



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**INHIBICIÓN DE CITOCROMOS CYP1A1 Y
CYP1A2 POR LIOFILIZADOS DE CERVEZAS
NACIONALES MEXICANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

LINARES MARTÍNEZ IARA SAHÍRI



Ciudad Universitaria, CDMX. Año 2020



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: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

VOCAL: DR. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

SECRETARIO: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

1° SUPLENTE: DRA. SOBEIDA SANCHEZ NIETO

2° SUPLENTE: DR. ALFONSO RAFAEL SALGADO AGUAYO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

SUSTENTANTE:

LINARES MARTÍNEZ IARA SAHÍRI

AGRADECIMIENTOS

Al **DR. MAURICIO TRUJILLO** del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, por la liofilización de las muestras de cerveza.

Al **DR. JAVIER ESPINOZA** y su equipo en el instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, por las muestras de hígado de rata tratadas para inducir citocromos de interés.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE CUADROS	2
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	8
MUTÁGENOS UBICUOS	8
PROMUTÁGENOS QUE SE ACTIVAN POR CYP450	11
ALOSTERÍA DE LOS CYP450	13
CERVEZA Y SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS	15
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	24
LIOFILIZACIÓN DE CERVEZA.....	24
OBTENCIÓN DE FRACCIÓN S9 Y MICROSOMAS	24
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN MICROSOMAS.....	26
CURVA ESTÁNDAR DE RESORUFINA.....	26
ENSAYO ENZIMÁTICO CON EXTRACTO	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
DISCUSIÓN	34
LA PRESENCIA DE MELANOIDINAS Y SU RELACIÓN CON MAYOR INHIBICIÓN ENZIMÁTICA.....	34
COMPORTAMIENTO NO MONOFÁSICO POR INHIBICIÓN DEPENDIENTE DEL TIEMPO DEL CYP1A2.....	37
HORMESIS POR ALOSTERISMO O CAMBIOS CONFORMACIONALES.....	38
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	45
<i>SECCIÓN I.</i> CICLO CATALÍTICO CYP450.....	55
<i>SECCIÓN II.</i> MÉTODOS DE PRODUCCIÓN EN LA CERVEZA SIN ALCOHOL.....	56
<i>SECCIÓN III.</i> ESQUEMA DE PRODUCCIÓN DE LA CERVEZA.	57
<i>SECCIÓN IV.</i> COMPUESTOS BIOACTIVOS CLAVE DEL LÚPULO.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ácidos monoméricos predominantes en los distintos tipos de cerveza.	19
Figura 2. Valores de IC50 de los tres tipos de cerveza para CYP1A1. .	30
Figura 3. Valores de IC50 de los tres tipos de cerveza para CYP1A2.	31
Figura 4. Actividad de las tres cervezas en el rango de concentración de 2.6-5 mg/mL para CYP1A1.	32
Figura 5. Actividad de las tres cervezas en el rango de concentración de 2.6-5 mg/mL para CYP1A2.	33
Figura 6. Ciclo catalítico CYP450..	55
Figura 7. Esquema de producción de la cerveza.	57
Figura 8. Compuestos bioactivos clave del lúpulo.	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Curva estándar de resorufina.	27
Cuadro 2. Resumen de los métodos para la producción de cerveza sin alcohol.	58

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

EMS	Sociedad Mutagénica Ambiental	PM	Material particulado
PAH	Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos	EROD	Etoxi-resorufina-o-desmetilasa
HCA	Aminas Heterocíclicas Aromáticas	MROD	Metoxi-resorufina-o-desmetilasa
XH	Xantohumol	PROD	7-pentoxi-resorufina-O-dealquilasa
8-PN	8-prenilnaringenina	ic50	Concentración inhibitoria 50
6-PN	6-prenilnaringenina	rpm	revoluciones por minuto
IXH	Isoxantohumol	mM	micromol
DMXH	Desmetilxantohumol	DTT	ditiotreitól
TMS	Teoría de Mutación Somática	BSA	Albúmina de Suero Bovino
AND	Ácido Desoxirribonucleico	DMSO	Dimetilsulfóxido
B[a]P	Benzo-a-pireno	nm	nanometros
pM	picomol	BA	solución amortiguadora de cloruros
CYP	Citocromo	tris-HCl	tris-base
POR	NADPH-P450 reductasa	TDI	Inhibición dependiente del tiempo
km	Constante de afinidad	MBI	Inhibición basada en mecanismo
vmax	Velocidad máxima	MIC	Complejo metabólico inhibitorio
μ	micro		
pg	picogramos		
B[a]P_{eq}	equivalentes de B[a]p		
M	molaridad		

RESUMEN

La creciente exposición ambiental a ciertos xenobióticos puede resultar en procesos de genotoxicidad, mutagénesis y en la formación de tumores. Uno de los mecanismos de genoprotección es la inhibición selectiva de citocromos P450; los cuales activan a dichos xenobióticos convirtiéndolos en mutágenos. La literatura ha reportado inhibición por parte de moléculas contenidas en alimentos popularmente consumidos, como la cerveza. Es por ello que en este proyecto se midió la actividad enzimática de los citocromos P450 CYP1A1 y CYP1A2 en presencia de tres tipos de cerveza representativas del mercado nacional mexicano: Ale, Lager y sin alcohol. Los resultados mostraron que las cervezas tuvieron diferentes capacidades para inhibir dichos citocromos.

ABSTRACT

The growing environmental exposure to certain xenobiotics can result in genotoxicity processes, mutagenesis and tumor formation. One of the mechanisms of genoprotection is the selective cytochrome P450 inhibition; which activates these xenobiotics converting them into mutagens. Literature has reported inhibition from molecules contained in popular foods, like beer. For that reason in this project, enzyme activity of cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1A2 was measured in the presence of three types of beer that are representative of Mexican national market: Ale, Lager and without alcohol. Results showed that these beers had different capacities to inhibit those cytochromes.

INTRODUCCIÓN

A mediados del siglo XX, científicos fundadores de la Sociedad Mutagénica Ambiental de EE.UU. (EMS, por sus siglas en inglés), tuvieron la preocupación de que mutágenos se encontrasen en el ambiente, alimentos y en los novedosos productos del mercado que no garantizaban tener inocuidad genotóxica (1). Anteriormente, ya se había relacionado la genotoxicidad con los procesos de carcinogénesis (2). La problemática continúa hasta nuestro presente al demostrarse por la estadística que el cáncer es un creciente problema de salud pública a nivel mundial (3) y la tercera causa de muerte en México (4).

Algunos compuestos exhiben su capacidad mutagénica cuando son activados por citocromos P450. Las enzimas P450 son una superfamilia de hemoproteínas que forman parte de la fase I en las reacciones de biotransformación de xenobióticos, además de participar en diversos procesos fisiológicos como la síntesis de esteroides y colesterol, metabolismo de ácidos grasos y homeostasis de mantenimiento de calcio (5). Ejemplos de moléculas promutágenas que se encuentran en el ambiente y/o alimentos, son los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) y las aminas heterocíclicas aromáticas (HCA). Éstas son activadas por los citocromos CYP1A1 y CYP1A2 respectivamente. Los mexicanos no se encuentran exentos del contacto con estos promutágenos, al haber por ejemplo, concentraciones de PAHs superiores a los límites recomendados por las autoridades europeas en las zonas industrializadas y urbanas de nuestro país (6). Por ello, la inhibición en la actividad de estas enzimas es un posible mecanismo para la genoprotección.

Se ha descrito actividad antimutagénica para la cerveza, por medio del mecanismo de inhibición de los citocromos CYP1A1 y CYP1A2 (8). La cerveza es un alimento nutritivo cuya mezcla de componentes, incluye desde compuestos carbonílicos hasta aromáticos. La proporción de estos componentes no sólo depende del tipo de cerveza: ale (con *Saccharomyces cerevisiae*) y lager (con

Saccharomyces pastorianus); sino de las variaciones en los ingredientes básicos (agua, cebada, lúpulo y levadura) y su procesamiento (7).

La mirada de opciones en el mercado sugiere una heterogeneidad de inhibición. Además, para indagar las moléculas con capacidad de inhibición por parte de la cerveza, las investigaciones se han enfocado en el aislamiento de prenilflavonoides y uso de extractos de lúpulo estandarizados. Por ejemplo, Yuan et al. (2014) informan que el extracto de lúpulo (sin ácidos amargos y estandarizado con 33.84% XH, 0.35% 8-PN, 1.77% 6-PN y 1.07% IXH) inhibe débilmente, pero significativamente, al CYP2B6, mientras que la mezcla de los prenilflavonoides aislados a las mismas concentraciones no mostró inhibición significativa. Ello indica la posibilidad de que otros compuestos presentes en el extracto, diferentes a los prenilflavonoides aislados, jueguen un papel sinérgico aumentando el efecto de inhibición. Sin embargo, ese comportamiento sinérgico no lo comparten todos los citocromos, ya que el CYP2C por ejemplo, fue inhibido aditivamente por los compuestos prenilados, al no observarse diferencia significativa entre ambas mezclas. (9). Más aún, Nozawa et al. (2014) observan en el ensayo de Ames, un efecto de antimutagenicidad directamente proporcional a la concentración de lúpulo, pero también observa efecto de antimutagenicidad con cerveza sin extracto de lúpulo (10).

Por eso, parte de la distinción de este trabajo, es la disposición de los compuestos no volátiles de la cerveza completa y no sólo del extracto del lúpulo o aislados. Considerando sea la inhibición, un mecanismo de antimutagenicidad, esta inclusión es importante para los ensayos de mutagenicidad posteriores. Como se menciona en el párrafo anterior, parte de la justificación de manejar el liofilizado de la cerveza completa, radica en que dichas muestras complejas pueden presentar fenómenos de sinergismo (o su opuesto antagonismo), contrarios a la intuitiva inhibición aditiva. El sinergismo no es sencillo de definir en términos cuantitativos, ya que se comprende como una supradición ($1+1>2$), pero ello involucra implícita o explícitamente los tipos, formas o mecanismos de dichas relaciones dosis-efecto

sean homogéneos; por ejemplo, el que sean lineales. Cabe mencionar que cuando se conoce los mecanismos son diferentes, el término más apropiado es potenciación (11). Dado que los mecanismos de inhibición del CYP450 no son evidentes en una muestra compleja, el fenómeno de sinergismo debe considerarse cualitativamente; i.e. como un aumento en el efecto que excede la suma de los efectos individuales, según un umbral establecido (12).

En este proyecto, se plantea la medición de actividad de los citocromos CYP1A1 y CYP1A2 por la cuantificación de metabolitos fluorescentes, en presencia de concentraciones de liofilizados de tres tipos de cerveza representativas en el mercado nacional mexicano: Minerva ® como tipo ale y Corona Extra ® para tipo lager y sin alcohol; con el objetivo de detectar si hay inhibición por los componentes presentes en los liofilizados. Cabe destacar que la cerveza sin alcohol se incluye, no sólo por su creciente importancia en el mercado, sino también porque su producción le atribuye diferencias relevantes.

MARCO TEÓRICO

Mutágenos ubicuos

Los primeros mutágenos confirmados en la historia fueron agentes físicos: los rayos X (1927) y posteriormente los rayos UV (1930). Desde 1914 se inquirió la capacidad mutagénica de las sustancias químicas, pero fue durante y después de la segunda Guerra Mundial que se dieron demostraciones claras. Anteriormente, en el año 1775, se tuvo registro del primer agente externo que ocasiona cáncer, el hollín de chimenea. Después, fue Müller quien sugirió que las mutaciones inducidas por rayos X originaban cáncer. Por lo tanto, él y Auerbach extendieron la relación de mutagénesis y carcinogénesis para las sustancias químicas (1). Ulteriormente, un estudio ha demostrado que de 175 carcinógenos, 157 son mutágenos, es decir mutacarcinógenos. La teoría de mutación somática (TMS) del cáncer propuesta en 1928 por Bauer, sostiene que estos agentes causan cáncer por la inducción de mutaciones no letales en las células somáticas (13); lo que origina células malignas. Las especies químicas que causan daño al DNA al unirse covalentemente, formando aductos de manera aditiva e irreversible, y persistiendo en la proliferación celular, se consideran agentes iniciadores; por ser el paso correspondiente a la fase de iniciación de la carcinogénesis. La formación del aducto no necesariamente genera una mutación, sino hasta cuando la síntesis de DNA ocurre (14).

Los mutágenos ambientales se traslapan con los carcinógenos ambientales. La industria moderna los ha introducido, pero también se crean en la naturaleza. Han estado ahí desde que nuestros ancestros descubrieron el fuego. En los años 30 del siglo pasado, Cook y colaboradores aislaron e identificaron, el benzo[a]pireno (B[a]P), del hollín. Subsecuentemente se han aislado y catalogado otros compuestos (15).

El reino fungi contamina productos agrícolas por el género *Aspergillus* en regiones más cálidas y por *Penicillium* y *Fusarium* (vomitoxina y deoxinivalenol) en las regiones más frías. Otras toxinas de importancia son la fumonisina B1, ocratoxina A, esporidesmina, dotistromina (toxina de los bosques de pino), aflatoxina B1 y esterigmatocistina.

En el reino vegetal se encuentra la cicasina de las nueces, safrol, los alcaloides pirrolizidínicos encontrados en más de 50 especies de las familias Compositae, Boraginaceae y Leguminosae. También, flavonoides como quercetina, kaempferol, ramnetina, galangina, isorhamnetina, fisetina, woganina. La cebolla por ejemplo, contiene de 11 a 24 gramos de quercetina por kg. Por otro lado, las flavonas e isoflavonas o no son mutagénicas o lo son muy levemente.

