces covalentes con biomoléculas incluyendo el DNA induciendo mutaciones que pueden resultar en cáncer. Sin embargo, a su vez, en la dieta también se han identificado componentes capaces de contraponerse a los efectos de los mutágenos, llamados antimutágenos. Los flavonoides son un grupo diverso de compuestos presentes en el reino vegetal y han sido reconocidos por su capacidad de inhibir al grupo de enzimas encargadas de activar metabólicamente a las aminas heterocíclicas. El entendimiento de las enzimas involucradas en el metabolismo y activación de mutágenos se ha convertido en una inquietud global puesto que abre la posibilidad de contar con tratamientos para la prevención del cáncer.

En esta tesis se estudiaron 3 flavonoides flavona, 3-hidroxiavona y 5-hidroxiavona con el fin de determinar su interacción con la segunda isoforma de la subfamilia

^a https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_E.pdf

denominada CYP1A2, a través de ensayos de inhibición enzimática definiendo cuantitativamente la cantidad de flavonoide (inhibidor) necesario para inhibir el 50 % de la actividad enzimática (IC_{50}). Después, se estudió el efecto antimutagénico que poseen estos frente a las aminos heterocíclicas generadas en los procesos de cocción de la carne mediante la prueba de Ames y finalmente, se determinó si este efecto era dependiente de la concentración del flavonoide.

La tesis comprende 6 capítulos. El segundo capítulo está dedicado a brindar la fundamentación teórica más relevante que conduce a la pregunta de investigación, donde se dan a conocer los xenobióticos y la transformación bioquímica que llevan a cabo, primero introduciendo al grupo de enzimas del citocromo P450 por su papel clave en el metabolismo de xenobióticos, después a las aminos heterocíclicas como responsables de la iniciación de procesos carcinogénicos y a los flavonoides como las moléculas que pueden contraponerse a los efectos de los mutágenos, así mismo se discutirán aspectos imprescindibles para el entendimiento de su metabolismo. En el tercer capítulo se describe la metodología experimental empleada para comprobar la hipótesis planteada. En el cuarto y quinto se presentan y discuten los resultados obtenidos. Para finalizar, en el sexto se exponen las principales conclusiones a las que se arribó y se resumen algunas perspectivas del trabajo presentado en esta tesis.

Capítulo 2

2 Marco teórico

2.1 Metabolismo de xenobióticos

Termodinámicamente hablando, los organismos mantienen niveles bajos de entropía extrayendo energía a partir de un flujo permanente de materia entrando como compuestos fisiológicos y saliendo como desechos y calor. Los productos de desecho resultantes del metabolismo fisiológico presentan un mayor contenido entrópico que los compuestos que entran, por lo que ya no tienen valor para el organismo y deben ser excretados. Así, el proceso de disposición de cualquier sustancia que entra al organismo sigue 4 pasos fundamentales: absorción, distribución y/o almacenamiento, metabolismo y excreción. Los procesos de absorción, distribución y excreción exhiben interacciones débiles y reversibles en el rango de 10 a 60 kJ mol⁻¹. En contraste, las reacciones metabólicas son interacciones fuertes y ocurren en el rango aproximado de 200 a 400 kJ mol⁻¹. El metabolismo es el resultado de un sistema adaptativo complejo. La evolución ha favorecido a partir de mutaciones aleatorias la aparición de enzimas capaces de reconocer, inactivar y excretar fácilmente compuestos sin valor energético para el organismo, entre ellos, xenobióticos potencialmente perjudiciales de enorme diversidad química. Sin embargo, estas reacciones tienen la posibilidad de formar enlaces covalentes con proteínas, ácidos nucleicos o lípidos de membrana de manera irreversible, formando productos o metabolitos, más tóxicos, más lipofílicos o más reactivos que el xenobiótico principal. En este último caso, el metabolismo del xenobiótico principal resulta en un producto que puede formar aductos de DNA induciendo el proceso de mutagénesis.

Las enzimas se clasifican en seis clases en base a las reacciones que se catalizan⁸: (i) oxidoreductasas, que catalizan reacciones de oxidorreducción; (ii) Transferasas, que se transfieren al grupo de un donante a un aceptador; (iii) Hidrolasas, que catalizan la escisión hidrolítica de enlaces C-O, C-N, C-C, y algunos otros enlaces; (iv) Liasas, que segmentan enlaces C-C, C-O, C-N, C-S, y otros enlaces por eliminación; (v) Isomerasas, que catalizan cambios geométricos o estructurales dentro de una molécula; (vi) Ligasas, que catalizan la unión de dos moléculas junto con la hidrólisis de un enlace de pirofosfato en ATP. La gran mayoría de las enzimas que actúan sobre los xenobióticos pertenecen a oxidoreductasas, hidrolasas y transferasas, que se expresan en el hígado a niveles comparativamente altos que en otros órganos⁹. Sin embargo, la gran mayoría de enzimas metabolizadoras de xenobióticos se localizan intracelularmente. El retículo endoplásmico (RE) es la ubicación de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos más importantes¹⁰, como los citocromos P450, glutatión transferasas y glucuroniltransferasas.

El proceso metabólico de cualquier sustancia que entra al organismo ocurre en dos etapas: la fase I, en la que ocurren reacciones de *funcionalización*, y la fase II, donde ocurren reacciones de *conjugación*. Las reacciones que ocurren en la fase II pueden ocurrir antes o incluso sin que ocurra la fase I¹. En este trabajo el término funcionalización implica la creación de grupos funcionales o la modificación de los existentes e incluye reacciones como las de óxido-reducción (o *redox*) e hidrólisis¹¹. Los productos provenientes de las reacciones de óxido-reducción dan lugar a compuestos menos lipofílicos o más polares que el compuesto de origen. Los metabolitos resultantes son alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, aminas primarias y secundarias, hidroxilaminas, N-óxidos, sulfitos, sulfóxidos o sulfonas, por nombrar las más importantes.¹² Por otro lado, las reacciones de conjugación involucran una gran variedad de grupos funcionales que pueden ser transferidos al sustrato¹³. Una gran variedad de metabolitos resultantes de la fase I, son buenos sustratos para reacciones de conjugación con compuestos endógenos como ácido glucorónico, sulfato, metilo, acetilo, glutatión o aminoácidos. Estas reacciones convierten al compuesto en una molécula voluminosa y aún más hidrofílica que el

compuesto original lo que facilita su eliminación mediante un transporte activo del organismo por la orina o bilis¹³.

El resultado neto del metabolismo (fase I y II) es una remoción acelerada del xenobiótico y sus metabolitos del organismo. Sin embargo, las reacciones *redox* mediadas por el CYP pueden conducir a metabolitos reactivos y tóxicos.

Dentro de la contribución de enzimas en el proceso de activación de carcinógenos^b, las enzimas del CYP participan en un 66%, seguida por sulfotransferasas (SULT) 13%, aldo-ceto reductasas (AKR) 8%, N-acetiltransferasas (NAT) 7%, ciclooxygenasas (COX) 2% entre otras 4%¹². Debido a lo anterior, el estudio del citocromo P450 es clave para el entendimiento y desarrollo de estrategias que combatan el cáncer.

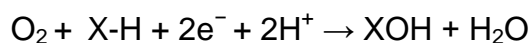
2.1.1 Citocromo P450

Las proteínas del citocromo P450 (CYP) son una superfamilia de hemoproteínas implicadas en la transformación de compuestos xenobióticos, así como en la biosíntesis y metabolismo de moléculas endógenas¹⁴. Los CYPs metabolizan alrededor del 80% de las sustancias químicas que pasan por la fase I del metabolismo¹⁵. El citocromo P450 está presente en todos los reinos de la vida. Su edad evolutiva indica que existe desde hace 3.5 billones de años, implicando que surgieron un poco después que la vida en la Tierra y un poco antes de la aparición de una atmósfera de oxígeno. A la fecha, ya se han identificado más de 2000 isoformas diferentes. Los P450s se agrupan en familias y subfamilias en función de la similitud en la secuencia del DNA que los codifica. Las familias 1, 2 y 3 están constituidas por enzimas encargadas de la biotransformación de xenobióticos, mientras que el resto de familias incluyen P450s que intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos. Son enzimas que se encuentran ancladas a membranas subcelulares por uno o dos segmentos N-terminales. El resto de la proteína se expone en el compartimento citosólico donde el centro catalítico es accesible. Principalmente, se encuentra en el retículo endoplasmático¹⁵ con algunas de sus formas encontradas en la mitocondria; se estima

^b Basado en un estudio que involucró 713 reacciones

que en hepatocitos entre el 12-15% de esta membrana está formada por citocromos P450¹⁶, sin embargo también se ha reportado su presencia en otros órganos y tejidos extrahepáticos como riñón, próstata, piel, epitelio nasal, gónadas, cerebro, pulmón, páncreas, tracto gastrointestinal entre otros ¹⁷

La reacción más común catalizada por el citocromo P450 es una reacción *monooxigenasa*, sin embargo, también pueden actuar como reductasas, oxidasas e hidropoxidasas ¹⁸. La reacción de *monooxigenasa* mediada por CYP (figura 1) involucra la inserción de un átomo de O al sustrato R-H o H, a partir de la reducción de un átomo de oxígeno molecular (O₂), por lo que la reacción general resulta en la oxidación del sustrato:



O

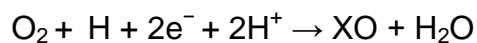


Figura 1. Reacción monooxigenasa mediada por CYP

La versatilidad metabólica de los CYPs se puede notar en la amplia variedad de reacciones que catalizan; X representa átomos de C con hibridación sp³ (alifáticos), átomos de C con hibridación sp² (aromáticos y olefínicos), átomos de C con hibridación sp (acetilenos), átomos de N provenientes de grupos amina y amida, átomos de S, así como otros átomos de Si-, P- y As.

2.1.1.1 Estructura del Citocromo P450

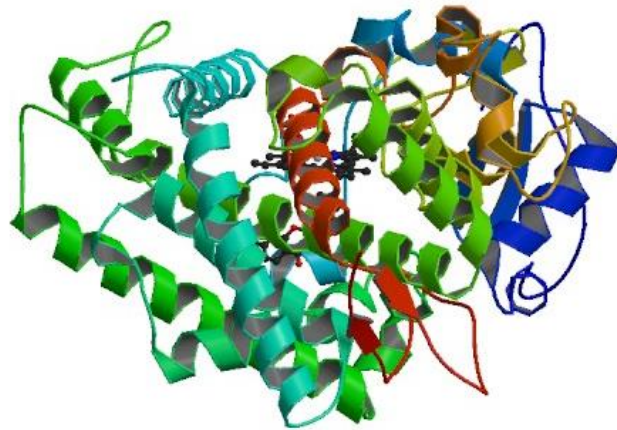


Figura 2. Citocromo P450: estructura cristalina de microsomas humano P450 1A2 en complejo con α -naftoflavona. Resolución 1.95Å.

La estructura general está constituida por α -hélices y hojas- β en la región que rodea al grupo hemo (figura 2) mientras que los sitios de unión a la membrana y reconocimiento de sustrato son los que presentan mayor variabilidad¹⁹. Los CYPs son hemoproteínas compuestas de una coenzima constante, protoporfirina IX (figura 3) y, una proteína variable en el rango de 45 a 60 kDa.²⁰

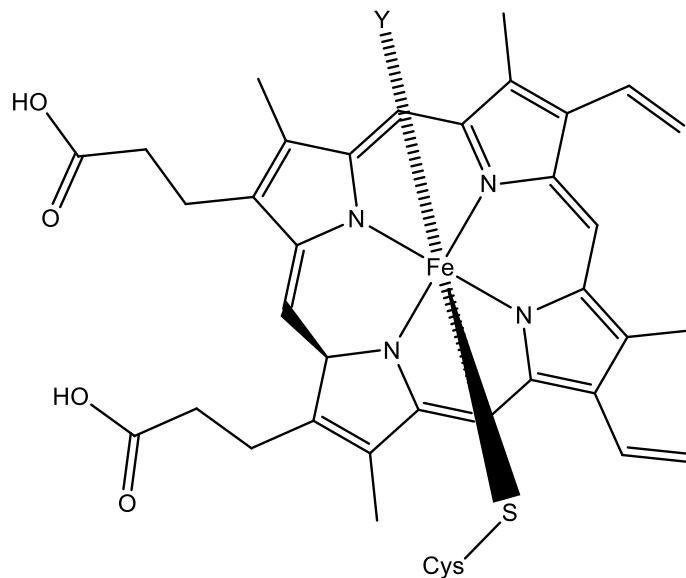


Figura 3. Grupo protoporfirina IX hexacoordinado del CYP; bajo espín ($S=1/2$); potencial de reducción 320 mV; estado de reposo $Y=OH$ o H_2O ; inhibición Y =xenobiótico hidroxilo o amino.

Los CYPs poseen un grupo prostético de hierro-protoporfirina IX que forman al grupo hemo, este es el centro catalítico de la enzima; un grupo tiol se coordina con el hierro de manera opuesta al sitio de coordinación con el oxígeno (Y en la figura 3) ²¹. Esta porfirina es común a todas las enzimas citocromo P450, así como a otras hemoproteínas y enzimas como la hemoglobina, mioglobina, catalasa y la mayoría de las peroxidasas. El catión de hierro en el grupo hemo está coordinado a los cuatro átomos de N del pirrol. Dos ligandos adicionales existen en posiciones axiales: el ligando de tiolato (donado por un residuo altamente conservado de cisteína) y el ligando Y. El enlace Fe-S es un enlace fuerte que transfiere una considerable densidad de electrones al átomo de Fe. Estas características electrónicas son indispensables para la actividad catalítica del citocromo; la formación del citocromo inactivo P420, inducido por desnaturalización de la proteína, implica el desplazamiento del ligando de tiolato. El sexto ligando (Y en la figura 3) es uno más débil, proveniente de un grupo OH de un aminoácido adyacente (por ejemplo, tirosina) o una molécula de H₂O.

2.1.1.2 Mecanismo catalítico de la citocromo P450 oxidasa

Antes de presentar las reacciones catalizadas por los CYPs, es esencial discutir su mecanismo catalítico general. Esto comienza con el estado electrónico del grupo hemo, específicamente, el centro metálico hierro que puede existir en su estado férrico (Fe^{III}) y ferroso (Fe^{II}). El hierro del grupo hemo empieza el ciclo catalítico en estado férrico y en equilibrio entre dos estados electrónicos discretos, es decir, alto y bajo espín, que son responsables de diversas propiedades del citocromo P450, específicamente, para la unión del ligando y la activación del oxígeno. En su forma de espín bajo, Fe^{III} está hexacoordinado, con el átomo de Fe coplanar con los cuatro átomos de N del pirrol, y los dos ligandos que ocupan los vértices de una bipirámide octahédrica. En su estado de espín alto, el diámetro del Fe^{III} es demasiado grande para estar coplanar con el anillo de porfirina y es, por lo tanto, pentacoordinado por la pérdida del ligando Y (figura 3). Es importante hacer notar que el potencial de reducción de la forma de bajo espín es energicamente mucho más alto (-360 a -300 mV) que el potencial de reducción de la forma de alto espín (-175 mV). El primero es, por lo tanto,

el estado de reposo (inactivo) de los CYPs. El equilibrio entre las dos formas está controlado por el ambiente celular y por la unión al ligando.

El ciclo catalítico de la monooxigenación mediada por CYP implica la reducción de oxígeno molecular, O_2 (el primer sustrato) por dos cadenas de transferencia de electrones. El ciclo catalítico del citocromo P450 en su función monooxigenasa lleva a cabo una serie de pasos que se resumen en la figura 4.