En los productos cárnicos puede ser que sean introducidos por los métodos de preservación (compuestos N-nitrosos) y en la pirólisis por cocción a altas temperaturas (aminas heterocíclicas y PAHs). Tanto los PAHs como los nitrados (nitro-PAHs) pueden ser generados en el procesamiento termal de la comida como el secado, horneado, parrillado o ahumado. El piroxilato de triptófano es el más mutagénico seguido de piroxilatos de serina, ácido glutámico, ornitina y lisina con activación metabólica. También está el piroxilato de glucosamina, los piroxilatos de glucosa, arabinosa, fructosa y sorbitol. Piroxilatos de alina y alicina contenidos en la cebolla y el ajo son mutagénicos. Por lo general, un contenido bajo de agua en la comida favorece la producción de mutágenos cuando ésta es asada. Los productos de nitrosación, como los compuestos N-nitrosos, son producidos por la reacción de nitrito con otros compuestos que contienen nitrógeno (como las aminas y amidas), en condiciones ácidas del estómago o el medio. Los nitritos están presentes en comida y agua y son producidos del nitrato del agua y vegetales.

Una dieta alta en grasas poliinsaturadas facilita la formación de peróxidos como el malondialdehído, cuando éstas se oxidan. Éste es mutagénico, en comparación con otros peróxidos como el ácido 12-hidroxiesteárico, 4-cetodecanoico que sólo son carcinogénicos ([16](#)).

Como químicos sintéticos, están en los aditivos alimenticios (derivados de nitrofurano), cosméticos (colorantes metálicos y de plantas, compuestos amino aromáticos, nitro, azo y diazo, antraquinonas, azínicos, nitrofenilenediaminas, amino-nitrofenoles, amino-antraquinonas, p-aminofenol, entre otros; usados en tintes de cabello). También en fármacos (agentes antitumorales, glucósidos de antraciclina), pesticidas, productos del hogar, y sustancias industriales u ocupacionales.

Por último, como contaminantes en el aire y agua; asbestos, metales pesados (como cadmio, cromo, níquel y arsénico), e hidrocarburos aromáticos que se encuentran en el ambiente, por fuentes antropogénicas como emisiones de gasolina y diesel de motores vehiculares, combustión incompleta de carbono, operaciones de refinación petrolera, consumo de gas natural, e incineración industrial ([18](#))([19](#)). En concreto la Ciudad de México, al ser una ciudad grande y con ventilación limitada por su posición entre montañas, al ser una cuenca, experimenta problemas de contaminación. Está localizada a 2200 m sobre el nivel del mar. Su menor disposición de oxígeno lleva a una combustión menos eficiente, generando así mayor cantidad de PAHs. Éstas, se distribuyen en material particulado (PM) sólido y en la fase gaseosa; dependiendo de la temperatura ambiental, su peso molecular y presión de vapor. Pueden reaccionar en la atmósfera generando PAHs oxigenados, hidrocarburos aromáticos nitropolicíclicos y PAHs clorados. Los mayores niveles de PAHs son en temporada fría seca, al encontrarse de 6 a 8 veces más en el PM y en fase vapor, que en temporadas secas calurosas o lluviosas. Además, la ciudad presenta vientos predominantes del norte al noroeste. Dado que la mayoría de las industrias están ubicadas al norte, dichos vientos transportan cantidades significativas de contaminantes

emitidas por estas industrias. Son emisiones de gases no caracterizadas de fundición de metales, producción de cerámicos y ladrillos, plantas termoeléctricas y de la refinería en el estado de Hidalgo. Los estándares europeos proponen un límite de 1000 pg/m^3 de B[a]P_{eq} (como promedio anual), para proteger la salud en la población. No sólo la salud de los habitantes de la ciudad se encuentra en riesgo por una presencia anual promedio mayor a los límites europeos propuestos con 1250 pg/m^3 B[a]P_{eq}, sino que hay otros PAHs más carcinogénicos que sugieren la determinación sólo de niveles de B[a]P es insuficiente (19).

Promutágenos que se activan por CYP450

El potencial carcinogénico está afectado por las condiciones experimentales como la variabilidad individual, especie, sexo, edad, ruta de administración y la dieta (18). La alimentación puede proporcionar factores que promueven o entorpecen la mutagénesis, como los comutágenos y antimutágenos respectivamente. Asimismo, estudios exponen que la deficiencia de micronutrientes en la dieta, como beta caroteno, vitamina E y calcio, requeridos en el mantenimiento del DNA, así como la síntesis, la reparación, la metilación y la apoptosis, pueden llevar al daño del DNA en el mismo grado que la exposición a un carcinógeno genotóxico o radiación. Niveles óptimos de estos micronutrientes con respecto a la prevención del daño oxidativo, reparación y apoptosis óptima se han definido *in vitro*. Sin embargo, ello no proporciona información suficiente para prevenir el daño al DNA en humanos, porque incluso hay debate de la eficacia del uso de suplementos comparado con su obtención por los alimentos. En general, la extrapolación *in vitro* a *in vivo* se complica por la presencia de factores idiosincráticos. Un ejemplo de estos factores idiosincráticos son las enzimas metabolizadoras específicas, que no sólo dependen de los polimorfismos genéticos del individuo (SNPs o Polimorfismos de un Solo Nucleótido, por sus siglas en inglés), sino de la inducción de éstas por xenobióticos; tal como los

ilustrados en los párrafos preliminares por la alimentación y el medio ambiente (16).

La activación metabólica de promutágenos se puede dar por estas enzimas, principalmente por los citocromos P450. En los primeros ensayos, Müller y Auerbach, usaron el modelo de *Drosophila melanogaster* para experimentar con hidrocarburos cancerígenos, pero a diferencia del sulfuro de diclorodietilo (gas mostaza), no dieron positivo a la prueba de mutagenicidad. Más de 30 años después, por las indagaciones de Malling y las pruebas en *Salmonella sp.* de Ames, se comprendió que los resultados dieron negativo por la incapacidad del modelo para metabolizar esos compuestos promutágenos en sus electrófilos mutagénicos (1).

Los citocromos P450 (CYP450) están distribuidos en todos los reinos biológicos y forman parte de una de las familias más grandes de enzimas. En el humano, los CYP se encuentran en el hígado, pared intestinal, cerebro, corteza adrenal, testis, pulmones, riñones, entre otros; dentro del retículo endoplásmico o membranas mitocondriales internas, donde sus acarreadores proteicos de electrones difieren en su localización subcelular. Al formar un complejo con el monóxido de carbono, presentan una banda, o longitud de onda máxima en los 450 nm del espectro de absorción, derivando de ahí su nombre. La nomenclatura de su clasificación se basa en la identidad de las secuencias de aminoácidos, filogenia y organización génica. Se les asigna un número para indicar la familia (identidad usualmente de un 40%), una letra para la subfamilia (identidad mayor al 55%) y después son diferenciados por un número correspondiente a la isoforma o enzima individual (20)(21)(22).

Los CYP450 contribuyen en procesos vitales como la asimilación de fuentes de carbono, la biosíntesis de hormonas, de vitaminas liposolubles y de componentes estructurales; así como en tres cuartos de las reacciones del metabolismo de xenobióticos. Habitualmente biotransformando en conjunto con las reacciones de

la fase II, el sistema CYP cataliza la reacción más común de la fase I, la oxidación. Para catalizar la activación del oxígeno molecular, y poder efectuar la oxidación regio y estereoespecífica a una plétora de sustratos, los P450s tienen diversas fuentes reductoras; pero en el caso de los CYP microsomales de mamíferos, obtienen sus electrones del NAD(P)H-P450 reductasa (POR); con ayuda ocasional del citocromo b5. Algunas reacciones de oxidación representativas son las hidroxilaciones alifáticas y aromáticas, epoxidaciones, N-deaquilaciones, O-deaquilaciones, S-deaquilaciones, N-hidroxilaciones, desaminaciones oxidativas, denitrosaciones oxidativas, deshalogenaciones oxidativas, desulfuraciones oxidativas y sulfoxidaciones (23). Así cuando, por ejemplo, el CYP1A1 metaboliza los PAHs y/o el CYP1A2 metaboliza aminas aromáticas y aflatoxina B1, se forman electrófilos fuertes (iones carbonio y nitronio). Estos agentes alquilantes se unen a los ácidos nucleicos, en los átomos de N y O que están en el esqueleto fosfodiéster y las bases. Particularmente en las bases, los sitios más comunes de alquilación son el N7 de la guanina, el N3 de la adenina, el N3 de la guanina, y el O6 de la guanina (24)(25).

Alostería de los CYP450

Los CYP450 poseen un grupo prostético hemo, coordinado como ligando axial, a un anión de tiolato del residuo de cisteína; estructura central muy conservada a lo largo de la evolución. Pese a que el porcentaje de identidad de secuencia es menor al 20% entre las isoformas, eso no imposibilita se conserve la topografía general y el doblamiento de la proteína al adoptar conformaciones abiertas y cerradas. Estos cambios son requeridos para permitir el acceso del sustrato al sitio activo, así como para que los protones disueltos protonen al oxígeno molecular unido al hierro (*esquema de ciclo catalítico en apéndice sección 1*). Dicha dinámica general es compartida por todos los P450s, donde alrededor del grupo hemo (sitio activo), se refleja el mecanismo común de transferencia de

electrones y protones y de la activación del oxígeno. No obstante, la aptitud para adaptarse a una variedad de sustratos de diferentes tamaños y formas, es específico* de cada subfamilia. Por ejemplo, los sustratos de las isoformas de la familia CYP1A, como CYP1A2, son aminas y amidas planares hidrosolubles (26).

La barrera para la penetración del sustrato a la cavidad de unión, está determinada por la relajación conformacional a gran escala de la proteína. Es por ello que la interacción de la enzima con la membrana, afecta directamente cómo el sustrato va a tener acceso. La manera de unión de la familia CYP1A por ejemplo, orienta el canal de acceso del sustrato a que sea por el citosol (26). Los cambios estructurales que resultan del enlace del sustrato, pueden favorecer el empaquetamiento (que define la preferencia estereoespecífica de la transformación catalítica) y la estabilización electrostática del estado de transición; para que una vez ahí se facilite la subsecuente dinámica (27).

Los citocromos no pueden constreñirse a enzimas con un solo sitio de unión. No sólo son los sitios de unión periféricos, sino tan solo la cavidad del sitio catalítico (activo u ortostérico), tiene un volumen lo suficientemente grande como para acomodar dos o más moléculas; aunque eso no deje de lado que la unión de ligandos pequeños al hierro del grupo hemo, pueda ser cohibida por impedimento estérico del sustrato. Fundamentalmente, dicha cavidad posee dos diferentes subsitios (sitio I y el sitio II); en los cuales, la unión del sustrato y producto, regula el estado funcional de la enzima y la expresión general de su actividad. Surgen interacciones alostéricas por el acceso diferencial a los sitios, pero inicialmente no se consideró se tuviesen cambios conformacionales mayores en la enzima; i.e. un modelo estático cuyo espacio se llena. La palabra “alostérico” fue introducida por Monod y Changeux a mediados del siglo XX, para la idea de acoplamiento termodinámico y cambios conformacionales en las macromoléculas. En contraposición, el alosterismo de CYP se basa en los resultados de actividad en función de la concentración del sustrato y en la cooperatividad. Cabe no omitirse

que el alosterismo de CYP es diferente al alosterismo tradicional, porque el segundo infiere una especificidad de sustrato alta. Como la especificidad* de los CYPs hacia con los sustratos es baja, ello da como resultado un alosterismo no específico. Los CYPs pueden unirse con más de un sustrato y pueden generar más de un producto de un solo sustrato. En la bioquímica y biofísica, la cooperatividad se define como la perturbación mutua de interacciones entre ligando y la macromolécula (proteína o DNA) en diferentes sitios de unión. La cooperatividad funcional puede deberse a una desviación sustancial de distribución de los sitios de unión, o ser el resultado de la diferencia (neto) de las propiedades funcionales significativas (como la tasa de formación de producto y el equilibrio del estado spin) de los ligandos intermediarios con respecto al sistema en estado no cooperativo. Se ha propuesto entonces, un modelo de dos sitios (en la cavidad del sitio activo) vinculado con el alosterismo de CYP (28). La coalición entre la ocupación múltiple del sitio de unión o regulación ortostérica y el concepto de una enzima oligomérica alostérica, es un mejor modelo pues permite incluso explicar los casos con comportamiento cinético atípico (29).

Cerveza y sus compuestos bioactivos

Anteriormente, se mencionó cómo la alimentación influye en el potencial carcinogénico. Al mismo tiempo, hay alimentos que se han relacionado con propiedades anticancerígenas, como es el caso de la cerveza (8). La cerveza es una bebida milenaria que acorde a datos de la FAO entre 1970 y 2004, ha aumentado su consumo mundial al doble, con pronósticos de crecimiento anual de 1.2% (34). México destaca en su consumo al ser el sexto lugar a nivel mundial y segundo en Latinoamérica, según datos de Cerveceros de México del 2017 (35).