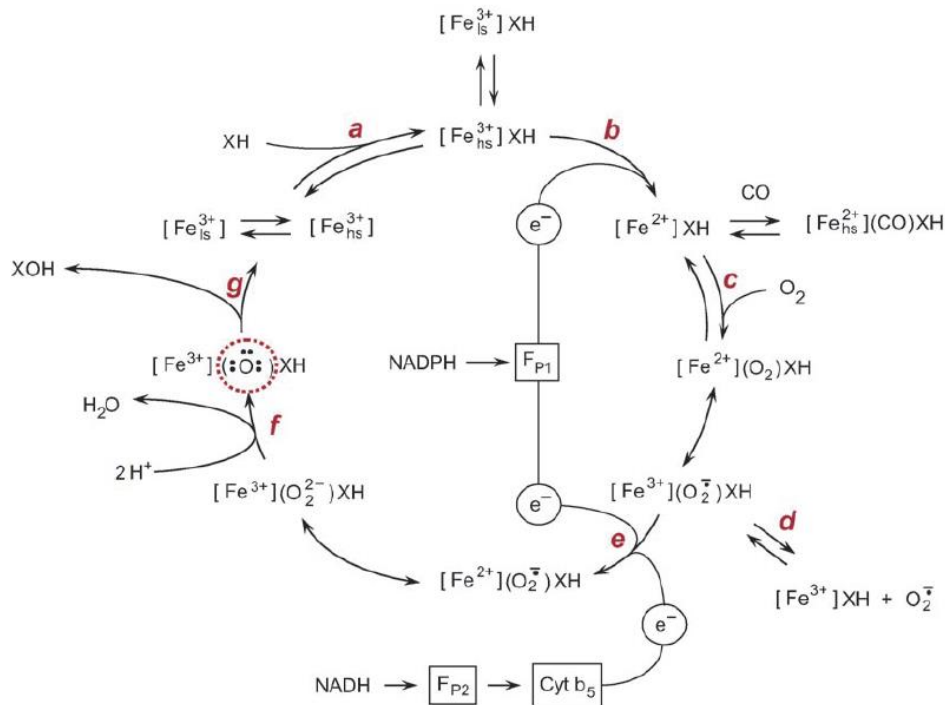


Figura 4. Ciclo catalítico de la monooxigenación mediada por CYP. Modificado de Testa y Krämer (2007)²³ XH, se refiere al sustrato; *hs* simboliza alto espín y *ls* simboliza bajo espín; F_{p1} representa a la flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa; F_{p2} representa a la flavoproteína NADH-citocromo b_5 reductasa²².

Después de la unión del sustrato en el ligando Y, ocurre un cambio en el espín de la hemoproteína a su forma de alto espín, favoreciendo la transferencia de electrones al par redox para reducir el centro metálico del estado hemo férrico a hemo ferroso **a**. Esto permite el primer paso de reducción, donde un electrón se transfiere al CYP microsomal de NADPH (potencial redox 320 mV) a partir de la flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa (potencial redox 270 mV) **b**. Como todas las demás hemoproteínas en su estado reducido, el citocromo P450 reducido tiene una alta afinidad por el oxígeno

diatómico (O_2) y el monóxido de carbono (CO); la unión del monóxido de carbono inhibe fuertemente la reacción, mientras que la unión del oxígeno molecular permite que el ciclo continúe al formar el complejo ternario oxi-ferroso **c**, el cual se reorganiza por resonancia debido a la fuerte electronegatividad de O_2 a un complejo de férrico-superóxido. Este complejo representa un punto de ramificación en el ciclo catalítico del citocromo P450. Para que se produzca la reacción de monooxigenación, el segundo electrón debe liberarse rápidamente; de lo contrario, el complejo se disocia y libera el ion radical superóxido (**reacción parásita d**). En el retículo endoplásmico, los CYPs reciben su segundo electrón ya sea a partir de NADPH o NADH reduciendo al citocromo P450 para formar las estructuras resonantes de superóxido ferroso y peróxido férrico **e**. Una reacción de monooxigenación transfiere un átomo de oxígeno activado al sustrato, lo que requiere la ruptura de la molécula de dioxígeno reducido **f**. El oxígeno remanente en el complejo CYP(monooxigenasa)-sustrato se conoce como oxeno, un átomo neutro, electrofílico con seis electrones en su capa externa; este oxeno que se transfiere al sustrato efectúa su hidroxilación **g**^{22,23}.

2.1.1.3 Clasificación de los citocromo P450

Las proteínas citocromo P450 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)²⁴. Se conocen 57 CYPs humanos clasificados en 17 familias y se han descrito 3753 genes de CYPs provenientes de mamíferos, clasificados en 18 familias. Se agrupan en la misma familia si poseen mayor a un 40% de similitud 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, las enzimas individuales deben tener al menos un 3% de diferencia con el resto de las enzimas y se les asigna un número²⁵.

El CYP familia 1 subfamilia A es una enzima con interés médico y biológico ya que es conocida particularmente por su capacidad de metabolizar compuestos xenobióticos de origen natural o sintético^{26,9}. Compuestos planares que poseen anillos heterocíclicos

aromáticos son sustratos de esta familia. Por lo tanto, las aminas heterocíclicas derivadas del proceso de cocción de la carne son también sustratos de esta familia, específicamente, sustratos de CYP1A2^{28,29}.

2.2 Aminas heterocíclicas (AHCs)

2.2.1. Formación de aminas heterocíclicas

El grupo de las aminas heterocíclicas es solo un ejemplo de compuestos a los que estamos expuestos involuntariamente que inducen los procesos de carcinogénesis bajo un estilo de vida en condiciones normales. La subclase más grande de AHCs que se encuentra en la dieta humana comprende el grupo de los aminoimidazoazaarenos (AIAs); MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP (figura 5) son ejemplos de AIAs, estos compuestos se encuentran en el músculo de la carne cocinada a niveles de partes por millón.

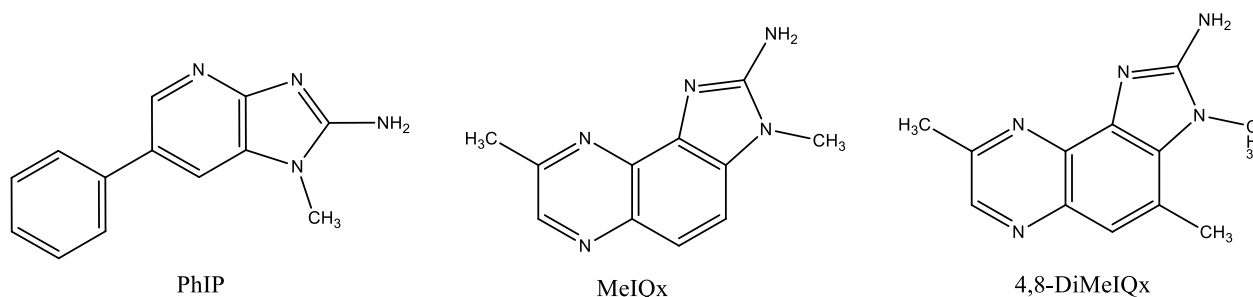


Figura 5. Aminoimidazoazaarenos (AIAs) PhIP, MeIQx y 4,8-DiMeIQx producidos en el proceso de cocción de la carne. Procarcinógenos que requieren activación mediada por la isoforma CYP1A2 a su forma electrofílica para ejercer efectos genotóxicos. PhIP: 2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-b)piridina; MeIQx 2-Amino-3,8-dimetilimidazo [4,5-f] quinoxalina; 4,8-DiMeIQx: 2-Amino-3,4,8-trimetil-3H-imidazo[4,5-f]quinoxalina.

Las AIAs se producen durante la pirólisis de creatin(in)a, aminoácidos y azúcares como está descrito por Jägerstad³⁰. Las altas temperaturas, largos tiempos de cocción, baja concentración de agua, alta concentración de azúcares y creatin(in)a promueven la formación de las aminas heterocíclicas, lo cual sugiere que las reacciones de Maillard están involucradas en la formación de las aminas heterocíclicas en su cocción.³¹ Las reacciones de Maillard, son responsables de producir el color café en los alimentos; se refiere a las reacciones entre aminas y compuestos carbonílicos, especialmente

azúcares reductores³²; después de la condensación entre que el azúcar y el aminoácido libre, el rearrreglo de Amadori y una final degradación de Strecker sucede para formar pirazinas, piridinas y aldehídos. En una reacción de condensación creatina y/o creatinina, pirazinas o piridina y aldehídos producen imidazoquinoxalinas. Las aminos MelQx, 4,8-DiMelQx. PhIP son producidas a partir de los mismos precursores bajo el esquema de la reacción de Maillard: creatin(in)a, glucosa y fenilalanina como reactantes³¹ como se muestra en la figura 6.

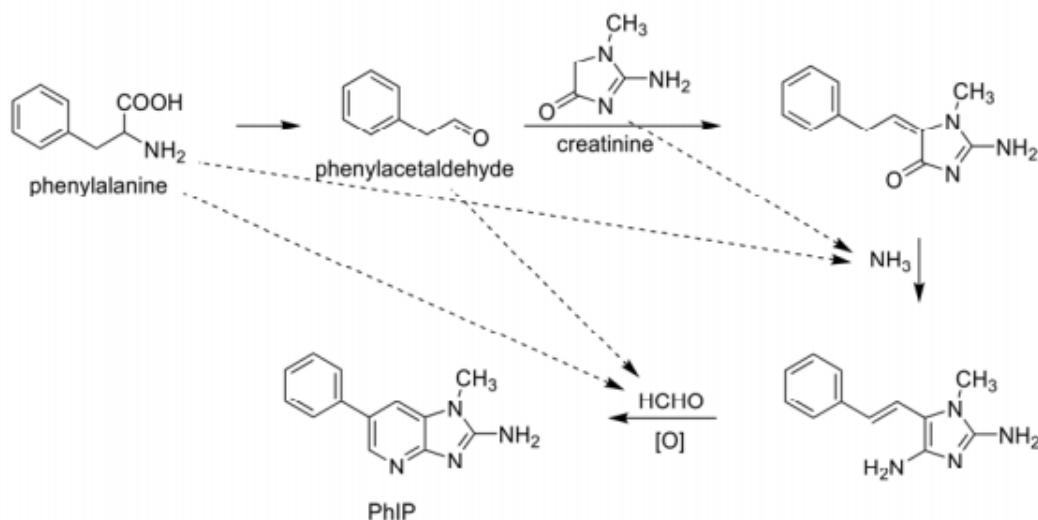


Figura 6. Reacción de Maillard que da lugar a la formación del promutágeno PhIP.

2.2.2. Aductos de AHC-DNA

Las aminos heterocíclicas, como la mayoría de otros carcinógenos, no son carcinógenos *per se* sino que necesitan ser metabolizados por una familia del grupo de enzimas del citocromo P450 a electrófilos reactivos para reaccionar con el DNA e iniciar la respuesta carcinogénica. Después de la activación metabólica, las aminos heterocíclicas forman aductos de guanina AIA-DNA, siendo el aducto en la posición C8 el mayor producto formado (figura 7). MelQx, también forma aductos como productos minoritarios en la posición N^2 de guanina⁵.

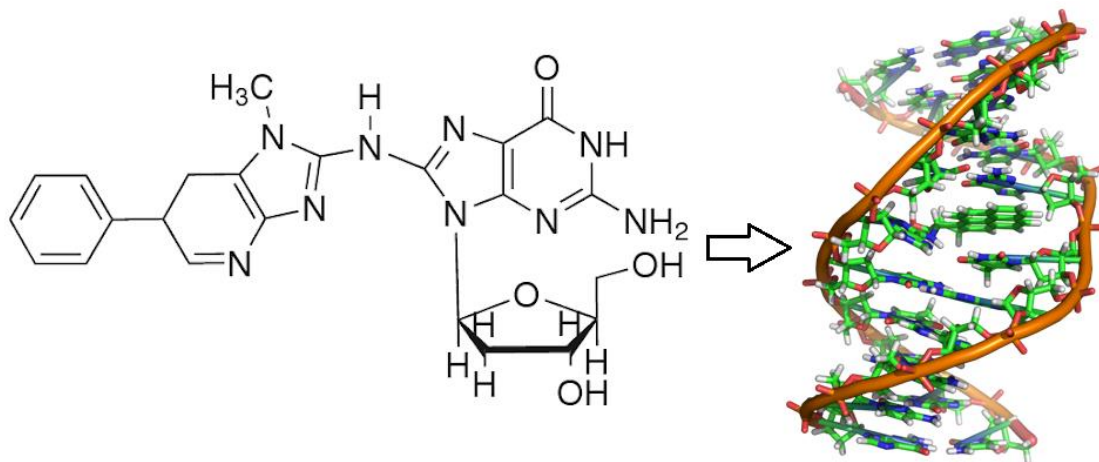


Figura 7. Aducto PhIP-DNA mayormente formado por el metabolismo de CYP1A2. N-(Deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (dG-C8-PhIP).

Desde el descubrimiento de las AHCs, diversos estudios han examinado la relación de la frecuencia y ubicación de aductos de DNA de estos compuestos con el inicio de la tumorigénesis. Estudios en animales muestran que los niveles de aductos de AIA-DNA en órganos blanco generalmente predicen la incidencia de tumores. Sin embargo, la relación de formación de aductos AIA-DNA y tumorigénesis no es una cuestión de causa y efecto. Las mutaciones específicas son críticas para la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores asociados con la carcinogénesis. Muchos de los fenotipos de las células cancerosas pueden ser el resultado de mutaciones, es decir, cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA que se acumulan a medida que progresan los tumores. Estos pueden surgir como resultado del daño en el DNA causado por agentes ambientales y/o endógenos o por la incorporación de nucleótidos no complementarios durante los procesos de síntesis del DNA. Diversos estudios han examinado que las AIAs inducen la formación de tumores por mutaciones en genes que mantienen la estabilidad genética en células normales, incluyendo p53^c, Kiras^d, Ha-ras, Apc y B-catenina⁵. Entre las mutaciones detectadas en estos genes, las mutaciones en la base de guanina ocurrieron a una mayor frecuencia, sugiriendo la participación de aductos AIA-DNA en estas alteraciones genéticas³³.

^c p53 es una proteína supresora de tumores.

^d Las proteínas Ras son un conjunto de interruptores-reguladores moleculares en la señalización celular.

A nivel de DNA existen dos tipos principales de cambios mutacionales: sustituciones de bases y adiciones o eliminaciones de bases. Las sustituciones de base son aquellas mutaciones en las que un par de bases se reemplaza por otro. Las sustituciones de base pueden dividirse en dos subtipos: transiciones y transversiones. Una transición es el reemplazo de una base por otra base de la misma categoría química, es decir, purina por purina o pirimidina por pirimidina: de A a G o de G a A y, de C a T o de T a C. Una transversión es lo opuesto, el reemplazo de una base de una categoría química por una base de la otra, pirimidina reemplazada por purina y viceversa. Las mutaciones de adición o eliminación son en realidad de pares de nucleótidos; sin embargo, la convención es llamarlos adiciones o eliminaciones de pares de bases. Los mutágenos actúan a través de al menos tres mecanismos diferentes para inducir mutaciones: pueden reemplazar una base en el DNA, alterar una base para que se empareje mal con otra base o dañar una base para que no pueda emparejarse con ninguna base en condiciones normales.