La cerveza es una mezcla compleja, con cientos de diferentes compuestos caracterizados. La ley de pureza de la cerveza de Bavaria del año 1516 (16), indica que los ingredientes básicos son levadura, lúpulo (inflorescencia de *Humulus lupulus*), agua y cebada (gramínea *Hordeum vulgare*). Es una bebida acuosa fermentada basada en almidón y condimentada con lúpulo (fuente de aceites esenciales y resinas). Existen numerosas cepas de levadura, pero son dos las que definen los dos tipos generales de cerveza: *Saccharomyces cerevisiae* para tipo ale y *Saccharomyces pastorianus* para tipo lager. La primera, utilizada desde los Babilónicos, se posiciona en la superficie y prefiere fermentar a una temperatura de 15-26°C. En contraposición, posicionándose en el fondo, la segunda (por su incapacidad para esporular y protegerse contra el frío) puede fermentar a una temperatura de 5-15°C. Esta última es una cepa híbrida que resultó de la cruce entre *S. cerevisiae* y la criotolerante *S. eubayanus*. Dado que la cerveza tipo ale, con su cepa *Saccharomyces cerevisiae* trabaja con temperaturas mayores que la cepa del tipo lager, las reacciones de los procesos metabólicos son más rápidos. La acumulación de compuestos intermediarios suscita la probabilidad de su fuga a través de las paredes celulares; estos subproductos de la fermentación se conocen como congéneres, que añaden sabores y aromas frutales o florales, no siempre deseables. En otras palabras, las mayores temperaturas de fermentación de la cepa *S. cerevisiae* acentúa la tendencia de concentraciones mayores de ésteres y alcoholes superiores; a diferencia de la cerveza lager que tiene un perfil de sabor más suave o menos complejo (36). Otro disímil, es que la cepa original, tolera mayores concentraciones de alcohol, concediendo cervezas de mayor grado alcohólico (37). Sin embargo, la plétora de tipos de cerveza disponibles en el mercado no sólo depende de lo precedente, sino de las variantes de los ingredientes y su procesamiento. Algunos ejemplos de las tipo ale incluyen las cervezas Indian Pale Ale (IPA), Pale Ale, Brown Ale, Porter, Stout, Wheat y Abbey belga; las tipo lager las cervezas Pilsner, Bock, Dunkel, Märzen y oscura. No menos importante, las cervezas sin alcohol también presentan muchos tipos, donde el productor tiene el reto de mantener características organolépticas similares a las cervezas normales.

De manera general, la producción se logra por el impedimento de una fermentación completa o la remoción de alcohol (*cuadro con las especificidades de los métodos de producción usados en la actualidad, en sección ii del apéndice*) (68).

Ciertos constituyentes de la cerveza se derivan de los materiales crudos; mientras que otros son el resultado de transformaciones químicas y bioquímicas durante el malteado, horneado, molienda y maceración, cocción, fermentación y maduración (*esquema de producción en sección iii del apéndice*). Pueden dividirse en volátiles y no volátiles. Los componentes volátiles (que emanan de los aceites esenciales del lúpulo, de las reacciones de desaminación y transaminación de la levadura, de la reacción de Strecker, de la descarboxilación, entre otras fuentes), incluyen alcoholes superiores, alcoholes aromáticos, ésteres, ácidos orgánicos, aldehídos, compuestos carbonílicos, terpenos y compuestos de azufre (dióxido de azufre, sulfuro de hidrógeno, mercaptanos, dimetilsulfuro y orgánicos sulfurados). Los no volátiles pueden incluir sales inorgánicas, polifenoles, resinas de lúpulo, alcoholes como glicerol y tirosol, azúcares, aminoácidos, nucleótidos y nucleósidos (siendo guanosina, uridina y citosina mayoritarios), y sus macromoléculas: polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (38)(39).

Los azúcares que se encuentran en la cerveza van desde la unidad, la glucosa, hasta polisacáridos con más de 250 unidades. A menos de que se añada como colofón, los carbohidratos mayoritarios del producto final no son fermentables. Un 90%, son remanentes de la hidrólisis enzimática del almidón y un 10% son compuestos polisacáridos de las paredes celulares. Del extracto real (una medida del total de sólidos disueltos), el 75-80% son carbohidratos (principalmente dextrinas), sumándose al 6-9% de compuestos nitrogenados, 4-5% de glicerol y glucanos, y un porcentaje restante de compuestos inorgánicos, compuestos fenólicos y sustancias ácidas amargas.

La malta de la cebada y de adjuntos, no sólo son fuente de lípidos, carbohidratos y vitaminas, sino también de compuestos nitrogenados: los mencionados aminoácidos, péptidos y polipéptidos, las aminas (biogénicas, como dimetilamina o tiramina) y los compuestos heterocíclicos; derivados de la reacción de Maillard (azúcares reductores que reaccionaron con aminoácidos en el horneado a temperaturas superiores de los 80°C). Los intermediarios de esta reacción, son los rearreglos de Amadori; los cuales se descomponen en 2-acetilfurano y otros compuestos con anillo de furano. La sustitución por nitrógeno o azufre en el anillo de furano da la formación de piridinas, pirrolizinas, pirroles, maltoxacinas, tiazolinas, tiazoles y tiofenos; de la misma manera, pirazinas, pirazinas alquil sustituidas, furil pirazinas y ciclopentapirazinas. Sólo pocas proteínas estarán en el producto final, por la degradación proteolítica y posterior consumo de aminoácidos por la levadura (con excepción de la prolina); así como por la precipitación de polipéptidos a lo largo de la producción. Otros compuestos nitrogenados en la cerveza son la colina, triptófol y ácido nicotínico. Cabe destacar la ausencia de carcinógenos nitrogenados como las N-nitrosodimetilaminas, dado que el horneado ya no se realiza con fuego directo. Es decir, con valores menores a 0.5 µg/kg, la cerveza producida hoy en día no representa una fuente significativa de nitrosaminas (41).

Asimismo, dos terceras partes de polifenoles provienen de la malta, y la otra tercera del lúpulo. Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos (42)(43). Los polifenoles del lúpulo se encuentran en monómeros, dímeros, trímeros, pero también en formas complejas asociadas a componentes nitrogenados. Un porcentaje importante de polifenoles está en forma monomérica como ácidos hidroxicinámicos (p-cumárico, ferúlico, clorogénico y caféico) y sus derivados, ácidos fenólicos (ej. gálico). En la cerveza tipo ale, el ácido cafeico se encuentra en mayor proporción, mientras que en lager, el ácido gálico. El ácido ferúlico predomina en las cervezas sin alcohol oscura, Abbey, Wheat, Pilsen y Bock (44) (fig.1).

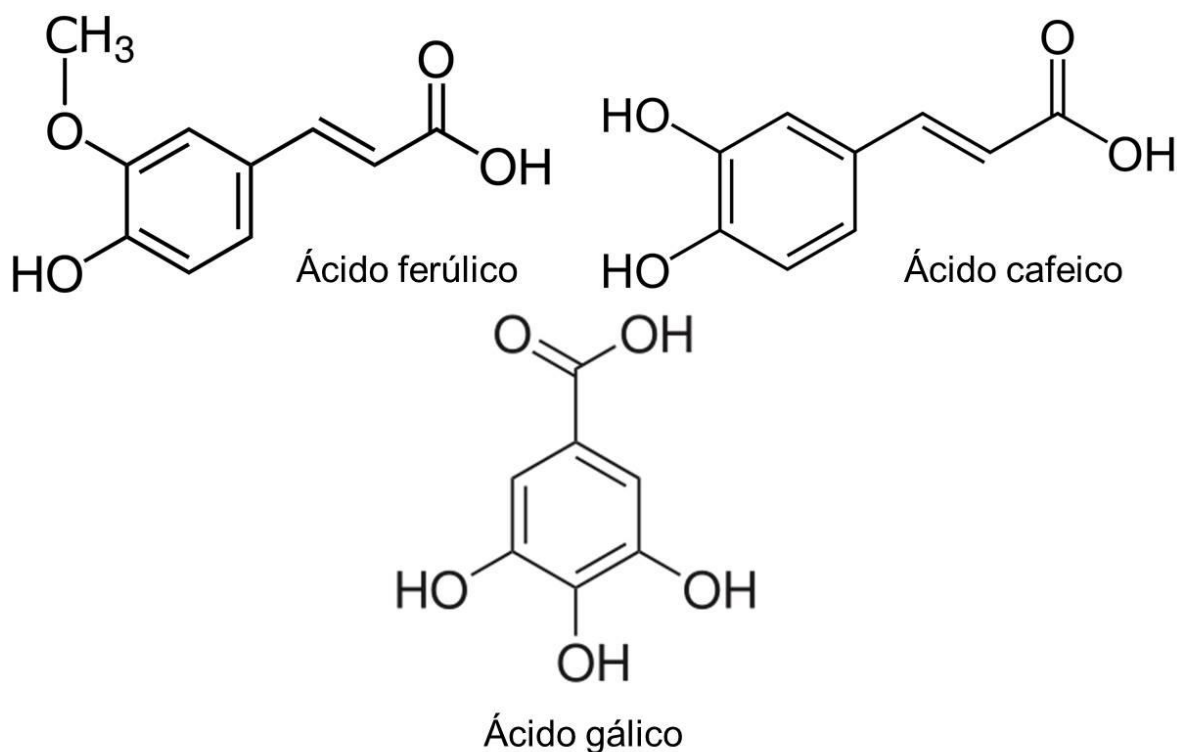


Figura 1. Ácidos monoméricos predominantes en los distintos tipos de cerveza.

Parte de la complicación de la mezcla polifenólica radica en la oxidación y facilidad de polimerización de varios polifenoles; originando las resinas duras (45). Es decir, de las resinas suaves (que son solubles en hexano), rápidamente se forman las resinas duras; por lo que las inflorescencias del lúpulo son rápidamente secadas después de ser cosechadas. La fracción suave de la resina contiene derivados prenilados de floroglucinol: ácidos amargos divididos en alfa (humulonas, cohumulonas, adhumulonas, prehumulonas, adprehumulonas, trans-isocohumulonas, cis-isocohumulonas, trans-isohumulonas, cis-isohumulonas, trans-isoadhumulonas y cis-isoadhumulonas) y beta (lupulonas, colupulonas, adlupulonas, prelupulonas, adprelupulonas, poslupulonas, cohuluponas, huluponas y adhuluponas) (46). Éstos son solubilizados y extraídos durante el hervor del lúpulo con el mosto; etapa en la cual son posteriormente isomerizados oxidativamente a isohumulonas (44)(47). Otra parte de polifenoles, se encuentra

como flavonoides: glicósidos de flavonoles, taninos condensados y prenilflavonoides. Los primeros dos están localizados intracelularmente. Los prenilflavonoides y ácidos amargos son secretados junto con los aceites esenciales por las glándulas de lupulina de las inflorescencias; siendo los segundos los que se encuentran en mayor cantidad (hasta un 30%) (48)(49). Los prenilflavonoides se dividen en: chalconas preniladas y flavanonas preniladas. En los conos del lúpulo, la chalcona prenilada más abundante es el xanthohumol (XH) con 0.5-1.5% de peso seco (50). En menor proporción, los conos también contienen desmetilxanthohumol (DMXH) o tetrahidroxi-3'-prenilchalcona (TP), isoxanthohumol (IXH), 8-prenilnaringenina (8-PN), 6-prenilnaringenina (6-PN), deshidrocicloxanthohumol (DX), hidrato de deshidrocicloxanthohumol (DH), tetrahidroxi-3'-geranilchalcona (TG), 5'-prenilxanthohumol (PX), tetrahidroxanthohumol (TX), x,5'-diprenilxanthohumol (DPX), 6,8-diprenilnaringenina (DPN), xanthogalenol, 6-geranilnaringenina (6-GN) y 8-geranilnaringenina (8-GN) (51).

El contenido de XH en la cerveza tiene rangos variables, pero sustancialmente es bajo. Aunado al DMXH, estas chalconas originan las flavanonas (6-PN, 8-PN e IXH) por isomerización térmica durante el procesamiento (*apéndice sección iv*) (52). Dado que el objetivo de añadir la inflorescencia en la cerveza, es la extracción de ácidos amargos y aceites esenciales, lo cual ocurre en condiciones que favorecen la isomerización del XH, el IXH (que es cuatro veces más soluble) es el que predomina en la cerveza y no el XH. Aumentar la cantidad de XH en la cerveza depende entonces de medidas tecnológicas que inhiban esta isomerización. Ejemplos de éstas son la reducción del tiempo de ebullición, la adición del lúpulo 5-10 minutos antes del final de la ebullición con un inmediato enfriamiento a 80°C, una composición y concentración del mosto de 14-16° Plato, y una disminución del pH durante el proceso de ebullición facilitada por uso de malta colorida. Otras razones de disminución del XH en la cerveza son: su baja solubilidad (precipitación), la extracción deficiente durante la ebullición del mosto, la absorción por la levadura, los filtros (ej. tierra diatomácea) y la presencia de

estabilizadores (ej. sorbentes poliamídicos como la polivinilpolipirrolidona o PVPP) y/o agentes para retirar la calima proteica (ej. ácido tánico) (53). Medidas adicionales para aumentar la cantidad de XH son el enriquecimiento de XH por la adición tardía del lúpulo y la adición de esta inflorescencia en cantidades mayores y/o lúpulos especiales con una relación alta de XH/ α -ácidos.

El lúpulo es relevante en la producción de cerveza así como en la farmacognosia. Se han reportado capacidades anticancerígenas y antimutagénicas tanto de la cerveza como del extracto de lúpulo (54). Los ácidos amargos exhiben potencial anticancerígeno por la inhibición de proliferación celular y angiogénesis, la inducción de apoptosis y por el aumento de expresión de enzimas de desintoxicación CYP450 (55). Por ejemplo, las lupulonas indujeron apoptosis a células metastásicas humanas de colon (56). Asimismo, los prenilflavonoides han demostrado también ser compuestos bioactivos multipotentes. Sus cualidades anticancerígenas se atribuyen a diversos mecanismos; por ejemplo, también tienen la habilidad de inducir enzimas detoxificantes (ej. de fase II quinona reductasa y glutatión S-transferasa), de inhibir la activación metabólica de procarcinógenos, de inhibir las señales inflamatorias de la angiogénesis (previniendo crecimiento del tumor), entre otras (8, 57,58).

Los ensayos de actividad enzimática se utilizan para medir la capacidad de inhibición de los CYP en presencia de prenilflavonoides. Gerhäuser et al. (2002, 2005) reportan para CYP1A (usando etoxicoumarina; sustrato de CYP1A1 y CYP1A2) una capacidad de inhibir la actividad al 50% (IC₅₀) de 0.02 μ M para XH, 0.3 μ M para IXH, 0.09 μ M para 6-PN y 0.07 μ M para 8-PN (59, 60, 61). Wang et al. (2016) informan una IC₅₀ para CYP1A1 de 0.28 μ M para XH, 1.6 μ M para IXH, 0.63 μ M para 6-PN y 0.38 μ M para 8-PN (62). En contraste, Henderson et al. (2000) documentan que la inhibición más potente del CYP1A1 se da por el XH, al inhibir casi por completo con 10 μ M. Asimismo indican que para CYP1A2, los inhibidores más efectivos (>90%) fueron el IXH y la 8-PN con 10 μ M. La IC₅₀ de

IXH y del XH que obtuvo para dicho CYP, fue de 4.5 y 31.4 μM respectivamente, concluyendo que las flavanonas preniladas son más inhibitorias que las chalconas preniladas. Se corroboró la inhibición por parte de éstos dos últimos al disminuir los metabolitos de la aflatoxina B1. El grupo agrega que el XH, IXH y 8-PN son inhibidores pobres del CYP2E1 y CYP3A4 (57); también mediadores en la activación de carcinógenos (8). Yuan et al. (2014) lo ratifican al informar que ni el extracto de lúpulo estandarizado (sin ácidos amargos y con 33.84% XH, 1.77% 6-PN, 0.35% 8-PN y 1.07% IXH), ni los prenilflavonoides aislados (al 1 μM y 10 μM), inhiben el CYP3A4, CYP2D6 ó CYP2E1. Interesantemente, se ha encontrado efecto sinérgico de actividad EROD (7-etoxi-resorufina-detilasa) y PROD (7-pentoxi-resorufina-O-dealquilasa) por complejación heteromérica entre CYP2E1 y CYP1A2 (63). En contrapartida el extracto, sí inhibe moderadamente al CYP1A2 con una IC50 de 9.4 $\mu\text{g/mL}$, siendo la 8-PN el inhibidor más potente con una IC50 de 1.1 μM (9). En comparación con Henderson et al. (2000), ellos sólo encontraron inhibición al 48.2% del IXH con 10 μM , lo que explican se debe al uso de microsomas de hígado humano contra CYP recombinante.

Henderson et al. (2000), analizan la importancia de los factores estructurales que determinan si los flavonoides tendrán actividad inhibitoria. Para CYP1A1 y CYP1A2, no sólo menciona que las flavanonas preniladas son más inhibitorias que las chalconas preniladas; sino también que en general, las flavonas preniladas son de las no preniladas o las isoflavonas. En contraste, ello no significa que, a mayor prenilación, mayor inhibición. El DPX (x,5'-diprenilxanthohumol), con dos grupos prenilo, fue el que menos inhibió al CYP1A2. Con la presencia, posición y número de grupos prenilo, la sustitución de un grupo (ej. prenilo con uno geranilo en una chalcona, del grupo hidroxilo con uno metoxi) o cambio de su posición (flavanona vs. isoflavona), la ciclación del sustituyente prenilo (ej. XH vs DX), la presencia o ausencia del anillo C (IXH y XH) y la hidrogenación del doble enlace en el sustituyente prenilo (TX vs XH); concluyen los autores que no hay una relación consistente entre estructura de prenilflavonoides e inhibición de actividad de las isoformas del P450 humano. Además, con sus datos cinéticos, sugiere otro factor

que complica buscar esa relación: los flavonoides pueden actuar con más de un mecanismo de inhibición; mientras que el XH inhibió no-competitivamente el CYP1A1, inhibió por mecanismo mixto el CYP1A2.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Liofilización de cerveza

La parte inicial del proyecto requirió de la obtención de los extractos de tres tipos de cerveza. Para la cerveza tipo lager se compró la más vendida en el mercado, Corona Extra ®; la sin alcohol, Corona Cero ®; y finalmente la ale, la artesanal Minerva Pale Ale ®. El proceso de sublimación en frío fue realizado en la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, a cargo del Dr. Mauricio Trujillo. El líquido contenido en las muestras se congeló, con una temperatura constante de -78°C, y se sublimó al permitir una presión inferior a 200 Pa. El resultado fue un polvo ligeramente higroscópico de coloraciones amarillas. Éste se almacenó sellado con parafilm a -80 °C para evitar contaminaciones y degradación.

Obtención de fracción S9 y microsomas

La obtención de la fracción S9 y los microsomas del hígado de rata Wistar, fue mediante donación del laboratorio del Dr. Javier Espinosa, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, empleados comúnmente para realizar los ensayos estandarizados de Ames. La manipulación de animales fue realizada por parte de los Técnicos Académicos del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Sin embargo, se tiene registro del protocolo al cual fueron sometidos los animales. Se seleccionaron cuatro ratas machos con un peso entre 200 a 250 gramos. El tratamiento consistió en la administración intraperitoneal de fenobarbital y b-naftoflavona por cuatro días. Se aplicó una dosis de fenobarbital de 60 mg/kg hasta el tercer día, y de 30 mg/kg el día cuatro. Asimismo, se aplicó b-naftoflavona a una dosis de 80 mg/kg los tres primeros días. Se sacrificaron los animales por decapitación con guillotina el día quinto. Momento seguido del punto final, en condiciones estériles, se hizo la extracción del hígado por una incisión con

forma de Y en la cavidad abdominal. Se enjuagaron los órganos con una solución estéril de KCl 0.15 M, y se colocaron en papel aluminio estéril. Las cuatro piezas se guardaron en hielo seco.

Para la obtención de fracción S9, los hígados se dejaron reposar sobre hielo frappe unos minutos. Posteriormente, continuando la cadena de frío, se pesaron para ponerles una cantidad de tres veces su peso de solución de KCl 0.15 M. La homogeneización del tejido comenzó con el troceo de los hígados, y finalizó con el uso del pistilo y su rotor. El banco del homogenado se repartió equitativamente en tubos para centrifuga pareados. La centrifuga se programó para correr durante 15 minutos a 10,000 rpm equivalentes a 9,000 g. Se apartó una alícuota de 15 mL del sobrenadante y se guardó a -80°C.

Finalmente, se prepararon soluciones para la adquisición de microsomas. Una vez se contó con un litro de solución amortiguadora de fosfatos 1 M (PBS), se elaboraron de éste, una solución con sacarosa 0.25 M, y otra con EDTA 1mM, 0.1mM ditiotreititol DTT (estabilizador iónico de proteínas) y glicerol al 20% v/v_(H₂O) (como crioprotector). Los 15 mL de la fracción S9 se descongelaron y se colocaron en tubos de ultracentrifuga. Ya no se requirió trabajar en condiciones estériles, pero el material se esterilizó. La primera centrifugación se realizó a 100,000 g (en el rotor equivalen a 32,500 rpm), por una hora. Se decantó el sobrenadante, dado que no fueron de interés las proteínas citosólicas. El botón se resuspendió en la solución amortiguadora con sacarosa usando un volumen equivalente al sobrenadante decantado. Se homogeneizó con un pistilo más pequeño. Se repitió el procedimiento de la ultracentrifugación con el homogenado, de la decantación y de la resuspensión, pero éste último con la segunda solución amortiguadora y con un volumen mucho menor al decantado, concentrando así la muestra tres veces. Se homogeneizó nuevamente y se guardaron las alícuotas de 100 µL a -80°C.

Cuantificación de proteína en microsomas

Se realizó el método de Bradford para cuantificar los gramos de proteína que hay por volumen de fracción microsomal, y así poder calcular el volumen necesario para el ensayo de inhibición enzimática. Se hizo uso del equipo Synergy® y una placa transparente con capacidad de 96 pocillos para medir la absorbancia con una longitud (λ) de 595 nm. En primer lugar se retiraron los microsomas del ultracongelador, para que se descongelara sobre hielo frappé. Después se preparó una curva patrón por triplicado con estándar de suero de albúmina bovina (BSA) en agua destilada a las siguientes concentraciones: 0.5 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.1 mg/mL y 0 mg/mL (control). Se hicieron las diluciones necesarias de la solución con 1.45 mg/mL de BSA. La fracción microsomal se diluyó 1:100. Se colocaron en los micropocillos 10 μ L de las soluciones con BSA o de la fracción microsomal según correspondía. El colorante azul de Coomassie, presente en la solución del kit “Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate”, se diluyó 1:4 (1 Bradford y 4 de agua), se filtró con Whatman #1 y se vertieron 190 μ L con la micropipeta multicanal a los pocillos ocupados. En este paso se consideró una homogeneización de la mezcla sin la formación de burbujas. Se leyeron las absorbancias en el equipo ubicando la curva y las muestras. Por medio de una interpolación de la regresión lineal, se obtuvo la concentración de la proteína en la muestra de fracción microsomal.

Curva estándar de resorufina

Como en la cuantificación de proteínas, se usó el equipo espectrofotométrico Synergy®, pero en vez de absorbancia se midió fluorescencia, con una λ de 530 nm para excitación y 590 nm para emisión. Se montó sobre una placa negra de 96 pocillos, la curva estándar de resorufina por triplicado, y las curvas de resorufina con una concentración fija de extracto de cada tipo de cerveza por duplicado. Las concentraciones de resorufina fueron de 0, 5, 10, 25, 50, 100 y 500 picomoles.

Considerando las precauciones para minimizar la degradación de los compuestos ante la luz, se disolvieron 0.9 mg de resorufina en un mililitro de dimetilsulfóxido (DMSO) [1]. Posteriormente se tomaron 5 μL de esta solución de 4 μM para diluirlos en 995 μL de DMSO [2]. De la nueva solución de 20 $\text{pM}/\mu\text{L}$ se tomaron 400 μL y se diluyeron en 400 μL de DMSO [3]. Enseguida se tomaron 80 μL de esta última dilución de 10 $\text{pM}/\mu\text{L}$ y al diluirse en 720 μL de DMSO quedó una concentración de un $\text{pM}/\mu\text{L}$ [4]. Finalmente se tomaron las alícuotas para los puntos en la curva, que se resumen en la siguiente tabla:

Concentración pM	μL de las soluciones [2], [3] y [4]	μL DMSO
5	5 de [4]	995
10	10 de [4]	990
25	25 de [4]	975
50	5 de [3]	995
100	10 de [3]	990
250	25 de [3]	975
500	25 de [2]	975

Cuadro 1. Curva estándar de resorufina.

Se preparó la solución amortiguadora de cloruros (BA) con tris base (tris-HCl 50mM) y cloruro de magnesio (MgCl_2 25 mM) ajustando pH a 7.6.

Finalmente, se tomaron 10 μL de cada punto, tomando en cuenta el inicial con concentración de cero pM (10 μL de DMSO), y se completó con solución amortiguadora de cloruros a un volumen final de 250 μL .

Ensayo enzimático con extracto

Se cuantificó la resorufina proveniente de la etoxiresorufina (sustrato de la enzima 7-etoxi-resorufina-O-detilasa; EROD actividad de CYP1A1) y de la metoxiresorufina (de la enzima metoxi-resorufina-O-desmetilasa; MROD actividad de CYP1A2), en presencia de extracto. Para ello se prepararon soluciones de los sustratos, de fracción microsomal, de liofilizado y de NADPH, y se montaron en la placa negra de 96 pocillos, con un volumen final de 300 μ L cada uno.

La cantidad de fracción microsomal fue de 40 μ g de proteínas por pocillo para CYP1A1 y CYP1A2, en un total de 5 μ L con agua destilada. Dicha cantidad se propone gracias a la información obtenida en los trabajos anteriores del grupo de investigación del laboratorio.

Para preparar la solución de etoxiresorufina 50 μ M y de metoxiresorufina 0.5 mM, se disolvieron 0.2 mg y 0.1mg, en un mL de DMSO respectivamente. Como se requieren 5 μ L de etoxiresorufina en 145 μ L de BA y 0.75 μ L de metoxiresorufina en 149 μ L por pocillo según el protocolo estandarizado del laboratorio, se sumaron la cantidad de pocillos a ocupar, para tomar las alícuotas totales de cada reactivo.

Se tomó como concentración máxima 5 mg/mL para los experimentos, dado que es la cantidad máxima recomendada para posteriores ensayos de mutagenicidad de Ames ([64](#)). Se pesaron 0.75 g de liofilizado y se disolvieron en 15 mL de agua destilada. Se tomó una alícuota de 100 μ L de la solución de 50 mg/mL, y se completó a un mililitro. Repitiendo el procedimiento, se obtuvieron diluciones de liofilizado de concentraciones logarítmicas preliminares dentro de los micropocillos de 5, 0.5, 0.05 y 0.005 mg/mL. Los ensayos posteriores buscaron un acercamiento al rango de concentración donde se dilucidaba la IC₅₀ (concentración a la cual se tiene el 50% de actividad de la enzima).

Se realizó la mezcla de las soluciones finales: 5 μ L de microsomas, 100 μ L de extracto, 145 μ L de etoxiresorufina o 149 μ L de metoxiresorufina con su respectivo

BA; y se incubó tres minutos a 37°C en la placa. Además se colocaron controles positivos de reacción (sin la adición de extracto).