El mecanismo molecular por el que los AIAs inducen mutaciones se da principalmente por eliminación de pares de bases. Se ha propuesto que se da un cambio en el marco de lectura (mutación *frameshift*) en la región *hotspot* CGCGCGCG iniciado por el DNA-AIA ubicado en la posición C8 de la guanina. Si la guanina con el aducto puede incorporar correctamente la base complementaria citosina durante el proceso de replicación, el aducto le dificulta el paso a la DNA polimerasa durante la replicación³⁴, aumentando la probabilidad de un deslizamiento de hebra dentro de la secuencia repetida, lo que conlleva a la formación de un nuevo *primer* de termino y la extensión de este *primer* produce la eliminación de la secuencia *hotspot*. El emparejamiento incorrecto de nucleótidos de cadena deslizada puede generar una variación en la expresión génica. La base con el aducto desestabiliza los puentes de hidrógeno de la cadena, facilitando el emparejamiento de bases ilegítimas en las regiones del DNA tándem durante la replicación. Lo anterior, junto con sistemas inadecuados de reparación de DNA, puede producir deleciones o inserciones de unidades de repetición³⁵.

Los datos de un creciente número de investigaciones apoyan la noción que los aductos AIA-DNA juegan un rol fundamental en la susceptibilidad del inicio de carcinogénesis causado por AIAs^{30,36,5,} por ende, la activación metabólica que conduce a la formación de aductos de DNA es determinante de la mutagenicidad y carcinogenicidad de estos compuestos. La presencia del anillo imidazol y el grupo 2-amino en la molécula parece ser importante para la mutagenicidad de los compuestos^{30,37}.

2.2.3. Metabolismo de las aminoimidoazoarenos (AIAs)

Entre los AHCs, MeIQx es uno de los más abundantes encontrados en los alimentos cocinados, con un nivel de exposición humana estimado de hasta 2,6 µg de MeIQx por persona por día, seguido por PhIP y 4,8-DiMeIQx³⁸. Diversas investigaciones sobre el metabolismo de MeIQx investigado en hepatocitos humanos demostraron que MeIQx se transforma activamente en varios metabolitos dependiendo de las enzimas de fase I y II que los transformen en productos de desintoxicación o productos potencialmente reactivos a través de la vía de bioactivación³⁹ (figura 8). La literatura ha identificado la formación del ácido 2-amino-3-metilimidazo [4,5-f] quinoxalina-8-carboxílico (IQx-8-COOH) como una vía principal de detoxificación catalizada por dos oxidaciones sucesivas de CYP1A2 con 2-amino-8-(hidroximetil)-3-metilimidazo[4,5-f] quinoxalina (8-CH₂-OH-IQx) como un intermediario (figura 8).⁴⁰ Los metabolitos mutagénicos y carcinogénicos se forman a través de reacciones de N-oxidación que son catalizados por CYP1A2 en el hígado humano³⁸. La activación adicional de los metabolitos de N-hidroxilamina (HONH-MeIQx) se produce por esterificaciones catalizadas por N-acetiltransferasas (NAT) y sulfotransferasas (SULT) que conducen a la formación de varios conjugados potenciales identificados como Ester-O-NH-MeIQx mostrados en la figura 8. Estos conjugados son capaces de formar iones reactivos de nitrenio capaces de unirse al DNA en la posición N2 y C8 de guanina⁴¹. Los metabolitos HONH-MeIQx reactivos pueden también ser conjugado por UGT formando N2 glucurono-conjugados (HON-MeIQx-N2-Gl) capaz de ser eliminado. La desintoxicación también se describe a través de la formación de MeIQx-N2-SO₃H y MeIQx-N2-Gl (figura 8). N-desmetil-7 oxo-MeIQx y 7-oxo-MeIQx son probablemente

formados por la reacción catalizada por la xantina deshidrogenasa y el producto es menos tóxico que el compuesto principal. CYP1A2 cataliza reacciones involucradas tanto en el metabolismo de las vías de activación y desintoxicación de este procarcinógeno MeIQx como se resume a continuación en la figura 8.

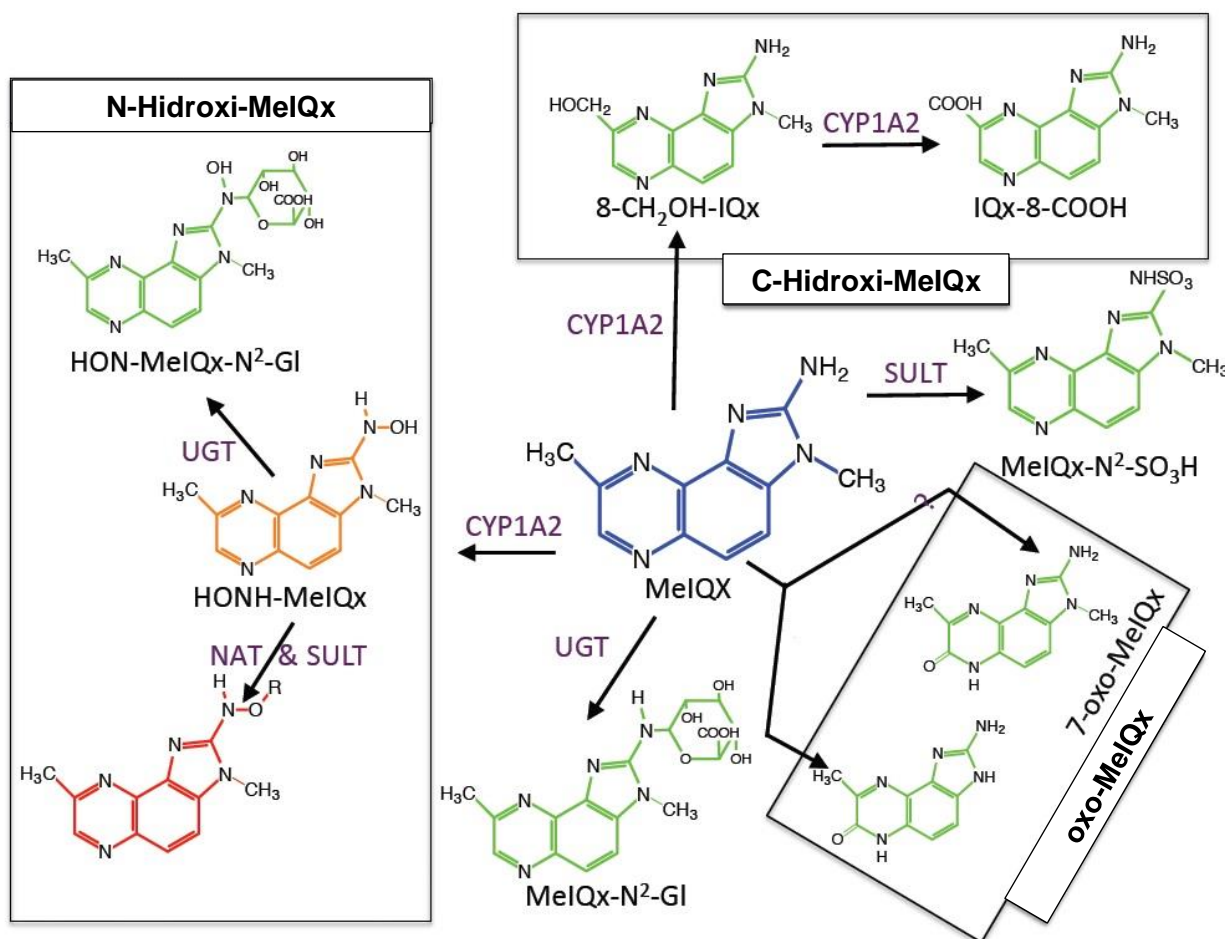


Figura 8. Vías metabólicas de MeIQx³⁹. El metabolismo de MeIQx está compuesto de metabolitos involucrados en la vía de detoxificación (en verde) y de compuestos de la vía de bioactivación (en naranja y rojo). Nombre químico completo: MeIQx, 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina; HONH-MeIQx, 2-(hidroxiamino)-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina; MeIQx-N²-SO₃H, ácido N²-(3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalin-2-yl)sulfámico; MeIQx-N²-Gl, N²-(-1-glucosiduronil)-2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina; 8-CH₂OHIQx, 2-amino-8-(hidroximetil)-3-metilimidazo[4,5-f]quinoxalina; IQx-8-COOH, 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinoxalina-8-carboxílico; HON-MeIQx-N²-Gl, N²-(-1-glucosiduronil)-2-(hidroxiamino)-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina; 7-oxo MeIQx, 2-amino-3,8-dimetil-6-hidro-7H-imidazo[4,5-f]quinoxalin-7-ona; N-desmetil-7-oxo-MeIQx, 2-amino-6-hidro-8-metil-7Himidazo[4,5-f]quinoxalin-7-ona.

Se ha reportado que estos compuestos además de ser sustratos del citocromo P450 también pueden fungir como inductores de la biosíntesis de esta enzima a través de la vía canónica del receptor de hidrocarburos arilo (AhR)⁴². 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) ⁴³.

2.3 Flavonoides

Los alimentos contienen diversos tipos de xenobióticos que pueden influenciar la formación de mutágenos y promover las condiciones para la aparición de tumores. No obstante, también contienen diversas sustancias con la capacidad de contraponerse a los efectos de los mutágenos. Una de estas sustancias son los flavonoides.

Los flavonoides son moléculas de origen natural producidas en prácticamente todo el reino vegetal. Son un tipo de polifenoles derivados de los metabolitos secundarios de las plantas y representan el grupo más común y ampliamente distribuido de compuestos fenólicos vegetales, su producción se genera particularmente en las células vegetales fotosintetizadoras. Los flavonoides son los principales responsables de darles color y sabor a frutas, verduras y semillas, además de ser parte fundamental en la prevención de la oxidación de las grasas y protección de vitaminas y enzimas en las mismas. El consumo de frutas y verduras, por ende de flavonoides, ha sido una parte integral de la dieta humana. Se calcula que la ingesta de flavonoides en la dieta occidental oscila entre 23 mg y 1 g por día.⁴⁴

Se ha puesto especial énfasis en este grupo de compuestos porque se han reportado múltiples beneficios relacionados con su consumo, entre ellos están su actividad antioxidante, antitrombótica, antidiabética, anticancerígena y vasodilatadora⁴⁵. Estudios epidemiológicos también han encontrado relación entre su consumo en la dieta y su protección ante enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.⁴⁶

2.3.1 Química y metabolismo de flavonoides

La estructura química de los flavonoides presenta en un esqueleto de 15 carbonos formando dos anillos bencénicos (A y B como se muestra en la Figura 9) unidos a través de un anillo de pireno heterocíclico (C). Se pueden dividir en una

variedad de clases tales como flavonas, flavonoles, flavononas, entre otros⁴⁷. Actualmente se han identificado más de 8000 flavonoides. Las diferentes clases de flavonoides varían en el nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B. Los flavonoides se presentan como agliconas, glucósidos y derivados metilados, siendo la estructura básica de los flavonoides la aglicona⁴⁸.

La naturaleza química de los flavonoides depende de su clase estructural, grado de hidroxilación, sustituciones metoxi, conjugaciones de glucósidos entre los anillos A, B y C,⁴⁹ y grado de polimerización. Los grupos funcionales de hidroxilo en los flavonoides median sus efectos antioxidantes al eliminar los radicales libres⁵⁰ y/o al quelar los iones metálicos, mientras que la variación del número y la posición de los sustituyentes hidroxilo y/o metoxilo en la molécula indican la selectividad y afinidad para inhibir enzimas de la familia CYP1⁵¹; lo cual, proyecta importantes implicaciones para la prevención del cáncer, así como otros efectos farmacológicos y tóxicos⁵².

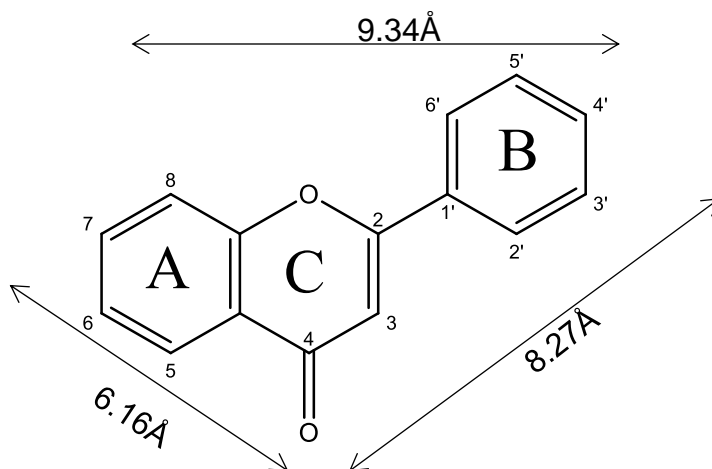


Figura 9. Esqueleto básico de un flavonoide aglicona. Grupos OH (hidroxilo) o OCH₃ (metoxilo) sustituidos en los C de los anillos A, B y C forman la gran variedad de flavonoides.

La manera en que los flavonoides son absorbidos en la dieta depende de su forma química, si se encuentran en forma de glucósido o de aglicona. Las agliconas pueden ser fácilmente absorbidas por el intestino delgado, mientras que los flavonoides

glucósidos deben ser hidrolizados a su forma de aglicona primero. La mayoría de los flavonoides están presentes en las plantas unidos a azúcares como β -glucósidos, por lo que no son absorbibles de forma directa. Los flavonoides glucósidos son transportados al intestino delgado por la enzima SGLT1 o son hidrolizados por la lactasa, una β -glucosidasa ubicada en borde de la membrana del intestino delgado. Los glucósidos que no sean sustratos de estas enzimas son transportados hacia el colón, y gracias a los microorganismos presentes, son hidrolizados a su forma libre⁴⁹. Seguida su absorción, los flavonoides son metabolizados en el hígado por enzimas de fase I a compuestos fenólicos más pequeños y/o conjugados por glucuronidación, sulfatación y metilación⁴⁶. La baja solubilidad en agua de los flavonoides aglicona junto con su corto tiempo de residencia en el intestino y su corta absorción evita que los humanos sufran de efectos tóxicos agudos por el consumo de flavonoides.

2.3.2. Interacción entre flavonoides y CYPs

Una de las funciones biológicas ampliamente investigadas es su contribución en la prevención del cáncer^{53,54,47}. A partir de estos estudios se han conocido algunos de los mecanismos en la que estos compuestos actúan previniendo los eventos carcinogénicos, entre los cuales se encuentran la capacidad de los grupos hidroxilo en los flavonoides de formar complejos con radicales libres⁵⁵, la afinidad de los flavonoides de interactuar con las enzimas que activan o detoxifican carcinógenos o de inhibir la acción de estas enzimas⁵⁶. Los mecanismos por los cuales los flavonoides interactúan con los CYPs se han descrito en al menos tres formas: (i) induciendo la biosíntesis de algunos CYPs; (ii) siendo metabolizados por ciertas isoformas de los CYPs⁵⁷ y (iii) modulando su actividad enzimática, ya sea inhibiendo o estimulando a los CYPs⁵⁸. (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 del CYP a través de la unión al receptor de hidrocarburo de arilo (AhR), un factor de transcripción activado por ligando⁵⁶. 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^{59,60}. (ii) Los flavonoides pueden ser metabolizados por los CYPs, es decir son sustratos de la enzima para ejercer su conversión química y dar lugar a un producto más hidrofílico. Los flavonoides son hidroxilados por un mecanismo dependiente principalmente del CYP1A^{61,62} y/o O-desmetilados por CYP1A y CYP1B. 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'-pentahidroxi-flavona) por un mecanismo dependiente principalmente del CYP1A^{61,62}. (iii) Los flavonoides son capaces de modular la actividad de los CYPs potenciando y/o inhibiendo la actividad de las enzimas. Por ejemplo, la 7,8-benzoflavona actúa potenciando la actividad del CYP3A4, mientras que inhibe la actividad catalítica del CYP1A1 y CYP1A2^{63,64}.