Finalmente, por trabajos anteriores del laboratorio, se conoce que se requieren 0.083 mg de NADPH por pozo, es decir, unos 40 µL de una solución 50 mM en BA. Así, con la adición del NADPH a la mezcla, se da inicio a la reacción enzimática. Con una micropipeta multicanal se añadió el NADPH a cada fila en intervalos de 20 segundos. Se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación (550 nm) y emisión (585 nm), en intervalos de 20 segundos durante 30 minutos.

Para el procesamiento de datos, primero se restó la fluorescencia de cada concentración de su respectivo blanco. Utilizando la curva de resorufina se interpola la concentración del metabolito fluorescente formado y en consideración de la cantidad de enzima (mg de proteína), se obtiene la actividad específica. Al ser la formación del metabolito directamente proporcional con respecto al tiempo, se pueden calcular las actividades a las diferentes concentraciones de liofilizado, considerando como 100% a aquella actividad específica del control (pM de metabolito fluorescente/ mg de proteína por minuto), el cual está en ausencia de liofilizado.

Análisis estadístico

Los resultados se muestran como las medias de los triplicados \pm la desviación estándar. Se utilizó el programa GraphPad Prism® para realizar regresión no lineal de cuatro parámetros.

RESULTADOS

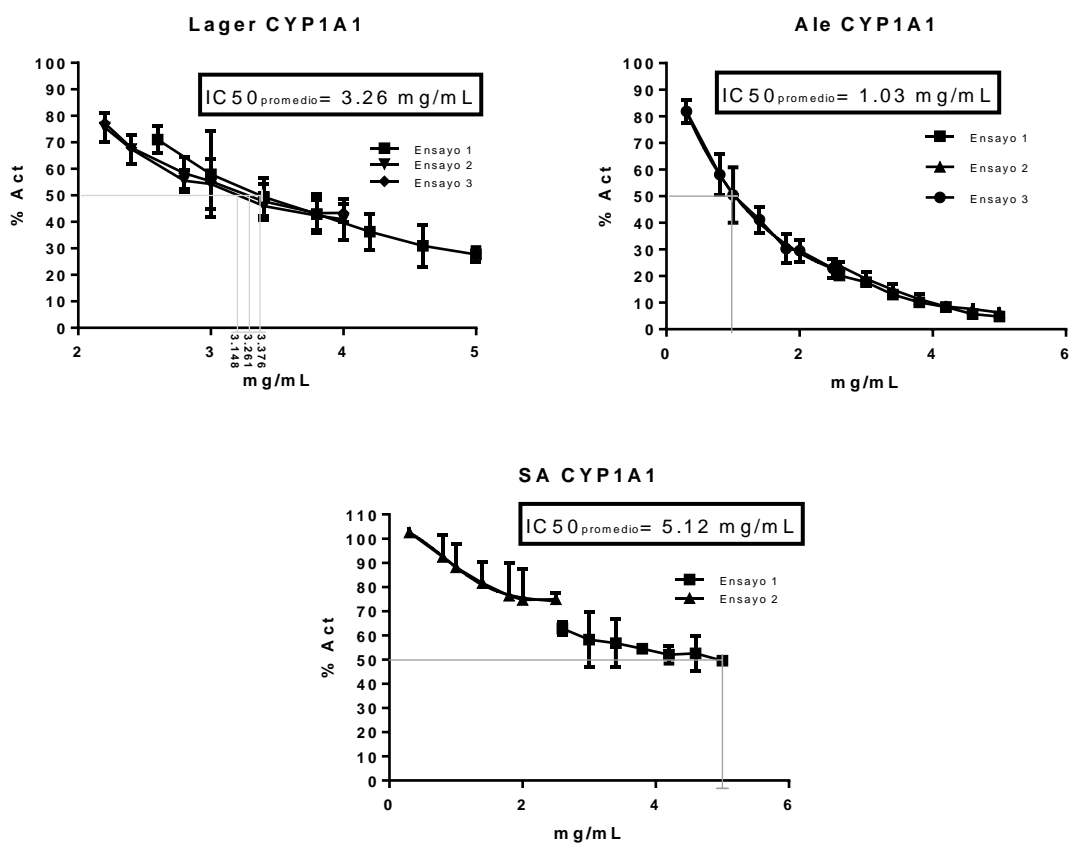


Figura 2. Valores de IC₅₀ de los tres tipos de cerveza para CYP1A1. Se calcularon las actividades tomando como el 100% de actividad el control; al cual no se le añadió liofilizado.

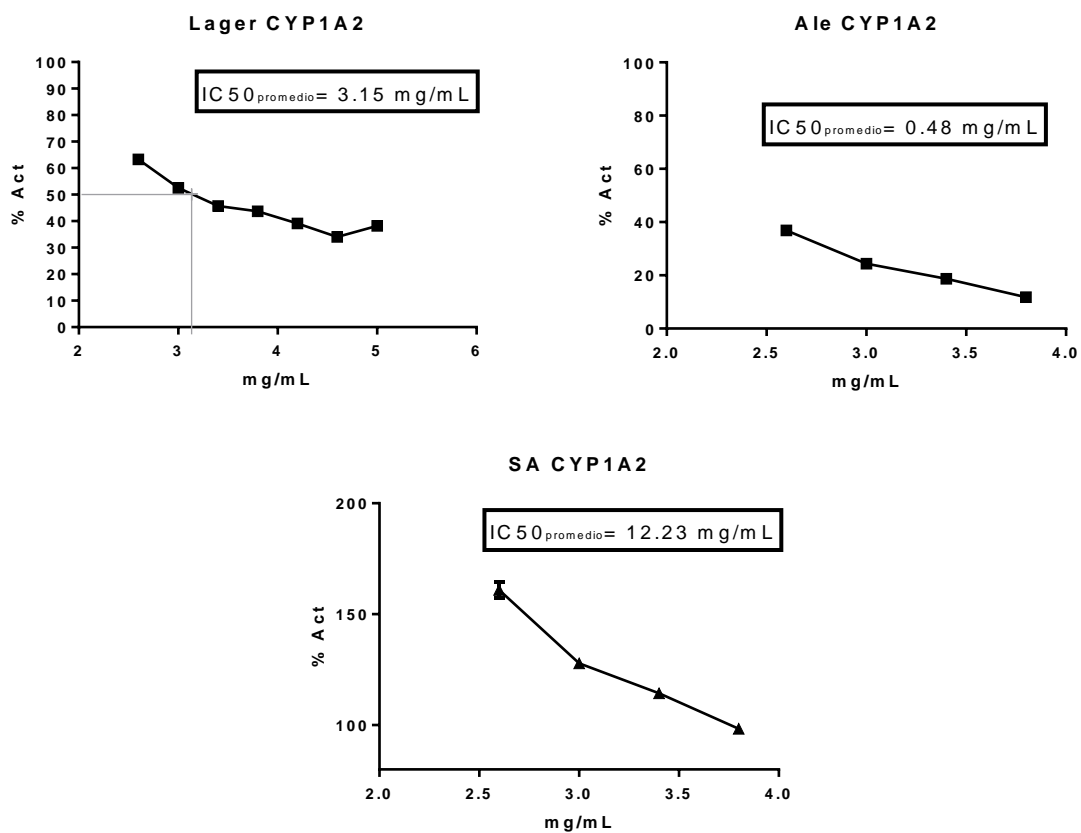


Figura 3. Valores de IC₅₀ de los tres tipos de cerveza para CYP1A2. Se calcularon las actividades tomando como el 100% de actividad el control; al cual no se le añadió liofilizado.

CYP1A1

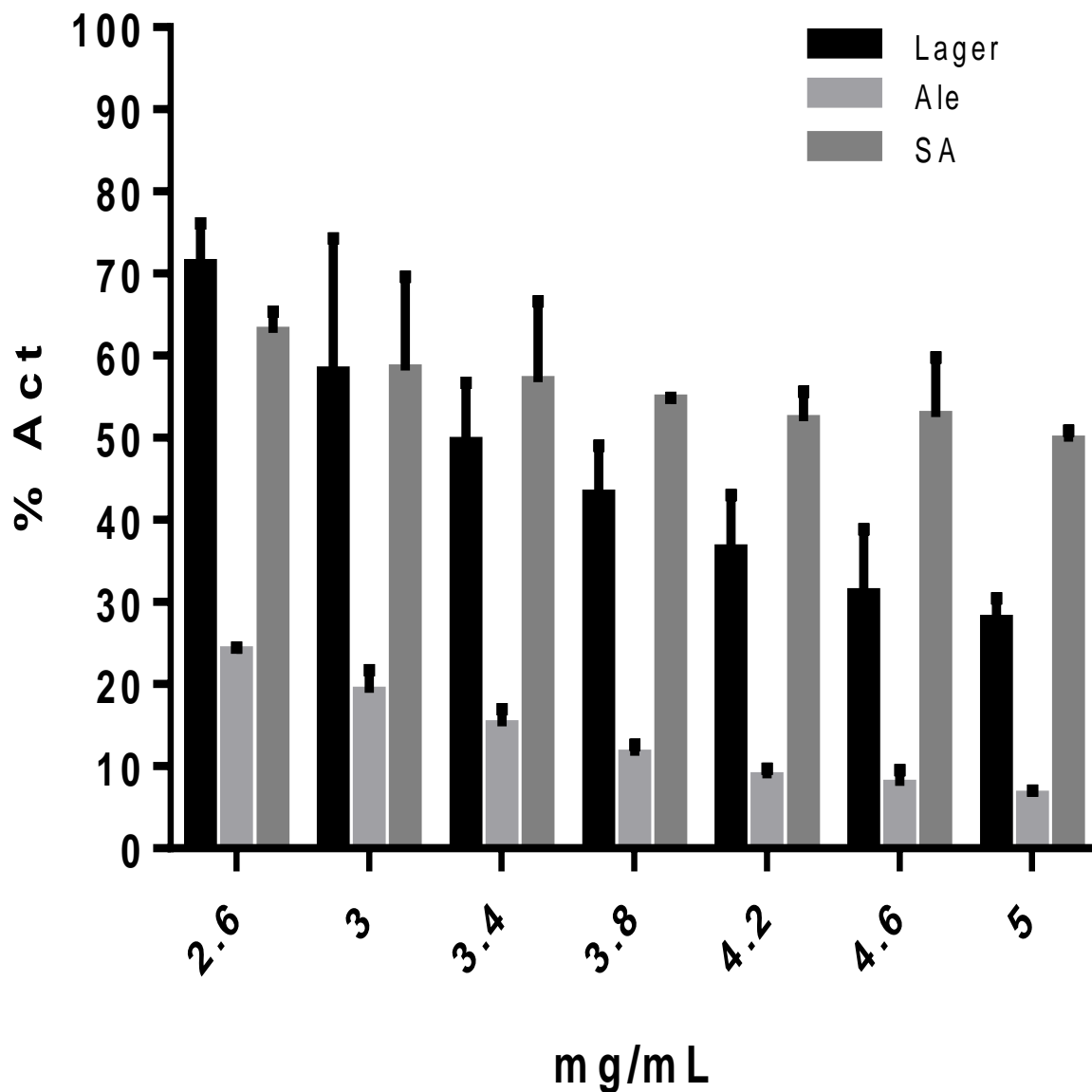


Figura 4. Actividad de las tres cervezas en el rango de concentración de 2.6-5 mg/mL para CYP1A1. Se calcularon las actividades tomando como el 100% de actividad el control; al cual no se le añadió liofilizado.

CYP1A2

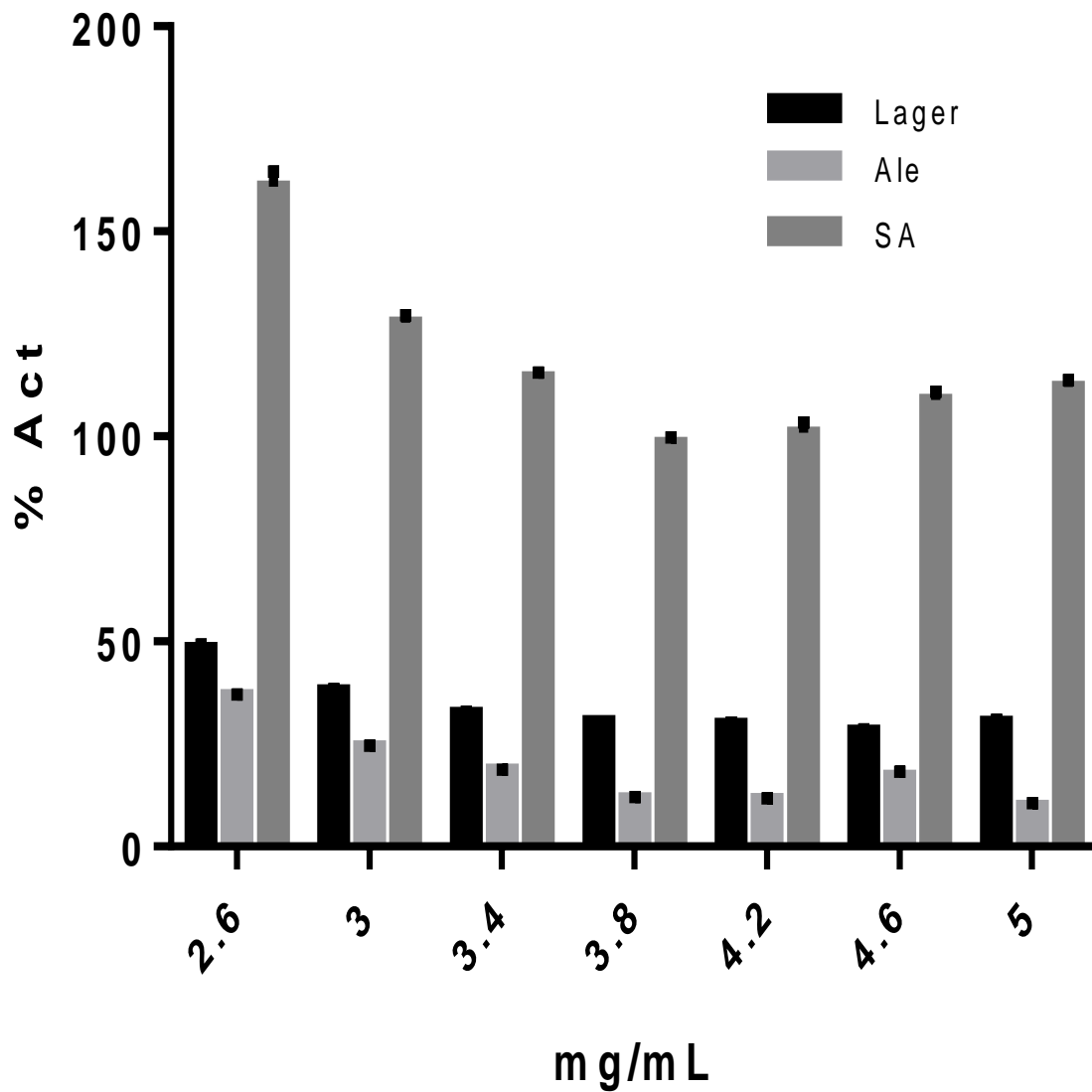


Figura 5. Actividad de las tres cervezas en el rango de concentración de 2.6-5 mg/mL para CYP1A2. Se calcularon las actividades tomando como el 100% de actividad el control; al cual no se le añadió liofilizado.