2.3.3 Flavonoides como inhibidores del CYP

El estudio de las interacciones de los flavonoides con los CYPs, como su capacidad para inhibir la actividad de estos puede ser utilizado como una herramienta importante para prevenir etapas iniciales de carcinogénesis.

Un inhibidor enzimático es una molécula que se une a la enzima y reduce su actividad, mientras que los sustratos de una enzima son convertidos por la acción de ésta a productos en el ciclo catalítico de la enzima⁶⁵. Así, la unión de un inhibidor puede evitar la entrada de un sustrato al sitio activo de la enzima y/o impedirle a la enzima catalizar su reacción. Los inhibidores enzimáticos pueden ser reversibles o irreversibles. Los inhibidores irreversibles generalmente modifican a la enzima químicamente, por ejemplo, a través de la formación de un enlace covalente. Estos inhibidores modifican residuos de aminoácidos necesarios para la actividad enzimática, bloqueando su actividad permanentemente²⁴. En cambio, los inhibidores reversibles se unen de manera no covalente, con interacciones débiles como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos, entre otras. Existen cuatro tipos de inhibidores reversibles y se clasifican de acuerdo al efecto que presenta el inhibidor al variar la concentración del sustrato de la enzima como (i) competitivos, (ii) acompetitivos, (iii y iv) mixtos y no competitivos:

1. Inhibidores competitivos, son aquellos que compiten directamente con el sustrato normal por el sitio de unión al sustrato de una enzima.
2. 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.
3. Inhibidores mixtos y no competitivos, se unen a un sitio distinto al catalítico y de este modo pueden unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato en un sitio distinto al catalítico ⁶⁶.

La potencia inhibitoria y la selectividad de los flavonoides hacia los miembros de la subfamilia del CYP1 están fuertemente asociadas con su estructura. Una conformación molecular plana es una característica indispensable para que los flavonoides ejerzan su actividad inhibitoria ⁶⁷, así como es crucial la presencia del grupo oxo en la posición 4 del anillo C. Las características estructurales que definen afinidad hacia las isoformas de la subfamilia CYP1 CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, se han ido derivando a partir de correlaciones estructura-bioactividad⁵¹. El tamaño de los sitios activos de los citocromo P450 son congruentes con la selectividad del sustrato⁶⁸. El esqueleto de los inhibidores selectivos a CYP1A1 tiene una forma de tira larga con 12.3 Å de longitud y 4.6 Å de ancho, lo que refleja una cavidad estrecha y larga. Mientras que el esqueleto de selectivo a CYP1A2 es un triángulo con longitudes laterales de 9.3 Å, 8.7 Å y 7.2 Å ⁶⁹, respectivamente, lo que sugiere una cavidad estrecha y compacta. Se ha reportado que la presencia de grupos hidroxilo en el C5 del anillo A de la flavona (figura 9) resulta en una inhibición aumentada de CYP1A2 ⁶⁷, en tanto, una sustitución con un grupo hidroxilo en las posiciones C3 y C5 contribuye a la eficiencia inhibitoria hacia los miembros de CYP1^{57,70}. Además, como entre mayor sea el número de sustituyentes hidroxilo en la molécula su hidrofobicidad disminuye, haciendo difícil el paso del flavonoide a las membranas biológicas en donde la catálisis se lleva a cabo.

Tomando en cuenta lo anterior y un estudio previo en el que se midió la potencia de 10 flavonoides, que variaban en grado y número de hidroxilos para inhibir la actividad de CYP1A1 se decidió estudiar la actividad inhibitoria ante CYP1A2 y su posterior efecto antimutagénico de la flavona, 3-hidroxi-flavona y 5-hidroxi-flavona. Las estructuras

mostradas en la figura 10 tienen forma triangular, tamaño (figura 9) e hidrofobicidad que les permite entrar al sitio activo de CYP1A2:

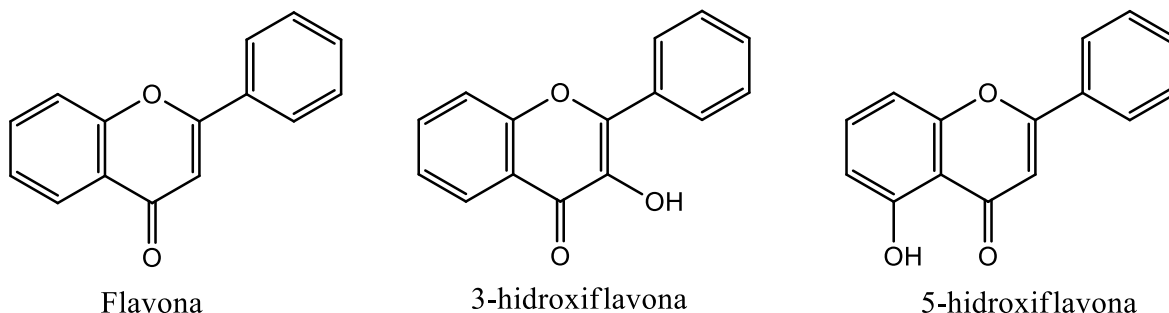


Figura 10. Estructura de la flavona, 3-hidroxi flavona y 5-hidroxi flavona. 3-HF está sustituido por un grupo hidroxilo en C3 en el anillo C y 5HF en C5 en el anillo A.

HIPÓTESIS

Si los flavonoides son capaces de inhibir a la enzima CYP1A2, se podrá inhibir la activación metabólica de los promutágenos previniendo el proceso de mutagénesis.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimutagénico de los flavonoides, flavona, 3-hidroxi flavona, 5-hidroxi flavona, frente a las aminas heterocíclicas producidas en el proceso de cocción de la carne, 2-Amino-3,8-dimetilimidazo [4,5-f] quinoxalina (MeIQx), 2-Amino-3,4,8-trimetil-3H-imidazo[4,5-f]quinoxalina (4,8-DiMeIQx), 2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-b)piridina (PhIP).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar a qué flavonoide es más sensible la isoforma CYP1A2 a partir de ensayos de inhibición enzimática.
2. Determinar el efecto antimutagénico del flavonoide más potente resultante de los ensayos de inhibición mediante la prueba de Ames.
3. Determinar si el efecto es dependiente de la concentración de flavonoide mediante una curva concentración-efecto.

Capítulo 3

3 Metodología experimental

Todos los compuestos químicos se obtuvieron de fuentes comerciales. 3-hidroxiavona, 5-hidroxiavona y avona de Sigma-Aldrich; PhIP, 4,8-DiMeIQx se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology y MeIQx de US Biological Lifesciences. Los reactivos fueron usados sin algún otro método de purificación. Se utilizó Fracción S9 de hígado de rata tratadas con fenobarbital y β -naftoflavona así como están descritas por Escobar-García⁷¹ Se partió de la fracción S9 (ver anexo I) para la obtención de microsomas; la fracción S9 se centrifugó a 100 000 g por 60 minutos a 4°C. El botón resultante se homogenizó con una solución de fosfatos 0.1 M a pH 7.4 y sacarosa 0.25 M y se centrifugó a 100 000g por 60 min a 4°C. El botón resultante se resuspendió en el amortiguador de fosfatos 0.1 M, EDTA 1mM, ditiotretol 0.1 mM y glicerol 20% v/v.⁷² La fracción microsomal se distribuyó en alícuotas que se almacenaron a -80°C. La fracción S9 se utilizó para los ensayos de antimutagenicidad y la fracción microsomal para los ensayos de actividad enzimática.

3.1 Determinación de la actividad enzimática

3.1.1. Determinación de la concentración de proteína microsomal

La cuantificación de proteína total en microsomas de rata utilizado para los ensayos de actividad enzimática, se determinó por el método de Bradford con el kit *Quick Start*TM

Bradford Protein Assay de Bio Rad^e. Se realizó una curva estándar por triplicado de albúmina sérica bovina (BSA) de 0.1-0.5 mg BSA cada una; el rango lineal de BSA para el ensayo es de 1.25–10 µg/ml. Previo a la determinación de proteína total en microsomas, la muestra se diluyó 1:50 y 1:100; para cada dilución de proteína microsomal, el ensayo se efectuó por triplicado, el resultado es el promedio de proteína total cuantificada en cada dilución. La determinación de proteína microsomal por el método de Bradford fue de 14.02 mg/mL.

3.1.2. Ensayo de actividad enzimática

La actividad microsomal de MROD (metoxirresorufina) se midió espectrofotométricamente por monitoreo de la formación de resorufina de acuerdo con el método de Burke⁷³ con algunas modificaciones: longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Para la medición de la actividad enzimática se utilizó el aparato Synergy H4 Hybrid Reader de BioTek.

La reacción enzimática se llevó a cabo en placas de 96 pozos con un amortiguador de de tris-base 50 mM y MgCl₂ 25 mM a pH 7.6, y 12.5 µM de sustrato metoxirresorufina (MROD) disuelto en 5 µL DMSO, 150 µg de proteína microsomal disuelto en amortiguador pH 7.6^f y las concentraciones crecientes respectivas de inhibidor flavona, 3-hidroxiavona, 5-hidroxiavona disueltos en 5 µL de DMSO^g. La mezcla se incubó por 3 min a 37°C. Posteriormente, se comenzó la reacción enzimática al adicionar 40 µL de una solución 2.8 mM NADPH (0.5 mM). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 200 µL. La formación del producto se evaluó durante 15 min, a 37°C, registrando lecturas cada 20 s. Las actividades catalíticas se calcularon a partir de una curva estándar de resorufina a concentraciones de 0, 5, 10, 25, 100, 250 y 500 pmoles/mL.

Las determinaciones de actividad enzimática para cada concentración de inhibidor se realizaron por triplicado, cada punto muestra el promedio de tres experimentos

^e Manual completo: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>. Consultado el día 29/10/18.

^g Concentración final de DMSO en el ensayo 5 % v/v

independientes con su desviación estándar. Se reportaron los valores de IC₅₀ relativos, esto es, la concentración de inhibidor necesario para inhibir la actividad enzimática a la mitad⁷⁴; un método común para definir el 50% de la respuesta es usar un modelo matemático que incluya un parámetro que lo defina directamente. El modelo logístico de 4 parámetros (4PL) es un ejemplo de este tipo de modelo. El modelo 4PL se expresa como,

$$Y = \frac{a - d}{1 + (X/IC_{50})^b} + d$$

Donde Y es la respuesta y X es la concentración. El mínimo de la curva es a y el máximo de la curva es d . La pendiente de la porción lineal de la curva está descrita por b . CI_{50} es la concentración correspondiente a la respuesta que se encuentra a la mitad entre a y d . Se determina la CI_{50} relativa dado que es relativo al máximo de respuesta alcanzado por un compuesto que tiene una curva dosis-respuesta completa.

Los resultados de actividad se expresan en porcentaje respecto a la actividad total de la enzima sin inhibidor. Mediante el análisis de cuatro parámetros (4PL) obtenido a través de GraphPad Prism se obtuvieron los valores CI_{50} de la 3-hidroxi flavona, 5-hidroxi flavona y flavona.

3.2 Ensayo de mutagenicidad

3.2.1. Verificación de marcadores genotípicos

Previo al ensayo, se verifica que la cepa TA98 *Salmonella typhimurium* conserve los 4 marcadores genotípicos con los que se construyó genéticamente y la frecuencia espontánea.

Se siembra en una caja petri con medio sólido Nutrient Broth suplementada con ampicilina (25 µg/mL) una muestra de *S. typhimurium* TA98 conservada a -80 °C, y se incuba durante 72 horas a 37 °C. Después de este tiempo, se seleccionan 5 colonias

aisladas y cada una es sembrada en un tubo con 5 mL de caldo nutritivo (Nutrient Broth No. 2 OXOID) líquido suplementado con ampicilina (25 µg/mL) incubado a 37°C durante con agitación constante de 150 rpm durante 16 horas. Se identifican los cultivos bacterianos del 1 al 5 y se procede a verificar 4 marcadores genéticos: mutación *hisD3052*, plásmido pKM101, marcador *rfa*, marcador *uvrB* y la frecuencia espontánea de la cepa.

Para verificar la mutación *hisD3052* (*His*-), se inoculan las 5 colonias seleccionadas en dos cajas Petri que contiene medio mínimo de Voguel-Bonner. Una de las cajas es suplementada con 320 µL de una solución de Histidina 0.1 M/ Biotina 0.5 mM. Las bacterias con la mutación *hisD3052* (*His*-) crecen únicamente cuando el medio está suplementado con histidina; para verificar la presencia del plásmido pKM101, se inoculan las 5 colonias seleccionadas en dos cajas Petri que contiene medio NB, una de ellas suplementada con ampicilina (25 µg/mL); el plásmido *pKM101* le confiere resistencia a la ampicilina, por lo que las bacterias deberán crecer en ambas cajas. El defecto en la membrana celular que le confiere el marcador *rfa* se comprueba a través de la sensibilidad ante el cristal violeta; en una caja Petri con medio NB se coloca una línea tomada de una solución de cristal violeta al 0.1% m/v en etanol al 70% que cruce la caja, una vez seca, las 5 colonias seleccionadas se siembran en líneas perpendiculares. El marcador *rfa* está presente si se observa la inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del cristal violeta. El marcador *uvrB* le confiere sensibilidad a la luz ultravioleta y es medido a través de irradiar luz a 280 nm a diferentes intervalos de tiempo; con un aplicador de madera se siembra una línea recta de cada cultivo en una caja Petri con medio NB, se cubra con papel aluminio una sección perpendicular a las líneas de cultivo y posteriormente, a una distancia de 20 cm, la caja es irradiada a 280nm durante 0, 15, 30 45 y 60 segundos. La presencia del marcador *uvrB* se observa con una creciente inhibición bacteriana a mayor tiempo de exposición a la luz UV. Finalmente, la frecuencia espontánea se mide por conteo de colonias revertantes en un medio suplementado con Histidina 1 mM/Biotina 0.5 mM; para esto, 100 µL de cultivo bacteriano se añaden a un tubo con 2 mL de agar de superficie suplementado con histidina/biotina a 45 °C. Se homogeniza agitando suavemente y la mezcla es vertida en una caja de medio mínimo Voguel-Bonner. Las

cajas se incuban a 37 °C durante 48 horas y se selecciona el cultivo que presente las mejores respuestas en los marcadores, y la frecuencia espontánea para realizar el ensayo de Ames.

3.2.2. Ensayo de mutagenicidad - Prueba de Ames

En condiciones de esterilidad, se siembra un cultivo con 10 mL de caldo nutritivo (No.2 OXOID) líquido con 25 µg/mL de ampicilina adicionados a partir de una solución de 10 mg/mL de la sal sódica de ampicilina disueltos en agua; el cultivo se deja a una agitación constante de 150 rpm durante 16 h a 37 °C en.

En un tubo estéril Eppendorf de 2 mL, se colocó una alícuota de 100 µL del cultivo bacteriano, 500 µL de S9 preparado (10% de fracción S9, 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 4 mM NADP, 5 mM de glucosa-6-fosfato), 10 µL de una solución en DMSO de 5-HF, 3-HF y flavona y 10 µL de una solución en DMSO de MeIQx, 4,8- DiMeIQx y PhIP. El volumen final de los tratamientos fue de 1 mL completado con amortiguador de fosfatos a pH 6.5. Las concentraciones finales de flavonoides 5-HF, 3-HF y flavona en preincubación fueron de 0.2 µM, 0.4 µM, 0.6 µM, 0.8 µM y 1.0 µM, mientras que para los promutágenos PhIP, MeIQx, y 4,8- DiMeIQx la concentración final en preincubación fue de 1.6 µM, 0.05 µM y 0.04 µM.

Como control positivo se utilizaron 5 mg de hoja santa alicuotados en 10 µL a partir de una solución (extracto etanólico) de 2.94 g/mL. Esta mezcla se preincubó a 37°C durante 20 min con 150 rpm de agitación; la mezcla se vierte en tubos que contienen 2 mL de agar de superficie, se agitó suavemente y se viertió la nueva mezcla en cajas Petri con medio mínimo suplementadas con Histidina 0.1 mM/Biotina 0.5 mM e incubadas a 37 °C durante 48 h. Se verificó en cada caja la ausencia de toxicidad en la cepa a través de la observación del crecimiento de fondo con el microscopio óptico a 10x. Posteriormente, las colonias revertantes se contaron con el contador automático AccuCount 1000 de BioLogics.

La inhibición de la mutagenicidad se obtuvo a partir de la siguiente expresión matemática,

$$\% I = \left(1 - \frac{b}{a}\right) * 100$$

Donde **b** representa el número de colonias revertantes a una concentración dada de inhibidor (flavonoide) y donde **a** es el número de colonias revertantes inducidas por el mutágeno sin inhibidor. La incertidumbre de la inhibición de la mutagenicidad se obtuvo siguiendo las reglas de la propagación del error gaussiano.

Capítulo 4

4 Resultados y Discusión

4.1 Inhibición de la actividad enzimática

En esta sección se muestran los resultados de inhibición de la flavona, 3-hidroxiflavona y 5-hidroxiflavona como inhibidores de la isoforma CYP1A2 utilizando microsomas de hígado de ratas previamente tratadas con fenobarbital y β -naftoflavona. El primer flavonoide sin sustituyentes, el segundo con un hidroxilo en el anillo C y el tercero con un hidroxilo en el anillo B. A partir de estos resultados se utilizó un modelo de 4 parámetros para definir la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de cada uno de los flavonoides y determinar a través de este parámetro cuantitativo el flavonoide al cual la isoforma CYP1A2 es más sensible.

En la figura 11 se muestra la actividad enzimática del CYP1A2 con microsomas de rata en presencia de diferentes concentraciones de flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona en concentraciones crecientes que van de 0.0001 μ M a 10.0 μ M.

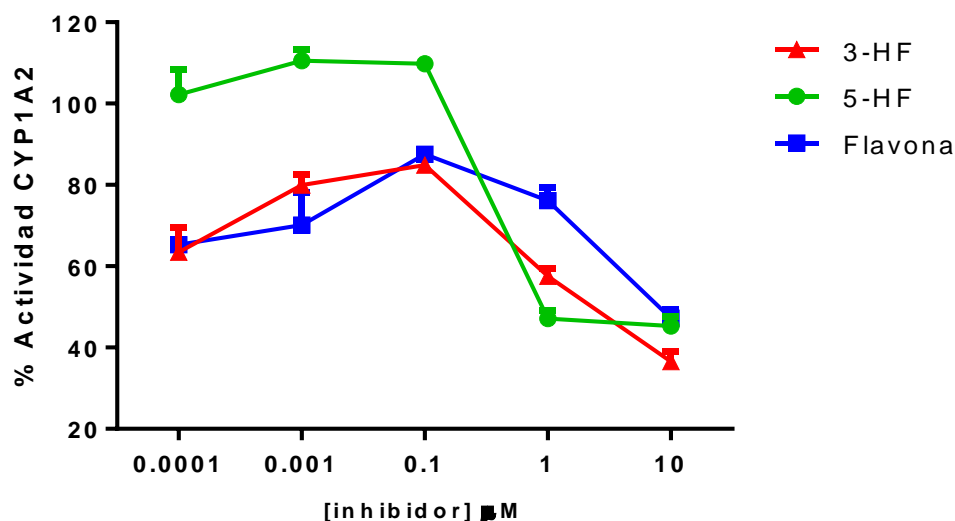


Figura 11. Porcentaje de actividad de CYP1A2 a diferentes concentraciones de inhibidor.

En el primer ensayo se utilizó un rango amplio de concentraciones de inhibidor, igualmente espaciadas con escala logarítmica para localizar el intervalo de concentraciones en donde se observa la respuesta de inhibición de la actividad de CYP1A2; con este intervalo se podrá hacer un ajuste no lineal de la curva y encontrar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de cada uno de los flavonoides. A partir de la figura 11 se puede observar que la enzima CYP1A2 presenta una mayor sensibilidad hacia la 5-hidroxiavona, mientras que la flavona y la 3-hidroxiavona presentaron un comportamiento similar entre ellos. Para el ensayo de determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), se decidió probar un rango de concentraciones de 0.1 a 10 μM para la 3-hidroxiavona, 0.5 a 10 μM para la flavona, y 0.1 a 0.5 μM para la 5-hidroxiavona en intervalos equidistantes incluyendo 6 puntos de concentración. Los resultados de este ensayo se muestran a continuación en la figura 12.

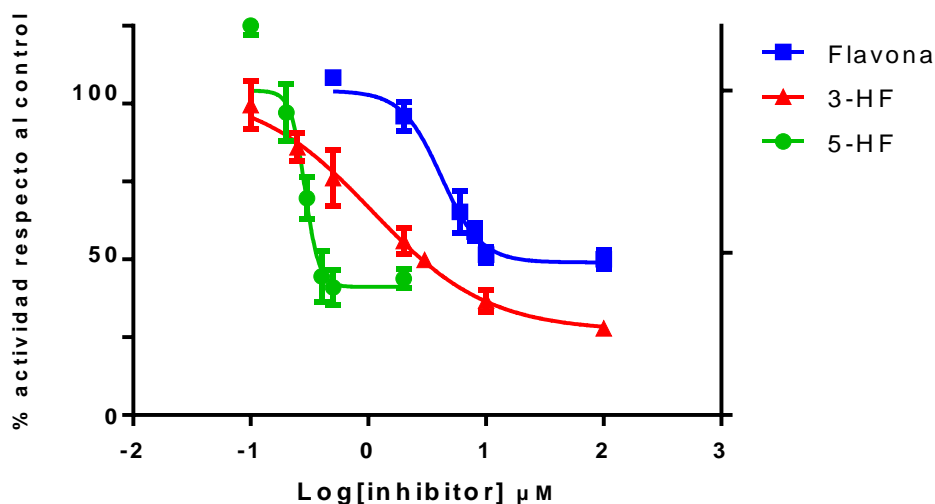


Figura 12. Curva dosis-respuesta de cuatro parámetros 4PL log[inhibidor] vs. % actividad respecto al control con un modelo de pendiente variable que permite determinar la concentración que provoca una respuesta a la mitad entre la máxima respuesta y la máxima respuesta inhibitoria (IC₅₀).

Los flavonoides evaluados son inhibidores parciales de la enzima CYP1A2. Se observa en la figura 12 que la respuesta del flavonoide 5-hidroxiavona alcanza a inhibir la actividad de la enzima a la mitad a una concentración menor respecto a la 3-hidroxiavona y flavona. A partir de la figura 12 se obtuvieron la IC₅₀ de cada flavonoide puesto que considera la respuesta de inhibición como función del logaritmo de la concentración tal como el modelo de 4 parámetros indica.

4.1.1 Concentración inhibitoria media (IC₅₀) de la flavona, 3-hidroxiavona y 5-hidroxiavona sobre la actividad del CYP1A2

En la Tabla 1 se resumen los valores de concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática (IC₅₀) de cada flavonoide evaluado.

Tabla 1. IC₅₀ de los flavonoides probados sobre CYP1A2 de rata.

Flavonoide (inhibidor)	IC ₅₀ µM, (95% CI)	Log ₁₀ IC ₅₀ (µM) ± Log SD
5-hidroxiavona	0.30 (0.20-0.42)	-0.5401 ± 0.0515
3-hidroxiavona	1.1 (0.75-1.53)	0.0298 ± 0.0553
Flavona	4.8 (2.87-6.03)	0.6191 ± 0.0501

La IC₅₀ más baja se observa con el flavonoide 5-hidroxi flavona IC₅₀: 0.29 (95% CI: 0.20-0.42) seguida de 3-hidroxi flavona IC₅₀: 1.1 (95% CI: 0.75-1.53) y flavona IC₅₀: 4.8 (95% CI: 2.87-6.03). El flavonoide 5-hidroxi flavona inhibe la actividad de la enzima a la mitad con una concentración 4 veces menor respecto a la 3-hidroxi flavona y 14 veces menor respecto a la flavona, siendo éste el flavonoide más potente contra la isoforma CYP1A2.

4.2 Efecto antimutagénico de la 5-hidroxi flavona en la prueba de Ames

Dado que la 5-hidroxi flavona fue el inhibidor más potente de la actividad de CYP1A2, se probó su efecto antimutagénico contra las aminas heterocíclicas en la prueba de Ames.

4.2.1 Determinación de la cantidad de promutágeno a utilizar en el ensayo de antimutagénesis

Como primer paso, se determina la dosis de promutágeno en el rango apropiado para el ensayo de antimutagénesis en la prueba de Ames. Los promutágenos son sometidos a un ensayo de concentración-efecto en donde se busca una dosis suficiente para ver el efecto mutagénico sin que éste presente toxicidad. La toxicidad de una sustancia puede ser verificada a través de un análisis rutinario del *crecimiento de fondo* en las cajas de prueba de agar mínimo. En los casos de la presencia de toxicidad, se comprueba con un crecimiento de fondo ausente o reducido. En la figura 13 se muestra el número de colonias revertantes por caja a cantidades crecientes de promutágeno. Es importante hacer notar que la potencia mutagénica de 4,8-DiMeIQx es dos órdenes de magnitud mayor que PhIP; potencia mutagénica: 4,8-DiMeIQx > MeIQx >>> PhIP.

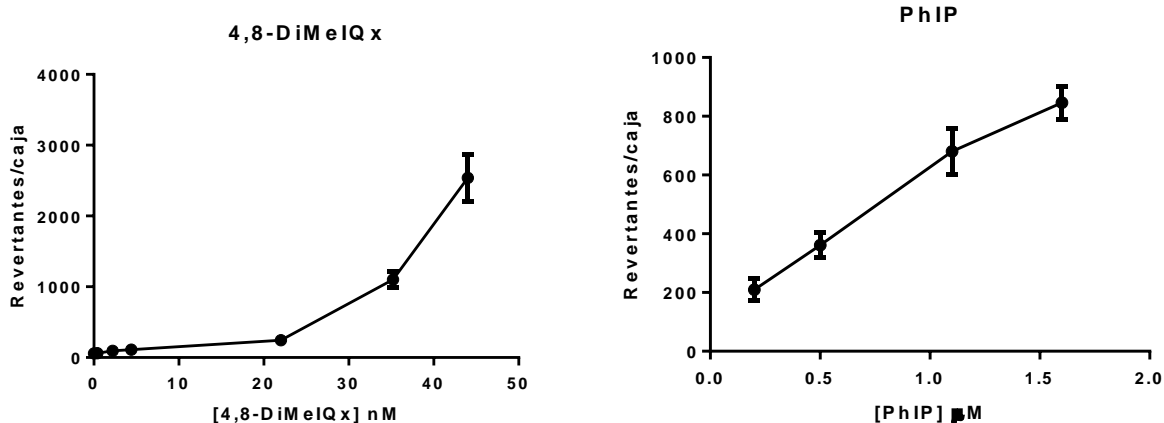


Figura 13. Curva concentración-efecto de 4,8-DiMeIQx y PhIP en la prueba de Ames con preincubación.

A partir de la figura 13 se determinó la concentración a utilizar en el ensayo de antimutagénesis con la finalidad de que el efecto mutagénico sea observable, conocido y pueda servir como referencia en el control negativo de los siguientes ensayos. Para los promutágenos 4,8-DiMeIQx y PhIP, se decidió utilizar 8ng por caja, 0.04µM (~1500 revertantes por caja) y 750 ng, 1.6 µM por caja (~850 revertantes por caja) respectivamente; el promutágeno MeIQx se utilizó en la cantidad reportada en preincubación (10 ng, 0.05µM; ~1500 revertantes por caja) en el artículo de Vereskuns⁷⁵. Se escogieron las concentraciones en las cuales la mutagenicidad aumenta en función de la concentración de mutágeno. El promutágeno 4,8-DiMeIQx (figura 13) presenta cambios de pendiente considerables a los 22 nM y 35 nM, donde se observa un incremento brusco de la mutagenicidad en cada uno de ellos. Una posible interpretación de estos resultados es que a bajas concentraciones la enzima CYP1A2 está mayormente involucrada en la vía de detoxificación y al ir aumentando la concentración, el metabolismo del promutágeno tiende a involucrarse con la vía de bioactivación. Esta interpretación es coherente con los resultados de simulación molecular entre el balance de bioactivación y detoxificación en la vías metabólicas de MeIQx descritas en el artículo de Delannée.⁷⁶ El comportamiento de la curva concentración-efecto es similar para el promutágeno MeIQx así como está descrito en el artículo de Vereskuns.⁷⁵

4.2.2 Efecto antimutagénico de la 5-hidroxi flavona

El efecto antimutagénico de 5-hidroxi flavona ante PhIP, MeIQx y 4,8-DiMeIQx en la prueba de Ames con activación metabólica en preincubación se muestra en la figura 14. La reducción en el número de revertantes que provocó la adición de 5-hidroxi flavona fue de $23\% \pm 10\%$ contra PhIP, de $24\% \pm 6\%$ contra MeIQx, de $14\% \pm 9\%$ contra 4,8-DiMeIQx. El control negativo (mutagenicidad inducida por el promutágeno sin inhibidor) sigue la misma tendencia conforme al número de revertantes obtenidas en las curvas concentración-efecto mostradas en la figura 13.

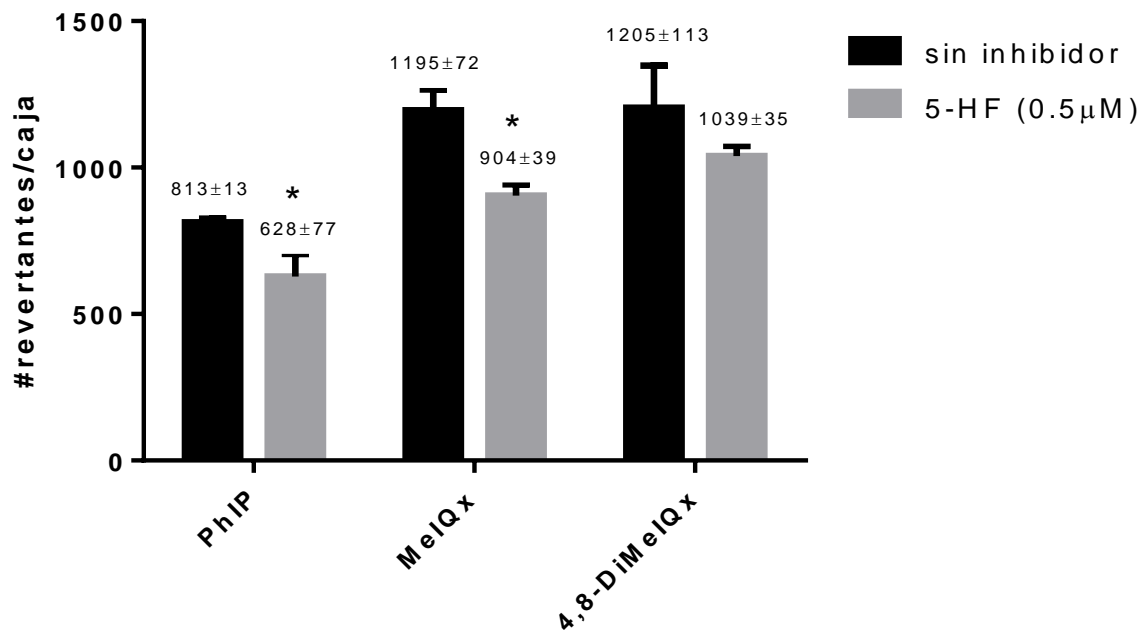


Figura 14 Efecto Inhibitorio de 5-hidroxi flavona sobre los promutágenos PhIP, MeIQx y 4,8-DiMeIQx a una concentración fija de inhibidor (5-HF: 0.5 μM en preincubación). PhIP, MeIQx y 4,8-DiMeIQx se utilizaron en cantidades iniciales de 750 ng (1.6 μM en preincubación), 10 ng (0.05 μM en preincubación) y 8 ng (0.04 μM en preincubación) por caja respectivamente. Cada barra es el promedio de tres resultados independientes de un experimento con su respectivo error estándar. (*: $P \leq 0.05$; sin asterisco: $P > 0.05$).