DISCUSIÓN

La presencia de melanoidinas y su relación con mayor inhibición enzimática

En la literatura se ha reportado inhibición de los CYP1A1 y CYP1A2 por parte de la cerveza completa, por el extracto de lúpulo y por flavonoides aislados. En un estudio, Nozawa et al. (2004), con dos cervezas tipo Pilsner (lager), una negra y una Stout (ale), midieron las actividades de la metoxi-resorufina-O-desmetilasa (MROD) con 20 μ L y un control de alcohol con el mismo volumen. Encontraron inhibición dosis-respuesta para las oscuras pero no para las tipo Pilsner (10). Arimoto et al. (2006) realizaron soluciones de cervezas japonesas (dos tipo lager, una White y otra Stout); precisando μ L-eq como el volumen con la concentración original. Para MROD, la cerveza Stout fue la que más la inhibió con 60 μ L-eq/mL, en segundo lugar una lager con 100 μ L-eq/mL y las restantes con 200 μ L-eq/mL. Para EROD, igualmente la Stout fue la más potente con 80 μ L-eq/mL, en segundo lugar la White con 140 μ L-eq/mL, en tercero una lager con 200 μ L-eq/mL, y por último la otra lager (65). Del mismo grupo cuantificaron por HPLC, metabolito de amina heterocíclica aromática formado en presencia de solución de cerveza (0-0.1 mL equivalente a concentración original) y fracción S9 de ratas tratadas con β -naftoflavona y fenobarbital. Con una incubación de 20 min, se observó una inhibición dosis dependiente de la formación del metabolito; donde la Stout tendía a menor producción de HCA N-hidroxiladas (66). Lo referido en las oraciones anteriores, en las cuales se expone una mayor potencia por parte de las cervezas oscuras, está en concordancia con los resultados obtenidos en los experimentos realizados de este proyecto (fig.2-5); ya que para el caso de CYP1A1, con inhibición dosis dependiente, la cerveza artesanal ale presentó la IC50 más pequeña con 1.03 mg/mL, seguida de la tipo lager con 3.26 mg/mL y la sin alcohol con 5.12 mg/mL (fig.2). El caso del CYP1A2 fue semejante; aunque presentó un comportamiento polifásico, conservó la tendencia de mayor inhibición por parte de la cerveza oscura. Si se consideran los puntos del rango dinámico o

donde se respeta la tendencia dosis-respuesta proporcional, la IC50 de la cerveza ale es de 0.48 mg/mL, seguida de la lager con 3.15 mg/mL y finalmente la sin alcohol con 12.23 mg/mL (fig. 3).

Las cervezas oscuras presentan dicha coloración por la reacción entre aminas o aminoácidos y compuestos carbonílicos, especialmente azúcares reductores. Esas aldosaminas y cetosaminas, productos de Amadori, se fragmentan en compuestos UV absorbentes como hidroximetilfurfural, aldehídos de Strecker, pirazinas o compuestos dicarbonílicos. Posteriormente hay ciclaciones, deshidrataciones, retroaldosilaciones, rearreglos, isomerizaciones y condensaciones, durante las etapas de horneado y ebullición del mosto, que introducen compuestos coloridos (melanoidinas) de bajo peso molecular (BPM) (<10 kDa); en proporciones que dependen del tiempo y temperatura del tostado de la malta. La formación de compuestos de alto peso molecular (APM) (>300 kDa) ocurren en las etapas finales de la reacción de Maillard, por polimerización de intermediarios altamente reactivos de compuestos de BPM. La estructura de las melanoidinas depende de la composición matricial de la comida: pueden dividirse en melanosacáridos (esqueletos compuestos principalmente de polisacáridos) y melanoproteínas (esqueletos compuestos principalmente de proteínas). La cebada como material crudo conduciría a melanosacáridos, que por su carga negativa son más hidrosolubles; a comparación de las melanoproteínas más insolubles (40). Las cervezas claras se caracterizan por tener compuestos de BPM color café claro, mientras que las oscuras, compuestos de APM de color café intenso (67).

Las altas temperaturas de las diversas etapas del proceso, ocasionan un decremento de compuestos fenólicos; por su degradación, polimerización (como proantocianidinas), por inactivación de enzimas (que las liberarían de paredes celulares) y porque se pueden quedar atrapados dentro de la estructura de las melanoidinas (al formar complejos) (50). Sin embargo, el producto final sí tiene contenido de polifenoles totales (TPC), con la mayor cantidad en las cervezas

oscuras. En general, las cervezas ale presentan mayores niveles de TPC que las lager, pero la cepa de levadura no se involucra crucialmente en la explicación. Las cervezas sin alcohol, por otro lado, tienen los niveles más bajos de polifenoles y melanoidinas. Esto se explica por la manera de producción de las cervezas sin alcohol. Las técnicas incluyen: menor extracto de mosto, uso de otras cepas (ej. *Williopsis saturnus*), inhibición de la formación alcohólica, o remoción del alcohol en el último paso (68). En la remoción de alcohol, también se llegan a remover los polifenoles. Para mantener polifenoles, se requieren técnicas como ósmosis reversa o uso de membranas. Hay una correlación directa entre TPC y contenido de melanoidinas (69). Los polifenoles que interesan en este trabajo son los prenilflavonoides por su capacidad de inhibición de los CYP1A1 y CYP1A2. Se ha reportado inhibición potente del CYP1A1 principalmente por parte del XH y 6-PN (57,62), e inhibición destacada del CYP1A2 por parte del IXH y la PN-8 (57, 9). Aunque el XH es el mayor componente del lúpulo, el IXH es el que se encuentra en mayor proporción en la cerveza convencional. La cantidad de XH es mayor entre más contenido de malta tostada haya, o mayor color presente la cerveza. Aunque la concentración de XH es baja, hay una distinción entre cervezas claras, donde usualmente no excede de 0.1 mg/L, de las cervezas oscuras, que contienen 1 mg/mL (53). Ello se debe al efecto transportador de las melanoidinas de APM; i.e., al formar complejos y quedar atrapados dentro de sus estructuras, protegen al XH de la isomerización, de los agentes estabilizadores como el PVPP y/o de la absorción por la levadura y en la filtración de ésta (70)(52). En otras palabras, los polifenoles forman parte de la formación de las melanoidinas, y consecuentemente una porción de éstos, quedan unidos a sus estructuras (71)(69)(43)(72)(73). En promedio, el contenido de compuestos fenólicos es mayor en los melanosacáridos que las melanoproteínas (40).

Lo precedente justifica que la cerveza oscura tenga la menor IC50 del CYP1A1. Si bien el XH no es un inhibidor potente para CYP1A2, la tendencia de mayor inhibición puede ser resultado de otros prenilflavonoides coordinados con las

melanoidinas; que son más potentes en su capacidad de inhibición para con el CYP1A2, y/o su presencia favorecer interacciones sinérgicas.

Comportamiento no monofásico por inhibición dependiente del tiempo del CYP1A2

Mientras que el citocromo CYP1A1 mostró un comportamiento monofásico dosis dependiente (fig.4), el CYP1A2 lo mostró polifásico no lineal (fig.5). La cerveza lager, sí logró reflejar una tendencia dosis dependiente monofásica; sin embargo, fue menos estable que con el CYP1A1, al aumentar ligeramente la actividad en la concentración de 5 mg/L. La volubilidad se atribuye a la inhibición dependiente del tiempo (TDI) que se ha descrito para este citocromo ([10,9,74,75](#)). TDI es un término colectivo para indicar cambio (generalmente en aumento) en potencia de los inhibidores del CYP, durante una incubación in vitro o periodo de dosificación in vivo. Se basa en mecanismos que incluyen la formación de más metabolitos inhibitorios y la inhibición basada en mecanismo (MBI): inactivación de CYPs por productos metabólicos que forman aductos irreversibles con la apoproteína o con el grupo hemo (inhibición “suicida”), o coordinando como agente quelante con éste último; logrando un complejo metabólico inhibitorio (MIC) cuasi-reversible ([76](#)) Dicho de otra manera, TDI es un término cinético que indica la inhibición de la enzima aumenta después de la preincubación con la enzima ([74](#)). Por eso, Nozawa et al. (2004) incubaron por tres horas la muestra de cerveza con este citocromo. En los ensayos realizados de este trabajo no se infirió mayor tiempo de incubación fuera necesario porque con el tiempo predeterminado para la reacción, se obtuvo la zona directamente proporcional de formación de producto fluorescente.

Como se muestra en el esquema del apéndice (*sección iv*), el IXH puede ser convertido metabólicamente por el CYP1A2 con una O-desmetilación al derivado

5-O-metil, la 8-PN. No se limita al CYP1A2 (abundante en el hígado) (77), ya que también el microbioma intestinal puede lograr esta catálisis (9). En el hervidor, mientras que el XH con su hidroxilo libre participa en una ciclación para isomerizarse en IXH, el DMXH, con sus dos grupos hidroxilo libres (orto relativos al C-1'), se isomeriza a 6-PN y 8-PN (78). Por ello el 8-PN no es abundante en los extractos frescos de lúpulo (60,78,79).

Yuan et al. (2014) observó inactivación parcial del CYP1A2 al preincubar con su extracto de lúpulo estandarizado. A comparación del XH, la 8-PN (inhibidor más potente del mismo CYP) no mostró TDI al ser preincubado. La formación del metabolito inhibitorio 8-PN, a partir del IXH por medio del CYP1A2, explica el fenómeno de inestabilidad. Es decir, lo que se observa es la competencia entre los sustratos del CYP1A2, la metoxiresorufina y el IXH, reflejados en una cinética atípica (80). El IXH podría actuar como agonista alostérico bitópico, uniéndose tanto al sitio alostérico como al ortostérico (31). O quizás el TDI se atribuye a una unión no específica alostérica con la enzima (74). Cuando un efector también es un sustrato, la inhabilidad del sustrato para desplazar al efector del sitio activo y viceversa, sugiere que ambos compuestos están unidos simultáneamente al sitio activo del P450 (30).

Hormesis por alosterismo o cambios conformacionales

En ausencia de inhibición, se esperaría obtener el 100% de actividad (igualable al control). Sin embargo en la fig.4, la cerveza sin alcohol estimula al CYP1A2 logrando se rebase el 100% de actividad. La concentración menor, de 2.6 mg/mL es la que mayor actividad indujo. Un comportamiento similar lo había anunciado Arimoto et al. (2006), al apreciar un aumento de actividad de la etoxiresorufina-O-detilasa a bajas concentraciones de solución de cerveza (65).

Este fenómeno modelado por una curva dosis-respuesta bifásica, se puede explicar con el concepto de hormesis. Éste se define como la capacidad de una sustancia química (ya sea por estimulación directa, por respuesta estimuladora sobrecompensadora (81) y/o por sinergismo (82)), para inducir efectos opuestos en dosis contrarias. Sucede pues, que comúnmente se obtiene un efecto estimulador y/o beneficioso a dosis bajas y uno inhibitorio y/o tóxico a dosis altas, o vice versa. La hormesis puede presentarse *in vivo*, al observar que en dosis subtóxicas se detonan mecanismos de estrés celular ligero. Las rutas horméticas impulsadas por fitoquímicos pueden abarcar la activación de cinasas, desacetilasas, canales iónicos y factores de transcripción que inducen la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes, detoxificantes de las fases I y II, proteínas chaperonas, factores neurotróficos, y otras proteínas citoprotectoras. Por ejemplo las rutas sirtuina-FOXO, NF-κB y Nrf-2/ARE; siendo esta última la más involucrada con los prenilflavonoides (83). No obstante, en el presente proyecto sólo se experimentó *in vitro*. Por lo que la hormesis que explicaría los resultados obtenidos sería por mecanismos de alosterismo; i.e. en la dependencia entre sustrato y efector, éste segundo puede ser activador a bajas concentraciones e inhibidor en concentraciones altas (84).