4.3 Curvas Concentración-Efecto sobre mutagenicidad inducida de MelQx

En la figura anterior 14 se muestran los resultados de evaluar el efecto de inhibición al evaluar una concentración fija, 0.5 μM de 5-hidroxi flavona, sobre los tres promutágenos con presencia de S9 (activación metabólica) en preincubación.

En las figuras 15, 16, 17 y 18 se muestra el efecto inhibitorio de un solo promutágeno (MelQx), a concentraciones crecientes de flavonoide flavona, 3-hidroxi flavona y 5-hidroxi flavona:

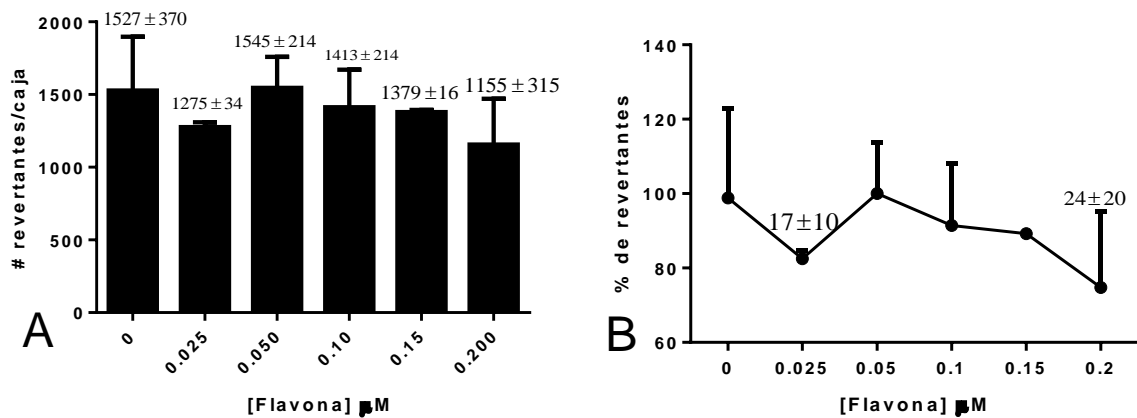


Figura 15. (A) Curvas concentración-efecto de la flavona (0.0-0.2 μM) ante el promutágeno MelQx (10ng/caja, 0.05 μM). (B) Gráfica A normalizada expresada porcentualmente. Los valores en cada punto representa la inhibición de la mutagenicidad. Cada punto representa el promedio de tres puntos con su respectiva desviación estándar.

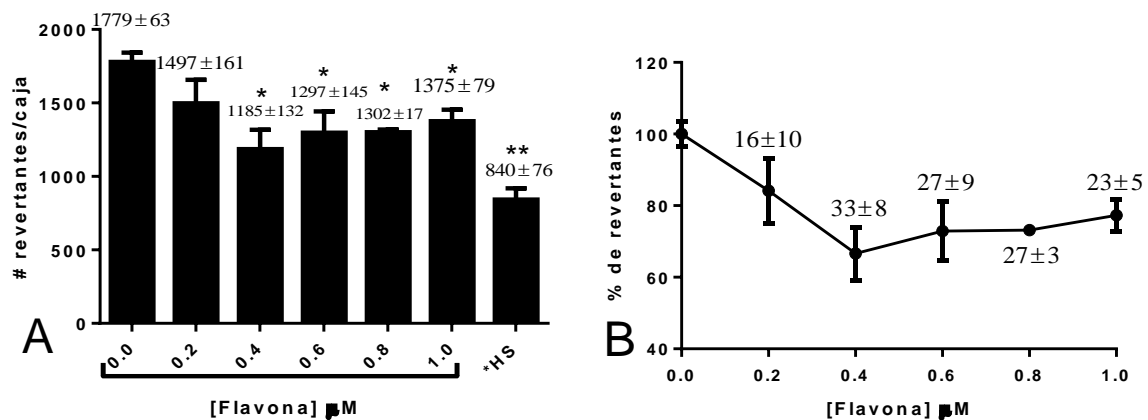


Figura 16 (A) Curvas concentración-efecto de la flavona (0.0-1.0 μM) ante el promutágeno MelQx (10ng/caja, 0.05 μM); *HS: Hoja Santa, control positivo. La inhibición del control positivo es de 53% \pm 5%. (B) Gráfica A normalizada expresada porcentualmente. Los valores en cada punto representa la inhibición de la mutagenicidad.

Cada punto representa el promedio de tres puntos con su respectiva desviación estándar. . (*: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; sin asterisco: $P > 0.05$).

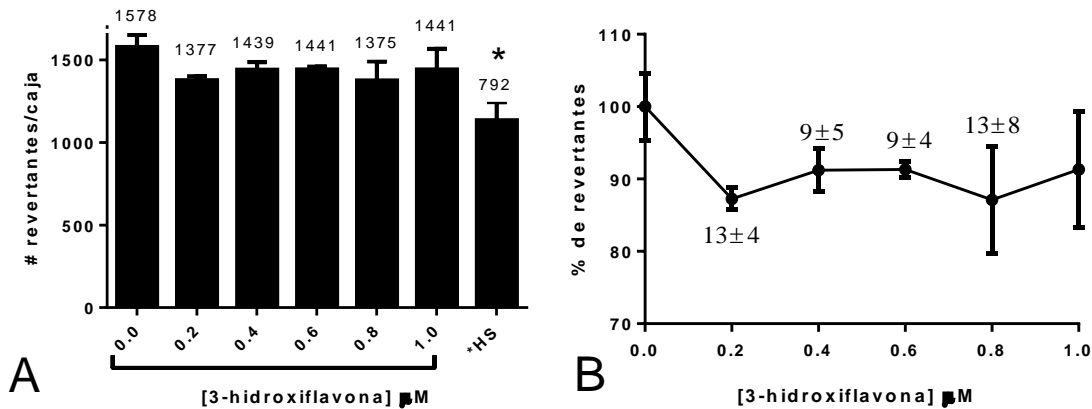


Figura 17. (A) Curva concentración-efecto de la 3-hidroxi flavona ante el promutágeno MeIQx (10ng/caja, 0.05 μM); *HS: Hoja Santa, control positivo (5mg/caja). La inhibición del control positivo es de 28 % \pm 8% (B) Gráfica A normalizada expresada porcentualmente. Los valores en cada punto representan la inhibición de la mutagenicidad. Cada punto representa el promedio de tres puntos con su respectiva desviación estándar. . (*: $P \leq 0.05$; sin asterisco: $P > 0.05$).

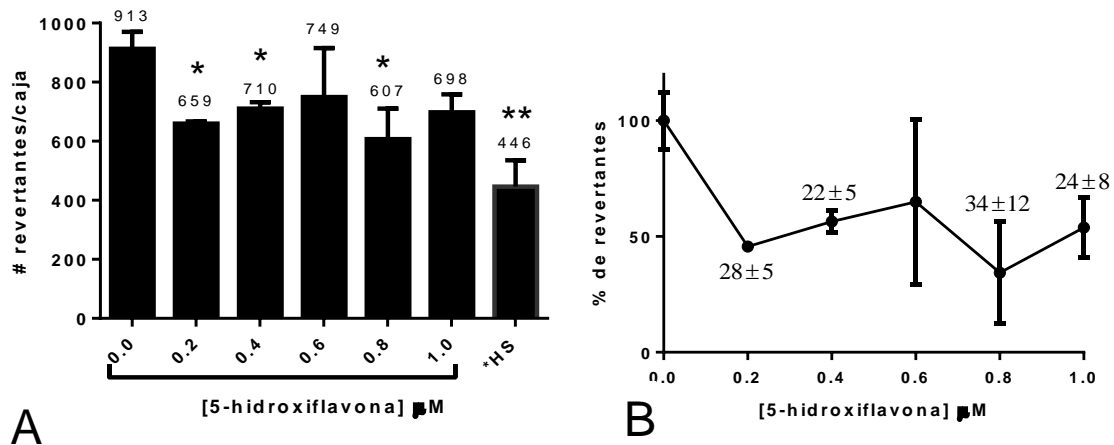


Figura 18. (A) Curva concentración-efecto de la 5-hidroxi flavona ante el promutágeno MeIQx (10ng/caja, 0.05 μM); *HS: Hoja Santa, control positivo (5mg/caja). La inhibición del control positivo es de 51 % \pm 10 % (B) Gráfica A normalizada expresada porcentualmente. Los valores en cada punto representa la inhibición de la mutagenicidad. Cada punto representa el promedio de tres puntos con su respectiva desviación estándar. . (*: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; sin asterisco: $P > 0.05$).

Capítulo 5

5 Discusión

Tres ensayos se exploraron para evaluar el efecto antimutagénico de los flavonoides flavona, 3-hidroxiavona y 5-hidroxiavona ante las aminas heterocíclicas MeIQx, PhIP y 4,8-DiMeIQ.

En la primera parte de los ensayos se evaluó cuál de los tres flavonoides flavona, 3-hidroxiavona y 5-hidroxiavona presentaba una mayor potencia de inhibición de la actividad enzimática de CYP1A2 a partir de comparar los valores de concentración inhibitoria media IC_{50} de cada uno de ellos; la concentración de 5-hidroxiavona necesaria para inhibir el 50 % de la actividad de la enzima CYP1A2 fue 4 veces menor que para la 3-hidroxiavona y 14 veces menor para la flavona. Sin embargo, considerando que la saturación de la enzima con el inhibidor no disminuye la velocidad de la reacción catalizada por la enzima a cero, los tres flavonoides presentaron una inhibición parcial. Estos datos indicaron que la 5-hidroxiavona fue el flavonoide más potente; para el siguiente ensayo se empleó una concentración mayor a la IC_{50} de la 5-hidroxiavona (0.5 μ M) para evaluar su efecto antimutagénico contra los mutágenos MeIQx, PhIP y 4,8-DiMeIQx, en la prueba de Ames. En este ensayo la mutagenicidad inducida por la amina MeIQx fue mayormente inhibida respecto a las otras dos aminas. A partir de estos resultados, se evaluó la respuesta de inhibición de la mutagénesis inducida por MeIQx como función de la concentración de 5-hidroxiavona con la finalidad de evaluar si la inhibición observada era dependiente de la concentración.

A la concentración a la cual la 5-HF inhibe el 50% de la actividad de la enzima CYP1A2 (tabla 1), se observa una reducción significativa de la mutación en los ensayos de Ames

(figura 18). También se observan reducciones significativas de la mutagenicidad a concentraciones menores que la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de la flavona.

A través de la respuesta de inhibición de la actividad mediada por el flavonoide a diferentes concentraciones, los ensayos de inhibición enzimática muestran indirectamente las interacciones entre la enzima CYP1A2, el sustrato MROD y el inhibidor. Por otro lado, a través de la respuesta de inhibición de la mutagénesis mediada por el flavonoide a diferentes concentraciones, el ensayo de antimutagénesis en la prueba de Ames examina la respuesta metabólica de un organismo completo como lo es la bacteria *Salmonella typhimurium* TA98, tratada con una mezcla de las enzimas correspondientes a la fase I y II del metabolismo del hígado de la rata, para emular las condiciones metabólicas de los mamíferos. En ambos casos, se analiza el efecto del flavonoide ante la inhibición enzimática e inhibición mutagénica con diferencias en el número de componentes interactuando y el modelo biológico utilizado, es decir, la complejidad biológica aumenta de un ensayo a otro.

Los resultados de inhibición de la mutagénesis inducida por un promutágeno que requiere una oxidación catalizada por CYP1A2 sugieren que la inhibición de la actividad enzimática de CYP1A2 tiene un papel importante en la prevención de los procesos de mutagénesis confirmando la hipótesis planteada en este trabajo, no obstante, no se observó una correlación directa entre la inhibición del CYP1A2 y la inhibición de la mutagénesis. Es decir, a una concentración fija de 0.5 μ M de 5-hidroxiavona la actividad de la enzima CYP1A2 de microsomas de rata se inhibe al 60%, mientras que la inhibición de la mutagenicidad es de 24% \pm 6% (18%-30%) con fracción subcelular S9 de rata como activación metabólica. Suponiendo que toda la mutagenicidad inducida por el promutágeno MeIQx es consecuencia de una oxidación catalizada por CYP1A2, posibles interpretaciones surgen de estos resultados:

1. La 5-hidroxiavona está inhibiendo a la isoforma CYP1A2, así como a CYP1A1. Los flavonoides flavona, 5-hidroxiavona y 3-hidroxiavona presentan una forma triangular, congruente con la forma con la que se describen los inhibidores selectivos de CYP1A2 en el artículo de Liu²⁷, sin embargo, sus dimensiones 9.34 Å de largo y lados de 8.27 Å y 6.16 Å sugieren

que estos compuestos pueden entrar al sitio activo estrecho de CYP1A2 tanto como lo pueden hacer con el sitio activo largo de CYP1A1. Dado que la forma del sitio activo es fundamental para la selectividad del sustrato, la forma del sitio activo de CYP1A1 la convierte en una enzima capaz de actuar sobre un extenso número de sustratos. La estructura del inhibidor flavona fue dibujada y alineada manualmente (figura 9) en ChemDraw 12.0 (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). El reciente trabajo de Ana Marroquín demostró que los flavonoides 5-hidroxiavona, 3-hidroxiavona y avona son inhibidores no competitivos de la enzima CYP1A1 con microsomas humanos, siendo la 5-hidroxiavona aquella que presentó la mayor inhibición hacia CYP1A1 con microsomas de humano con un valor de IC_{50} de $0.03 \pm 0.005 \mu M$. Se realizó una búsqueda en la literatura donde anteriormente se hubiera determinado el tipo de inhibición de estas moléculas para CYP1A2 ya sea de humano o de rata, sin embargo, no se encontró alguna referencia anterior.

2. Las enzimas de la fase II del metabolismo UGT y NAT & SULT presentes e inducidas en la fracción S9 de rata juegan un papel importante en la detoxificación y bioactivación de aminas aromáticas policíclicas^{38,28} generando el compuesto HONH-MelQx después de la primer reacción catalizada por CYP favoreciendo la vía de bioactivación a compuestos genotóxicos a las concentraciones probadas. Dos enzimas compiten por el mismo sustrato HONH-MelQx (figura 8), aquella que forman productos de detoxificación (UGT) y las que forman productos genotóxicos (NAT & SULT), así como lo sugieren un estudio de modelaje computacional sobre el balance entre las vías del metabolismo que bioactivan y detoxifican el promutágeno MelQx.⁷⁶

Existen otras enzimas de la fase I del metabolismo como flavin monooxigenasas (FMOs) que también catalizan reacciones de N-oxidación en paralelo con el citocromo P450⁷⁷ que podrían conducir la oxidación de las aminas heterocíclicas a compuestos genotóxicos. Sin embargo, no se han reportado estudios de toxicidad y mutagenicidad con FMOs de las aminas heterocíclicas.

Finalmente, las curvas de concentración-efecto de la inhibición de la mutagenicidad como función de la concentración del promutágeno MeIQx presentaron una inhibición de comportamiento lineal a concentraciones bajas, hasta 0.2 μM en preincubación para la 5-HF y 3-HF y hasta 0.4 μM en preincubación para la flavona; sobrepasando esta concentración en la prueba de Ames no se observó una mayor inhibición de la mutagénesis, sino el alcance de un límite inferior y una tendencia a la alta a concentraciones de 1 μM (máxima concentración en la prueba). La literatura reporta una inhibición del 50% de mutagenicidad en la prueba de Ames sin preincubación con el flavonoide 3-hidroxiavona ante el promutágeno MeIQx al aumentar dos órdenes de magnitud la concentración del flavonoide⁵⁴, comparado con la concentración utilizada en este trabajo, a la misma concentración con preincubación inhibió 9% de la mutagenicidad.

Resende y colaboradores⁴⁷ definieron a los compuestos antimutagénicos por sus porcentajes de inhibición como sin efecto antimutagénico cuando presentan <25% de inhibición, efecto antimutagénico moderado entre 25%-40% y efecto antimutagénico fuerte con una inhibición >40%. Bajo esta definición, los flavonoides en las condiciones y concentraciones estudiados en este trabajo se clasificarían como sigue: la 3-hidroxiavona como sin efecto antimutagénico, la 5-hidroxiavona con un efecto antimutagénico moderado y la flavona con un efecto antimutagénico de moderado a fuerte hacia la mutagénesis inducida por MeIQx.

Capítulo 6

6 Conclusiones y Perspectivas

En este trabajo se estudiaron tres aminas heterocíclicas MeIQx, 4,8-DiMeIQx y PhIP señaladas por la IARC como carcinogénicas que se generan en el proceso de cocción de la carne y son metabolizados principalmente por el citocromo P450 1A2 en el hígado en productos de detoxificación y productos bioactivados. Una vez bioactivados, los metabolitos pueden conducir a la formación de aductos de DNA responsables de la inestabilidad genómica⁷⁶. Estos xenobióticos fueron estudiados frente a tres flavonoides flavona, 3-hidroxiavona y 5-hidroxiavona con la capacidad de inhibir la isoforma CYP1A2, evitando su bioactivación y previniendo sus efectos mutagénicos así como es planteado en la hipótesis.

A partir de ensayos de inhibición enzimática se caracterizó a los tres flavonoides como inhibidores parciales y a la 5-hidroxiavona como el más potente para inhibir CYP1A2 de microsomas de rata. A partir de la prueba de Ames se determinó que el flavonoide 5-hidroxiavona inhibía la mutagénesis inducida por MeIQx mayormente que la inhibición con respecto a 4,8-DiMeIQx y PhIP. Finalmente se determinó si este efecto dependía de la concentración del mutágeno MeIQx.

A las condiciones probadas los mutágenos presentaron la tendencia 4,8-DiMeIQx > MeIQx >> PhIP en su potencia mutagénica inducida en la prueba de Ames. Los flavonoides presentaron la tendencia flavona (antimutagénico) > 5-HF (antimutagénico) > 3-HF (no antimutagénico) en su potencia antimutagénica en la Prueba de Ames. Mientras que los flavonoides presentaron la tendencia 5-HF>3-HF>flavona en la inhibición de la actividad enzimática. Los flavonoides 5-hidroxiavona y 3-hidroxiavona muestran la misma tendencia de inhibición entre los resultados de inhibición enzimática e inhibición mutagénica, esto es, CYP1A2 es más sensible a la 5-HF que a la 3-HF en

el ensayo de actividad enzimática, lo que se refleja en que 5-HF inhibe mayormente la mutagénesis inducida por el promutágeno MeIQx que el promutágeno 3-HF, sin embargo, esta tendencia no se observa con la flavona. Los resultados de inhibición de actividad enzimática con 5-HF, 3-HF y flavona hacia la enzima CYP1A1 de humano presentados por Ana Marroquín en su tesis de maestría presentaron la misma tendencia de inhibición 5-HF>3-HF>flavona.

En este trabajo se presenta un estudio sistemático mediante estudios de inhibición de actividad enzimática y estudios de inhibición de la mutagénesis que arroja información preliminar sobre las interacciones de CYP1A2, las aminas heterocíclicas MeIQx, 4,8-DiMeIQx y PhIP y los flavonoides 5-hidroxi-flavona, 3-hidroxi-flavona y flavona en los modelos *in vitro* y condiciones estudiadas y abre cuestionamientos para posibles estudios futuros con el fin de entender el complejo mecanismo de detoxificación y bioactivación de los xenobióticos a los que estamos expuestos constantemente y, con ello, la prevención del daño. Por ejemplo, ¿cuál es el mecanismo que mejor describe la inhibición por la flavona?

La flavona presenta una menor potencia de inhibición respecto a 5-hidroxi-flavona y 3-hidroxi-flavona hacia CYP1A2 de rata y CYP1A1 de humano. Se requiere un orden de magnitud más en concentración de flavona respecto a la 5-HF y 3-HF para inhibir la actividad de CYP1A2 a la mitad y, sin embargo, inhibe más la mutagenicidad que los flavonoides hidroxilados 5-HF y 3-HF ante los mutágenos estudiados y otras aminas heterocíclicas⁵³. Se propone estudios enzimáticos para determinar las constantes termodinámicas de CYP1A1 y CYP1A2 con la flavona como sustrato. Si dos enzimas, en diferentes vías, compiten por el mismo sustrato, conocer los valores de K_i , K_m y V_{max}^h para ambas enzimas orienta sobre la predicción del destino metabólico del sustrato y la cantidad relativa que fluirá a través de cada ruta en diversas condiciones. Así como también se sugiere explorar concentraciones cercanas a la IC_{50} de la flavona en la prueba de Ames contra MeIQx.

Finalmente es necesario tener en cuenta lo siguiente:

^h K_i : constante de inhibición; K_m : constante de Michaelis Menten; V_{max} : Velocidad máxima

1. Las enzimas del citocromo P450, así como las enzimas que actúan sobre los productos metabólicos de los citocromos P450, como UGT, SULT y NAT en la activación de MeIQx en productos genotóxicos también metabolizan los productos químicos por vías de inactivación (figura 8) y las cantidades relativas de activación y desintoxicación determinará si MeIQx u otro promutágeno es cancerígeno o no. Determinar cuáles son los rangos de concentraciones para MeIQx en la que se prefiera la vía metabólica de inactivación sobre la de activación será de gran utilidad para evaluar el riesgo carcinógeno.
2. Los flavonoides también se han reconocido como moduladores de la expresión de los CYPs.⁵⁸ Esto significa que a ciertas concentraciones el consumo de flavonoides podría expresar mayor cantidad de proteína y se incremente la conversión de productos genotóxicos catalizados por CYP1A2.
3. Si los mutágenos MeIQx, 4,8-DiMeIQx y PhIP se bioactivan principalmente por la oxidación catalizada por CYP1A2 el descubrimiento de inhibidores del CYP1A2 altamente potentes y específicos contribuirá a la prevención de las mutaciones de DNA por hidrocarburos aromáticos y, por ende, la carcinogénesis. Sin embargo, el desarrollo de estos inhibidores de CYP1A2 deseados se ve ha visto obstaculizado por el alto grado de similitud con CYP1A1.

El cáncer es causado por mutaciones que pueden ser de origen genético, inducidas por factores ambientales o como resultado de errores en la replicación del DNA.⁷⁸ Así como se ha sugerido que la dieta tiene un impacto significativo sobre el proceso del cáncer, diversos hallazgos sugieren que varios componentes de la dieta pueden ser factores importantes capaces de aumentar o disminuir su incidencia. Por lo tanto, las manipulaciones de la dieta pueden resultar un enfoque prometedor y no invasivo para minimizar el proceso de carcinogénesis.

Referencias

1. Krämer, S. D. & Testa, B. The Biochemistry of Drug Metabolism - An Introduction. *Chemistry & Biodiversity* **5**, 2465–2578 (2008).
2. Keohavong, P., Grant, S. G. *Molecular Toxicology Protocols*. **1105**, (Humana Press, 2014).
3. Sugimura, T. Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **376**, 211–219 (1997).
4. Nagao, M. & Sugimura, T. Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **290**, 43–51 (1993).
5. Pfau, W., Martin, F. L., Cole, K. J., Venitt, S., Phillips, D. H., Grover, P. L., & Marquardt, H. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis* **20**, 545–551 (1999).
6. Nagao, M. A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens--heterocyclic amines--based on molecular information. *Mutation research* **431**, 3–12 (1999).
7. Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pekala, E. & Waszkielewicz, A. M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of Applied Genetics* **55**, 273–285 (2014).
8. Webb, E. C. Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. (San Diego: Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press, 1992).
9. Rendic, S. & Guengerich, F. P. Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals. *Chemical Research in Toxicology* **28**, 38–42 (2015).
10. Brignac-Huber, L., Reed, J. R. & Backes, W. L. Organization of NADPH-Cytochrome P450 Reductase and CYP1A2 in the Endoplasmic Reticulum--Microdomain Localization Affects Monooxygenase Function. *Molecular Pharmacology* **79**, 549–557 (2011).
11. Marquard, H., Schäfer, S., McClellan, F. W. *Toxicology*, 1st ed. (Academic Press, 1990).
12. Rendic, S. & Guengerich, F. P. Contributions of Human Enzymes in Carcinogen Metabolism. *Chemical research in toxicology* **24**, 1316–1383 (2012).

13. Jancova, P., Anzenbacher, P. & Anzenbacherova, E. Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **154**, 103–116 (2010).
14. Fujii-Kuriyama, Y. & Mimura, J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 311–317 (2005).
15. Ioannides, C. *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. (John Wiley & Sons, Ltd., 2001).
16. Ruckpaul, K., Rein, H. & Blanck, J. Regulation mechanisms of the endoplasmic cytochrome P-450 systems of the liver. *Biomedica biochimica acta* **44**, 351–79 (1985).
17. Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., ... Pontén, F. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1–9 (2015).
18. Omura, T. Recollection of the early years of the research on cytochrome P450. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* **87**, 617–640 (2011).
19. Gotoh, O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 83–90 (1992).
20. Graham, S. E. & Peterson, J. A. How similar are P450s and what can their differences teach us? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **369**, 24–29 (1999).
21. Poulos, T. L. & Raag, R. Cytochrome P450cam: crystallography, oxygen activation, and electron transfer. *The FASEB Journal* **6**, 674–679 (1992).
22. Munro, A. W., Girvan, H. M. & McLean, K. J. Variations on a (t)heme - Novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Natural Product Reports* **24**, 585–609 (2007).
23. Testa, B. & Krämer, S. D. The biochemistry of drug metabolism - An introduction Part 1. Principles and overview. *Chemistry and Biodiversity* **3**, 1053–1101 (2006).
24. Groves, J. T. in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry: Third edition* (ed. Ortiz de Montellano, P. R.) 1–43 (Springer US, 2005).
25. Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1–42 (1996).

26. Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H. & Loeb, L. A. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* **14**, 473–486 (2004).
27. Liu, J., Sridhar, J. & Foroozesh, M. Cytochrome P450 Family 1 Inhibitors and Structure-Activity Relationships. *Molecules* **18**, 14470–14495 (2013).
28. Cui, J. & Li, S. Inhibitors and Prodrugs Targeting CYP1: A Novel Approach in Cancer Prevention and Therapy. *Current Medicinal Chemistry* **21**, 519–552 (2014).
29. Benigni, R. & Bossa, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: A review with implications for predictive toxicology. *Chemical Reviews* **111**, 2507–2536 (2011).
30. Grivas, S. & Jägerstad, M. Mutagenicity of some synthetic quinolines and quinoxalines related to IQ, MeIQ or MeIQx in Ames test. *Mutation Research/Genetic Toxicology* **137**, 29–32 (1984).
31. Skog, K., Knize, M. G., Felton, J. S. & Jägerstad, M. Formation of new heterocyclic amine mutagens by heating creatinine, alanine, threonine and glucose. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **268**, 191–197 (1992).
32. Maillard, L. C. Action des acides amines sur les sucres; formation de melanoidines par voie méthodique. *Comptes Rendus Chimie* **154**, (1912).
33. Shou, M., Krausz, K. W., Gonzalez, F. J. & Gelboin, H. V. Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene by human recombinant cytochromes P450, lung and liver microsomes. *Carcinogenesis* **17**, 2429–2433 (1996).
34. Shelton, M. L. & DeMarini, D. M. Mutagenicity and mutation spectra of 2-acetylaminofluorene at frameshift and base-substitution alleles in four DNA repair backgrounds of Salmonella. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **327**, 75–86 (1995).
35. Zhang, L., Rechkoblit, O., Wang, L., Patel, D. J., Shapiro, R., & Broyde, S. Mutagenic nucleotide incorporation and hindered translocation by a food carcinogen C8-dG adduct in *Sulfolobus solfataricus* P2 DNA polymerase IV (Dpo4): Modeling and dynamics studies. *Nucleic Acids Research* **34**, 3326–3337 (2006).
36. Vikse, R., Knapstad, A., Klungsøyr, L. & Grivas, S. Mutagenic activity of the methyl and phenyl derivatives of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxaline (IQx) in the Ames test. *Mutation Research/Genetic Toxicology* **298**, 207–214 (1993).
37. Felton, J. S. & Knize, M. G. Occurrence, identification, and bacterial mutagenicity

- of heterocyclic amines in cooked food. *Mutation Research/Genetic Toxicology* **259**, 205–217 (1991).
38. Gu, D., McNaughton, L., Lemaster, D., Lake, B. G., Gooderham, N. J., Kadlubar, F. F., & Turesky, R. J. A comprehensive approach to the profiling of the cooked meat carcinogens 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, and their metabolites in human urine. *Chemical Research in Toxicology* **23**, 788–801 (2010).
 39. Langoue, S., Welti, D. H., Kerriguy, N., Fay, L. B., Huynh-ba, T., Markovic, J., ... Turesky, R. J. Metabolism of 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]- quinoxaline in Human Hepatocytes: 2-Amino-3- methylimidazo[4,5-f]quinoxaline-8-carboxylic Acid Is a Major Detoxication Pathway Catalyzed by Cytochrome P450 1A2. *Chemical Research in Toxicology* **14**, 211–221 (2001).
 40. Turesky, R. J., Guengerich, F. P., Guillouzo, A. & Langouët, S. Metabolism of heterocyclic aromatic amines by human hepatocytes and cytochrome P4501A2. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **506–507**, 187–195 (2002).
 41. Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. El, Benbrahim-Tallaa, L., ... Wu, K. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology* **16**, 1599–1600 (2015).
 42. Jeffy, B. D., Chirnomas, R. B. & Romagnolo, D. F. Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors. *Environmental and molecular mutagenesis* **39**, 235–44 (2002).
 43. Bao, H., Vepakomma, M. & Sarkar, M. A. Benzo(a)pyrene exposure induces CYP1A1 activity and expression in human endometrial cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **81**, 37–45 (2002).
 44. Beecher, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition* **133**, 3248S–3254S (2003).
 45. Brown, J. P. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **75**, 243–277 (1980).
 46. Shashank, K. & Pandey, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* **2013**, 1–16 (2013).
 47. Resende, F. A., Da Silva Almeida, C. P., Vilegas, W. & Varanda, E. A. Differences in the hydroxylation pattern of flavonoids alter their chemoprotective effect against direct- and indirect-acting mutagens. *Food Chemistry* **155**, 251–255 (2014).
 48. Kim, H. J., Sang, B. L., Park, S. K., Hwan, M. K., Young, I. P., & Dong, M. S. Effects of hydroxyl group numbers on the B-ring of 5,7-dihydroxyflavones on the