Un agente hormético puede ejercer una acción funcional al receptor al alterar sutilmente cómo el ligando ortostérico ejerce sus efectos; afectando la afinidad o constante de disociación del ligando ortostérico por su sitio de unión primario o alterando la habilidad del ligando ortostérico para estabilizar/inducir conformaciones activas del receptor. La modulación alostérica también puede mediar acciones horméticas al inducir un cambio en la homeostasis estequiométrica del ligando-receptor. Un inhibidor alostérico puede conducir al decremento parcial o total de la eficacia funcional del receptor, independientemente del ligando disponible; o lo contrario, activadores alostéricos que favorecen la función del ligando ortostérico (85).

En otras palabras, la cinética atípica no Michaeliana correspondiente a la curva bifásica, puede resultar de efectos homo y heterotrópicos. Cooperatividad funcional homotrópica y heterotrópica, es la perturbación de actividad de la enzima con respecto a la molécula del sustrato por la unión de otra molécula del mismo o diferente tipo, respectivamente. Es decir, los efectos homotrópicos se deben a que el ligando actúa tanto como sustrato y efector, mientras que los heterotrópicos es por parte de un ligando que altera las interacciones del CYP con el otro ligando, ya sea activando o inhibiendo la formación del producto. Un efector es aquella molécula que al unirse con la proteína, afecta su actividad biológica. Por ejemplo, un efector puede activar el metabolismo de un ligando A, y ese mismo inhibir o no tener efecto sobre el metabolismo de un ligando B, para ese mismo CYP. Además una sola molécula efectora puede pasar de ser un activador en concentraciones bajas, a ser un inhibidor en concentraciones altas. La cinética atípica no Michaeliana con patrones alostéricos complejos se revela por el comportamiento del efector, que no sólo depende de que sea o no una molécula específica, sino del sustrato a ser metabolizado (28), de los radios estequiométricos entre sustrato y efector, de cambios en la regio y estereoespecificidad de las transformaciones catalíticas, de la presencia de iones metálicos, de la incorporación membranal, de la formación de homo- y hetero-oligómeros y de las interacciones con pares redox (29). Esos procesos cinéticos atípicos pueden ser agrupados en cinco categorías: activación, autoactivación, inhibición parcial, y curvas de saturación bifásicas. Activación es el aumento en la velocidad de la reacción en presencia de otro compuesto. Autoactivación (por efecto homotrópico) ocurre cuando el activador es por si mismo el sustrato. Inhibición parcial significa que las concentraciones de saturación del inhibidor, no inhiben por completo el metabolismo del sustrato. Inhibición por sustrato ocurre cuando el aumento en la concentración de sustrato decrementa la tasa del metabolismo de la enzima. La curva bifásica ocurre cuando una enzima tiene un componente con bajo K_m y V_{max} y otro con alto (30). Adicionalmente, cooperación positiva se define como el incremento de afinidad de unión en un sitio cuando el otro está ocupado; y

cooperatividad negativa cuando el segundo evento de unión está desfavorecido. Una tercera, es la modulación alostérica silenciosa, cuyo efecto es neutral (31).

El comportamiento sinérgico (efectos no aditivos por la acción simultánea de dos sustratos) se observa por la cooperatividad homotrópica o heterotrópica. Ésta está documentada para receptores de membrana mono y oligoméricos, donde el segundo o tercer efector alostérico puede unirse con menor afinidad que el primero, pero la respuesta funcional del receptor cambia drásticamente sólo después del evento de unión de este segundo o tercer ligando; i.e. el primer ligando se une con gran afinidad, pero refleja un espectro silencioso, porque la respuesta funcional fuerte depende de la unión de los posteriores. Como se refirió en el párrafo anterior, este comportamiento alostérico se complica al alterar las propiedades de los pasos catalíticos, como la variación de la estequiometría del sustrato, observado en algunos citocromos (32)(33).

En la literatura se reporta este comportamiento bifásico para CYP1A2, por los flavonoides quercetina y naringenina. En bajas concentraciones, éstos estimularon las actividades de EROD y MROD, mientras que en altas lo inhibieron (86). Interesantemente, la naringenina tiene una zona de flavanona como la 8-PN; con la excepción de que carece el grupo prenilo en la posición del C-8. Semejantemente, se ha comunicado que los flavonoides pueden actuar como moduladores alostéricos positivos o negativos, promoviendo o reduciendo la activación de GABA (87). Los prenilflavonoides (en el orden 8-PN>IXH>XH), efectúan modulación positiva sobre los receptores GABA_A en concentraciones micromolares bajas (88). Asimismo, la epigallocatequina gallate (EGCG) en los receptores GABA_A, a bajas concentraciones actúa como un segundo modulador del fármaco diazepam (primer modulador), pero inhibe la acción de éstos en concentraciones altas (89). Flavonoides como la epigallocatequina, también tienen la capacidad de unirse al sitio ortostérico de la P-glicoproteína (P-gp), y así en concentraciones bajas, estimular su actividad de transporte e inhibir en

concentraciones altas ([90](#)). Finalmente, se conoce que la actividad de CYP3A4 por ejemplo, aumenta a bajas dosis del polisacárido lentinano, y viceversa ([91](#)).

CONCLUSIONES

En este trabajo se propuso medir la inhibición de actividad de los citocromos CYP1A1 y CYP1A2, por parte de liofilizados de tres cervezas representativas del mercado nacional; del tipo ale, lager y sin alcohol. Considerando el factible mecanismo de genoprotección por la obstaculización de activación de promutágenos, los resultados de esta investigación son de utilidad para posteriores ensayos de mutagenicidad de Ames.

La cerveza tipo ale, de coloración café intenso fue la que inhibió más potentemente a ambos CYPs. Con una IC50 de 1.032 mg/mL para el CYP1A1 y una IC50 de 0.48 mg/mL para CYP1A2, la explicación posible es mediante el acarreamiento de los prenilflavonoides atorados dentro de las estructuras de las melanoidinas. La mayor concentración de estos polifenoles consecuentemente llevó a una mayor inhibición. La cerveza sin alcohol por otro lado, fue la menos potente con una IC50 de 5.12 mg/mL para CYP1A1 y una IC50 de 12.23 mg/mL para CYP1A2; debido a que parte de su procesamiento en la remoción de alcohol, difícilmente evita también que se remuevan los prenilflavonoides.

Asimismo, se explicó la razón por la cual la ausencia de comportamiento monofásico dosis-dependiente se obtuviera del CYP1A2. Ya que aunque la cerveza lager fuese la más estable y tuviese una IC50 semejante a la que tuvo con el CYP1A1, se puede apreciar la tendencia de inestabilidad propio del efecto TDI. Ese fenómeno probablemente surgió por la competencia de sustrato; al tener el CYP1A2 capacidad para metabolizar el inhibidor IXH y obtener el 8-PN, un metabolito inhibitorio más potente.

Finalmente, los resultados mostraron una estimulación del CYP1A2 por parte de la cerveza sin alcohol. Recordando que las concentraciones de prenilflavonoides de dicho liofilizado son bajas, ello nos permitiría proponer como explicación la posibilidad de que estos polifenoles funcionen como efectores alostéricos que desencadenan el fenómeno hormético bifásico observado.

BIBLIOGRAFÍA

1. DeMarini, D.M. (2020). *The mutagenesis moonshot: The propitious beginnings of the environmental mutagenesis and genomics society*. *Environ Mol Mutagen*, 61: 8-24. doi:10.1002/em.22313
2. A. Kappas. (2012). *Mechanisms of Environmental Mutagenesis-Carcinogenesis*. Springer Science & Business Media. p. 3.
3. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). *Cancer statistics, 2020*. CA: *A Cancer Journal for Clinicians*. doi:10.3322/caac.21590
4. Gobierno de México. (2019). *El cáncer en el mundo y México*. <https://www.infocancer.org.mx/?c=conocer-el-cancer&a=estadisticas-mundiales-y-locales#sup2>
5. McKinnon, R. A., Sorich, M. J., & Ward, M. B. (2008). *Cytochrome P450 Part 1: Multiplicity and Function*. *Journal of Pharmacy Practice and Research*, 38(1), 55–57. doi:10.1002/j.2055-2335.2008.tb00798.x
6. Mugica, V., Hernández, S., Torres, M., & García, R. (2010). *Seasonal Variation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure Levels in Mexico City*. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 60(5), 548–555. doi:10.3155/1047-3289.60.5.548
7. Stewart, Graham. (2018). *Brewing and Distilling Yeasts*. Springer. p. 38.
8. Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., & Rezaei, K. (2012). *Health-Related Aspects of Beer: A Review*. *International Journal of Food Properties*, 15(2), 350–373. doi:10.1080/10942912.2010.48762
9. Yuan, Y., Qiu, X., Nikolić, D., Chen, S. N., Huang, K., Li, G., Pauli, G. F., & van Breemen, R. B. (2014). *Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by hops (*Humulus lupulus*) and hop prenylphenols*. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 53, 55–61. doi.org/10.1016/j.ejps.2013.12.003
10. Nozawa, H., Tazumi, K., Sato, K., Yoshida, A., Takata, J., Arimoto-Kobayashi, S., & Kondo, K. (2004). *Inhibitory effects of beer on heterocyclic amine-induced mutagenesis and PhIP-induced aberrant crypt foci in rat colon*.

- Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 559(1-2), 177–187. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.01.008
11. Calvey, N. (2005). *Enzyme inducers and inhibitors: addition, subtraction and synergism. Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 6(4), 139–140. doi:10.1383/anes.6.4.139.63630
 12. Berthoud, H.-R. (2013). *Synergy: A Concept in Search of a Definition. Endocrinology*, 154(11), 3974–3977. doi:10.1210/en.2013-1420
 13. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman.
 14. Klaunig, J. E. and L. M. Kamendulis (2010). *Carcinogenicity. Comprehensive Toxicology*. Oxford, Elsevier. p. 24.
 15. Basu, A. (2018). *DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 970. doi:10.3390/ijms19040970
 16. Ferguson, L. R. (2002). *Natural and human-made mutagens and carcinogens in the human diet. Toxicology*, 181-182, 79–82. doi:10.1016/s0300-483x(02)00258-5
 17. National Research Council (US) Committee on Diet, Nutrition, and Cancer. (1982). *Diet, Nutrition, and Cancer. Washington (DC): National Academies Press (US). 13 Mutagens in Food.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK216630/>
 18. Nagao, M., Sugimura, T., & Matsushima, T. (1978). *Environmental Mutagens and Carcinogens. Annual Review of Genetics*, 12(1), 117–159. doi:10.1146/annurev.ge.12.120178.001001
 19. Mugica, V., Hernández, S., Torres, M., & García, R. (2010). *Seasonal Variation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure Levels in Mexico City. Journal of the Air & Waste Management Association*, 60(5), 548–555. doi:10.3155/1047-3289.60.5.548
 20. Guengerich, F. P., Martin, M. V., Sohl, C. D., & Cheng, Q. (2009). *Measurement of cytochrome P450 and NADPH–cytochrome P450 reductase. Nature Protocols*, 4(9), 1245–1251. doi:10.1038/nprot.2009.121

21. Werck-Reichhart, D., & Feyereisen, R. (2000). *Genome Biology*, 1(6), reviews3003.1. doi:10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003
22. McDonnell, A. M., & Dang, C. H. (2013). *Basic review of the cytochrome p450 system. Journal of the advanced practitioner in oncology*, 4(4), 263–268. doi: 10.6004/jadpro.2013.4.4.7
23. Cederbaum A. I. (2015). *Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. Redox biology*, 4, 60–73. doi: 10.1016/j.redox.2014.11.008
24. Pereira, S. A., Wanke, R., Marques, M. M., Monteiro, E. C., & Antunes, A. M. M. (2012). *Insights into the Role of Bioactivation Mechanisms in the Toxic Events Elicited by Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. Advances in Molecular Toxicology*, 1–39. doi:10.1016/b978-0-444-59389-4.00001-x
25. James P Hardwick. (2015). *Cytochrome P450 Function and Pharmacological Roles in Inflammation and Cancer*. Elsevier Academic Press. p. 4
26. Liu, J., Tawa, G. J., & Wallqvist, A. (2013). *Identifying cytochrome p450 functional networks and their allosteric regulatory elements. PloS one*, 8(12), e81980. doi: 10.1371/journal.pone.0081980
27. Mark P. Mattson, Edward J. Calabrese. (2009). *Hormesis: A Revolution in Biology, Toxicology and Medicine*. Springer Science & Business Media. p. 100
28. Shakunthala, N. (2009). *New cytochrome P450 mechanisms: implications for understanding molecular basis for drug toxicity at the level of the cytochrome. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6(1), 1–15. doi:10.1517/17425250903329095
29. Davydov, D. R., & Halpert, J. R. (2008). *Allosteric P450 mechanisms: multiple binding sites, multiple conformers or both?. Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 4(12), 1523–1535. doi:10.1517/17425250802500028
30. Korzekwa, K. R., Krishnamachary, N., Shou, M., Ogai, A., Parise, R. A., Rettie, A. E., Tracy, T. S. (1998). *Evaluation of Atypical Cytochrome P450 Kinetics with Two-Substrate Models: Evidence That Multiple Substrates Can*