- differential inhibition of human CYP 1A and CYP1B1 enzymes. *Archives of Pharmacal Research* **28**, 1114–1121 (2005).
49. Hollman, P. C. H. & Katan, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **51**, 305–310 (1997).
 50. Barnes, J., Anderson, L. A. & Phillipson, J. D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **53**, 583–600 (2001).
 51. Tsujimoto, M., Horie, M., Honda, H., Takara, K. & Nishiguchi, K. The structure-activity correlation on the inhibitory effects of flavonoids on cytochrome P450 3A activity. *Biological & pharmaceutical bulletin* **32**, 671–6 (2009).
 52. Zhai, S., Dai, R., Friedman, F. K. & Vestal, R. E. Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metabolism and Disposition* **26**, 989–992 (1998).
 53. Kanazawa, K., Yamashita, T., Ashida, H. & Danno, G. Antimutagenicity of flavones and flavonols to heterocyclic amines by specific and strong inhibition of the cytochrome P450 1A family. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **62**, 970–7 (1998).
 54. Edenharder, R., von Petersdorff, I. & Rauscher, R. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **287**, 261–274 (1993).
 55. Canivenc-Lavier, M. C., Vernevaut, M. F., Totis, M., Siess, M. H., Magdalou, J., & Suschetet, M. Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology* **114**, 19–27 (1996).
 56. Shih, H., Pickwell, G. V. & Quattrochi, L. C. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**, 287–294 (2000).
 57. Doostdar, H., Burke, M. D. & Mayer, R. T. Bioflavonoids: Selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* **144**, 31–38 (2000).
 58. Walle, T., Otake, Y., Brubaker, J. A., Walle, U. K. & Halushka, P. V. Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology* **51**, 143–146 (2001).
 59. Kang, Z. C., Tsai, S. J. & Lee, H. Quercetin inhibits benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in human hep G2 cells by altering cytochrome P-450 1A1 gene

- expression. *Nutrition and Cancer* **35**, 175–179 (1999).
60. Ciolino, H., Daschner, P. & Yeh, G. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J* **722**, 715–722 (1999).
 61. Duarte Silva, I., Rodrigues, A. S., Gaspar, J., Laires, A., & Rueff, J. Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: Relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis* **12**, 383–390 (1997).
 62. Duarte Silva, I., Rodrigues, A. S., Gaspar, J., Laires, A. & Rueff, J. Metabolism of galangin by rat cytochromes P450: Relevance to the genotoxicity of galangin. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **393**, 247–257 (1997).
 63. Tassaneeyakul, W., Birkett, D. J., Veronese, M. E., McManus, M. E., Tukey, R. H., Quattrochi, L. C., ... Miners, J. O. Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **265**, 401–7 (1993).
 64. Guengerich, F. P., Shimada, T., Yun, C. H., Yamazaki, H., Raney, K. D., Thier, R., ... Harris, T. M. Interactions of ingested food, beverage, and tobacco components involving human cytochrome P450 1A2, 2A6, 2E1, and 3A4 enzymes. *Environmental health perspectives* **102 Suppl**, 49–53 (1994).
 65. Nelson, D. L., Lehninger, A. L. & Cox, M. M. *Lehninger principios de bioquímica*. (Omega, 2015).
 66. Segel, I. H. *Enzyme kinetics : behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. (Wiley, 1975).
 67. Dong, J., Zhang, Q., Cui, Q., Huang, G., Pan, X., & Li, S. Flavonoids and Naphthoflavonoids: Wider Roles in the Modulation of Cytochrome P450 Family 1 Enzymes. *ChemMedChem* **11**, 2102–2118 (2016).
 68. Chunxue Wang, Pradeep S. Pallan, Wei Zhang, Li Lei, Francis K. Yoshimoto², Michael R. Waterman, Martin Egli, F. P. G. Functional analysis of human cytochrome P450 21A2 variants involved in congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 10767–10778 (2017).
 69. Liu, J., Sridhar, J. & Foroozesh, M. Cytochrome P450 family 1 inhibitors and structure-activity relationships. *Molecules* **18**, 14470–14495 (2013).
 70. Takemura, H., Itoh, T., Yamamoto, K., Sakakibara, H. & Shimoi, K. Selective inhibition of methoxyflavonoids on human CYP1B1 activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **18**, 6310–6315 (2010).
 71. Escobar-Garcia, D., Camacho-Carranza, R., Pérez, I., Dorado, V., Arriaga-Alba,

- M., & Espinosa-Aguirre, J. J. S9 induction by the combined treatment with cyclohexanol and albendazole. *Mutagenesis* **16**, 523–528 (2001).
72. Maron, D. M. & Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **113**, 173–215 (1983).
 73. Burke, M. D., Thompson, S., Elcombe, C. R., Halpert, J., Haaparanta, T., & Mayer, R. T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochemical Pharmacology* **34**, 3337–3345 (1985).
 74. Sebaugh, J. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics* **10**, 128–134 (2011).
 75. Vereskuns, G., Wesén, C., Skog, K. & Jägerstad, M. Inhibitory effect of threo-9,10-dichlorostearic acid on the mutagenic activity of MelQx, 2-AF and B[a]P in the Ames/Salmonella test. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **416**, 149–157 (1998).
 76. Delannée, V., Langouët, S., Théret, N. & Siegel, A. A modeling approach to evaluate the balance between bioactivation and detoxification of MelQx in human hepatocytes. *PeerJ* **5**, 3703 (2017).
 77. Cashman, J. R. Role of flavin-containing monooxygenase in drug development. *Expert Opinion on Drug Metabolism*. 1507–1521 (2008).
 78. Tomasetti, C. & Vogelstein, B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* **347**, 78–81 (2015).
 79. Zeiger, E. & Mortelmans, K. The Salmonella (Ames) test for mutagenicity. *Current protocols in toxicology* (2001).
 80. Chung, K. T., Kirkovsky, L., Kirkovsky, A. & Purcell, W. P. Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: Quantitative structure-activity relationships. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* **387**, 1–16 (1997).
 81. Hakura, A., Shimada, H., Nakajima, M., Sui, H., Kitamoto, S., Suzuki, S., & Satoh, T. Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. *Mutagenesis* **20**, 217–228 (2005).
 82. McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori, J. & Ames, B. N. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 979–83 (1975).
 83. Mortelmans, K. & Zeiger, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* **455**, 29–60 (2000).

84. Song, M., Hwang, J. Y., Lee, M. Y., Jee, J. G., Lee, Y. M., Bae, J. S., ... Lee, S. In vitro inhibitory effect of piperlonguminine isolated from *Piper longum* on human cytochrome P450 1A2. *Archives of Pharmacal Research* **37**, 1063–1068 (2014).

Anexo 1

Métodos bioquímicos y genéticos

Los ensayos *in vitro* son fundamentales para el estudio de procesos biológicos como el metabolismo. Los modelos utilizados son, en orden decreciente de complejidad biológica, organismos enteros, órganos aislados, cultivos celulares, preparaciones subcelulares y enzimas aisladas. Entre estos, las preparaciones subcelulares ofrecen un óptimo balance entre la fidelidad de la información, la facilidad de uso, bajo consumo de material y efectividad. El tejido a ser utilizado (fragmentos de hígado u otros órganos, hepatocitos, etc.) primero se homogeneiza. Este proceso rompe el retículo endoplásmico en pequeñas esferas visibles bajo el microscopio llamadas *microsomas*. La primera centrifugación elimina residuos, núcleos y mitocondrias, el resto es sometido a más separaciones por centrifugación y la fracción S9 es aislada. El sobrenadante se llama fracción S9 (una abreviatura de sobrenadante centrifugado a 9,000 g) y es metabólicamente relevante, ya que contiene microsomas y citoplasma; por lo tanto, contiene la mayor parte de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos presentes en el tejido. Una siguiente ultracentrifugación separa el citoplasma de los microsomas. Todo el procedimiento se lleva a cabo a una temperatura de 4°C.

Un organismo entero (*Salmonella typhimurium* TA98) y fracciones subcelulares (fracción microsomal y S9) se utilizan como modelos para estudiar el metabolismo de los flavonoides ante las aminas heterocíclicas. Las ratas de donde se obtienen las fracciones subcelulares se tratan previamente con compuestos que favorecen la expresión de enzimas del citocromo P450 y otras enzimas de la fase I y II del metabolismo como lo es el fenobarbital y la β -naftoflavona.

Inhibición de la actividad enzimática

La evaluación de la actividad enzimática se realiza mediante la capacidad de O-dealquilasa que poseen los CYPs. Como sustrato se utiliza la metoxirresorufina para medir la actividad de CYP1A2, la cual sufre O-dealquilación mediada por la actividad metoxirresorufina O-desmetilasa (MROD). Este ensayo presenta un alto grado de

especificidad para la isoforma CYP1A2, generando como producto la resorufina, cuantificable mediante fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. MROD y otros sustratos homólogos, cuya O-dealquilación presenta alto grado de especificidad para ciertas isoformas del CYP, y la habilidad aparente de distinguir entre los efectos de diferentes tipos de inductores de la actividad enzimática de los CYPs ⁷³.

La actividad basal de la enzima se observa con el sustrato y sin inhibidor; la inhibición de CYP1A2 por el flavonoide y metoxiresorufina causa que la actividad MROD disminuya a concentraciones crecientes de inhibidor, en este caso los flavonoides flavona, 3-hidroxi flavon y 5-hidroxi flavona. La actividad tiene unidades de pmol/mg de proteína/minuto. Para fines de comparar la potencia inhibitoria entre los flavonoides probados, se determinó la concentración de inhibidor a la cual la respuesta de la enzima se reduce a la mitad, llamada *concentración inhibitoria 50* (IC₅₀).

Ensayo de mutagenicidad (Prueba de Ames)

Entre las técnicas que existen para la identificación de mutágenos, la prueba de Ames está ampliamente aceptada como una técnica rápida para la detección de sustancias químicas que inducen mutaciones en el DNA de los organismos. Las mutaciones, son cambios en la secuencia de nucleótidos que componen el DNA. Un evento de mutagenicidad puede ser causado por agentes que generan cambios puntuales donde se modifica, inserta o elimina una base nucleotídica. Esta prueba biológica fue desarrollada por el Dr. Bruce N. Ames en la Universidad de California ⁷²; utiliza como organismo la bacteria *Salmonella typhimurium* y aprovecha las mutación preexistente en diversos genes de su operónⁱ histidina que la hacen incapaz de sintetizar histidina, por lo que será incapaz de crecer y formar colonias en su ausencia. Únicamente las células que se reviertan (o muten) de dependientes de histidina (his-) a independientes de histidina (his+) pueden formar colonias. Una pequeña cantidad de histidina inicial permite que todas las bacterias depositadas ($\sim 1 \times 10^8$ células) puedan llevar a cabo un

ⁱ Operón: conjunto de genes que controlan la biosíntesis de una proteína.

mínimo número de divisiones celulares; en muchos casos, este crecimiento es esencial para que ocurra la mutagénesis.

El número de colonias mutantes espontáneas por plato es relativamente constante. Sin embargo, cuando se agrega un mutágeno, este promoverá que nuevas mutaciones pueden restaurar la función del gen lo que le permite a la célula sintetizar histidina y, por lo tanto, el número de colonias revertidas aumenta. Cada una de las cepas de prueba de *Salmonella* contiene una mutación de marco de lectura *frameshift* o una mutación con cambio de sentido en el operón de histidina. Estas mutaciones resultan en la deficiencia de una enzima activa o la producción de una enzima inactiva en la biosíntesis de histidina. Una mutación puntual, inducida por un mutágeno químico, "revierte" la inicial mutación y restaura la capacidad de la célula para sintetizar su propia histidina y su capacidad de crecer en ausencia de esta⁷².

Una sustancia química se considera un mutágeno en la prueba de Ames cuando la respuesta mutagénica, es decir el número de revertantes inducidas, es igual o superior al doble de colonias revertantes respecto a la reversión espontánea (control negativo), obtenidas en al menos una cepa de prueba, ya sea en presencia o ausencia de un sistema de activación metabólica⁷⁹.

Se utilizó la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* por su capacidad de revertir mutaciones causadas por el metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos^{72,80,81}. La cepa TA98 posee una mutación *frameshift* en el alelo *hisD3052* del operón de histidina; el gen *hisD* codifica para la última enzima en la biosíntesis de histidina *histidinol deshidrogenasa*, posee la secuencia -CGCGCGCG- que son 8 residuos repetidos de -GC- cerca del sitio -1 de la mutación *frameshift*^{72,82}. La cepa contiene otras mutaciones que la hacen más sensible a la detección de mutágenos; el genotipo de la cepa TA98 es *hisD3052* Δ (*bio chlD uvrB gal*) *rfa*, pKM101⁷². 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 bacteria⁷². El gen *uvrB* codifica para el sistema de reparación por escisión de bases, al perder este sistema de reparación, las bacterias son más sensibles a las

modificaciones causadas en el DNA. Esta delección implica al gen de biotina, lo cual ocasiona que la bacteria también presente deficiencia de biotina.^{72,83} El plásmido factor R, *pKM101* incrementa la vía de reparación de DNA con tendencia a errores por el DNA polimerasa *error-prone*, 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.

En cada prueba *in vitro* se cumplió con los siguientes puntos:

1. Activación metabólica: Las bacterias antes de la exposición a la sustancia de prueba deben activarse para funcionar como mutágenos potenciales. Un sistema comúnmente utilizado implica una fracción postmitocondrial suplementada con cofactor (S9) preparada a partir de hígados de rata. Los hígados de rata se tratan con agentes como Aroclor o una combinación de compuestos como fenobarbital y β -naftoflavona para permitir la inducción enzimática.
2. Sustancia: la sustancia problema se disuelve en un disolvente apropiado.
3. Disolvente/vehículo: El disolvente / vehículo utilizado no debe reaccionar con el compuesto de prueba y no debe tener efectos perjudiciales ni para bacteria ni para el activador metabólico.
4. Concentraciones de exposición: Se utilizaron al menos cinco concentraciones diferentes para cada sustancia de prueba corroborando para cada una que no se presente toxicidad.
5. Controles: cada ensayo debe incluir un control positivo y negativo específico de la cepa, tanto en presencia como en ausencia del activador metabólico.
6. Medio y condiciones de cultivo: Las bacterias se cultivan en su propio medio, seguido de una condición de incubación correcta en un recipiente a 37 ° C.

En el ensayo de Ames se utilizó como control positivo una planta aromática que crece en Mesoamérica y es ampliamente utilizada en la dieta de los países mesoamericanos tropicales. La hoja santa *Piper auritum* se conoce por ser un inhibidor demostrado de CYP1A2 en estudios *in vitro*⁸⁴. El control negativo es la mutagenicidad inducida por el promutágeno sin inhibidor.