- Simultaneously Bind to Cytochrome P450 Active Sites. Biochemistry, 37(12), 4137–4147. doi:10.1021/bi9715627*
31. Wenthur, C. J., Gentry, P. R., Mathews, T. P., & Lindsley, C. W. (2014). *Drugs for allosteric sites on receptors. Annual review of pharmacology and toxicology, 54, 165–184. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134525*
 32. Karl M. Kadish. (2010). *Porphyrin Science: With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine*. World Scientific. p. 171
 33. Denisov, I. G., & Sligar, S. G. (2012). *A novel type of allosteric regulation: Functional cooperativity in monomeric proteins. Archives of Biochemistry and Biophysics, 519(2), 91–102. doi:10.1016/j.abb.2011.12.017*
 34. FAO. (2009) *Agribusiness handbook Barley Malt Beer*. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/tci/docs/AH3_BarleyMaltBeer.pdf
 35. Cerveceros de México. (2017). *¿Cuánta cerveza se consume en México?* <https://cervecerosdemexico.com/2017/04/20/cuanta-cerveza-se-consume-en-mexico/>
 36. Tom Colicchio, Charles Bamforth, George Philliskirk, Keith Villa, Wolfgang Stempf, Patrick Hayes. (2011) *The Oxford Companion to Beer*. Oxford University Press. p. 128
 37. Graham G. Stewart. (2017). *The Yeast Handbook. Brewing and Distilling Yeasts*. Springer International Publishing. p. 37
 38. Humia, B. V., Santos, K. S., Barbosa, A. M., Sawata, M., Mendonça, M., & Padilha, F. F. (2019). *Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review. Molecules (Basel, Switzerland), 24(8), 1568. doi: 10.3390/molecules24081568*
 39. D.E. Briggs, J.S. Hough, R. Stevens, Tom W. Young. (1982). *Malting and Brewing Science: Hopped Wort and Beer*. Springer Science & Business Media. p. 716.
 40. Alves, G., Xavier, P., Limoeiro, R., & Perrone, D. (2020). *Contribution of melanoidins from heat-processed foods to the phenolic compound intake and*

- antioxidant capacity of the Brazilian diet. Journal of Food Science and Technology.* doi:10.1007/s13197-020-04346-0
41. Wiley-VCH. (2017). *Ullmann's Food and Feed, 3 Volume Set, Volumen 2.* John Wiley & Sons. p. 234
 42. Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hospitalaria, 27(1), 76-89.* http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009&lng=es&tlng=es.
 43. Wannemacher, J., Gastl, M., & Becker, T. (2018). *Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 17(4), 953–988.* doi:10.1111/1541-4337.12352
 44. Buiatti, S. (2009). *Beer Composition: An Overview. Beer in Health and Disease Prevention, 213–225.* doi:10.1016/b978-0-12-373891-2.00020-1
 45. De Keukeleire, Denis. (2000). *Fundamentals of beer and hop chemistry. Química Nova, 23(1), 108-112.* doi: 10.1590/S0100-40422000000100019
 46. Hsu, Y.-Y., & Kao, T.-H. (2019). *Evaluation of prenylflavonoids and hop bitter acids in surplus yeast. Journal of Food Science and Technology, 56(4), 1939–1953.* doi:10.1007/s13197-019-03660-6
 47. Stevens, J. F., Miranda, C. L., Buhler, D. R., & Deinzer, M. L. (1998). *Chemistry and Biology of Hop Flavonoids. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 56(4), 136–145.* doi:10.1094/asbcj-56-0136
 48. Stevens, J. F., Taylor, A. W., & Deinzer, M. L. (1999). *Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 832(1-2), 97–107.* doi:10.1016/s0021-9673(98)01001-2
 49. Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., & Heyerick, A. (2009). *Hop (Humulus lupulus)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. Journal of Natural Products, 72(6), 1220–1230.* doi:10.1021/np800740m

50. Martinez-Gomez, A., Caballero, I., & Blanco, C. A. (2020). *Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. Biomolecules*, 10(3), 400. doi: 10.3390/biom10030400
51. Stevens, J. F., Ivancic, M., Hsu, V. L., & Deinzer, M. L. (1997). *Prenylflavonoids from Humulus lupulus. Phytochemistry*, 44(8), 1575–1585. doi:10.1016/s0031-9422(96)00744-3
52. Mudura, E., & Coldea, T. (2015). *Hop-Derived Prenylflavonoids and Their Importance in Brewing Technology – A Review. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 72(1). doi:10.15835/buasvmcn-fst:11198
53. Karabín, M., Jelínek, L., Kinčl, T., Hudcová, T., Kotlíková, B., & Dostálek, P. (2013). *New approach to the production of xanthohumol-enriched beers. Journal of the Institute of Brewing, n/a–n/a*. doi:10.1002/jib.71
54. Knez Hrnčič, M., Španinger, E., Košir, I. J., Knez, Ž., & Bren, U. (2019). *Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. Nutrients*, 11(2), 257. doi: 10.3390/nu11020257
55. Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., & Heyerick, A. (2009). *Hop (Humulus lupulus)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. Journal of Natural Products*, 72(6), 1220–1230. doi:10.1021/np800740m
56. Lamy, V., Roussi, S., Chaabi, M., Gossé, F., Schall, N., Lobstein, A., & Raul, F. (2007). *Chemopreventive effects of lupulone, a hop β -acid, on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. Carcinogenesis*, 28(7), 1575–1581. doi:10.1093/carcin/bgm080
57. Henderson, M. C., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Deinzer, M. L., & Buhler, D. R. (2000). *In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, Humulus lupulus. Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 30(3), 235–251.

58. Venturelli, S., Burkard, M., Biendl, M., Lauer, U. M., Frank, J., & Busch, C. (2016). *Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 32(11-12), 1171–1178. doi: 10.1016/j.nut.2016.03.020
59. Gerhäuser, C., Alt, A. P., Klimo, K., Knauff, J., Frank, N., & Becker, H. (2002). *Isolation and potential cancer chemopreventive activities of phenolic compounds of beer. Phytochemistry Reviews*, 1(3), 369–377. doi:10.1023/a:1026082325529
60. Gerhäuser, C. (2005). *Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. European Journal of Cancer*, 41(13), 1941–1954. doi:10.1016/j.ejca.2005.04.012
61. Gerhäuser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H. R., Frank, N., Bartsch, H., & Becker, H. (2002). *Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. Molecular cancer therapeutics*, 1(11), 959–969.
62. Wang, S., Dunlap, T. L., Howell, C. E., Mbachu, O. C., Rue, E. A., Phansalkar, R., ... Bolton, J. L. (2016). *Hop (Humulus lupulus L.) Extract and 6-Prenylnaringenin Induce P450 1A1 Catalyzed Estrogen 2-Hydroxylation. Chemical Research in Toxicology*, 29(7), 1142–1150. doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00112
63. Kelley, R. W., Cheng, D., & Backes, W. L. (2006). *Heteromeric complex formation between CYP2E1 and CYP1A2: evidence for the involvement of electrostatic interactions. Biochemistry*, 45(51), 15807–15816. doi: 10.1021/bi061803n
64. David Woolley, Adam Woolley. (2008). *A Guide to Practical Toxicology: Evaluation, Prediction, and Risk*. CRC Press. p. 165.
65. Arimoto-Kobayashi, S., Ishida, R., Nakai, Y., Idei, C., Takata, J., Takahashi, E., Konuma, T. (2006). *Inhibitory Effects of Beer on Mutation in the Ames Test and DNA Adduct Formation in Mouse Organs Induced by 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(1), 67–70. doi:10.1248/bpb.29.67

66. Arimoto-Kobayashi, S., Takata, J., Nakandakari, N., Fujioka, R., Okamoto, K., & Konuma, T. (2005). *Inhibitory Effects of Heterocyclic Amine-Induced DNA Adduct Formation in Mouse Liver and Lungs by Beer*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(3), 812–815. doi:10.1021/jf049208k
67. D E Briggs, P A Brookes, R Stevens, C A Boulton. (2004). *Brewing: Science and Practice*. Elsevier. p. 311.
68. MULLER, Carlos, NEVES, Luis Eduardo, GOMES, Luciana, GUIMARÃES, Munique, & GHESTI, Grace. (2020). *Processes for alcohol-free beer production: a review*. *Food Science and Technology*, *40*(2), 273-281. doi: 10.1590/fst.32318v
69. Rivero, D., Pérez-Magariño, S., González-Sanjosé, M. L., Valls-Belles, V., Codoñer, P., & Muñiz, P. (2005). *Inhibition of Induced DNA Oxidative Damage by Beers: Correlation with the Content of Polyphenols and Melanoidins*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(9), 3637–3642. doi:10.1021/jf048146v
70. Wunderlich, S., Wurzbacher, M., & Back, W. (2013). *Roasting of malt and xanthohumol enrichment in beer*. *European Food Research and Technology*, *237*(2), 137–148. doi:10.1007/s00217-013-1970-5
71. Zhang, H., Zhang, H., Troise, A. D., & Fogliano, V. (2019). *Melanoidins from Coffee, Cocoa and Bread Are Able to Scavenge α -Dicarbonyl Compounds under Simulated Physiological Condition*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi:10.1021/acs.jafc.9b03744
72. Brudzynski, K., Sjaarda, C., & Maldonado-Alvarez, L. (2013). *A New Look on Protein-Polyphenol Complexation during Honey Storage: Is This a Random or Organized Event with the Help of Dirigent-Like Proteins?* *PLoS ONE*, *8*(8), e72897. doi:10.1371/journal.pone.0072897
73. Nicola Senesi, Baoshan Xing, Pan Ming Huang. (2009). *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems*. John Wiley & Sons. p. 67.
74. Nishimuta, H., Sato, K., Watanabe, T., & Yabuki, M. (2018). *Time-dependent inhibition (TDI) of CYP1A2 by a CYP3A4-mediated reactive*

- metabolite: proposal for a novel mechanism of irreversible TDI by a non-suicide substrate. Xenobiotica, 1–10. doi:10.1080/00498254.2018.1488011*
75. Bojić, M., Kondža, M., Rimac, H., Benković, G., & Maleš, Ž. (2019). *The Effect of Flavonoid Aglycones on the CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8 and CYP2D6 Enzymes Activity. Molecules (Basel, Switzerland), 24(17), 3174. doi: 10.3390/molecules24173174*
76. Riley, R. J., Grime, K., & Weaver, R. (2007). *Time-dependent CYP inhibition. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 3(1), 51–66. doi:10.1517/17425255.3.1.51*
77. Klein, K., Winter, S., Turpeinen, M., Schwab, M., & Zanger, U. M. (2010). *Pathway-Targeted Pharmacogenomics of CYP1A2 in Human Liver. Frontiers in pharmacology, 1, 129. doi: 10.3389/fphar.2010.00129*
78. Stevens, J. F., & Page, J. E. (2004). *Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! Phytochemistry, 65(10), 1317–1330. doi:10.1016/j.phytochem.2004.04.025*
79. Guo, J., Nikolic, D., Chadwick, L. R., Pauli, G. F., & van Breemen, R. B. (2006). *Identification of human hepatic cytochrome p450 enzymes involved in the metabolism of 8-prenylnaringenin and isoxanthohumol from hops (Humulus lupulus L.). Drug Metabolism and Disposition, 34(7), 1152–1159. doi:10.1124/dmd.105.008250*
80. Nagar, S., Jones, J. P., & Korzekwa, K. (2014). *A numerical method for analysis of in vitro time-dependent inhibition data. Part 1. Theoretical considerations. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 42(9), 1575–1586. doi: 10.1124/dmd.114.058289*
81. Ronald Ross Watson, Victor R. Preedy, Sherma Zibadi. (2013). *Polyphenols in Human Health and Disease. Academic Press. p. 502.*
82. Vargas, A. J., & Burd, R. (2010). *Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. Nutrition Reviews, 68(7), 418–428. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00301.x*

83. Son, T. G., Camandola, S., & Mattson, M. P. (2008). *Hormetic Dietary Phytochemicals*. *NeuroMolecular Medicine*, 10(4), 236–246. doi:10.1007/s12017-008-8037-y
84. Atkins, W. M. (2005). *Non-Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450-catalyzed reactions*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 291–310. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.1
85. Mark P. Mattson, Edward J. Calabrese. (2009). *Hormesis A Revolution in Biology, Toxicology and Medicine*. Springer Science & Business Media. p. 100
86. Kang, I. (2004). *Biphasic effects of the flavonoids quercetin and naringenin on the metabolic activation of 2-amino-3,5-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline by Salmonella typhimurium TA1538 co-expressing human cytochrome P450 1A2, NADPH-cytochrome P450 reductase, and cytochrome b5*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 545(1-2), 37–47. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.08.002
87. Hinton, T., Hanrahan, J. R., & Johnston, G. A. R. (2017). *Flavonoid Actions on Receptors for the Inhibitory Neurotransmitter GABA*. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. doi:10.5772/67971
88. Benkherouf, A. Y., Soini, S. L., Stompor, M., & Uusi-Oukari, M. (2019). *Positive allosteric modulation of native and recombinant GABAA receptors by hops prenylflavonoids*. *European Journal of Pharmacology*. doi:10.1016/j.ejphar.2019.02.034
89. José Justino. (2017). *Flavonoids: From Biosynthesis to Human Health*. BoD – Books on Demand. p. 342
90. Christopher S. Chambers et al. (2020). *Defying Multidrug Resistance! Modulation of Related Transporters by Flavonoids and Flavonolignans*. *J. Agric. Food Chem.*, 68, 7, 1763–1779 doi: 10.1021/acs.jafc.9b00694
- 91.** Lin, Y., Wei, Y., Hu, X., Wu, M., Yao, J., Ying, X., Fu, X., Ding, M., & Qiao, L. (2019). *Evaluation of lentinan effects on cytochrome P450 activity in rats by a cocktail method*. *Iranian journal of basic medical sciences*, 22(3), 296–301. doi: 10.22038/ijbms.2019.31611.7611

APÉNDICE

Sección i. Ciclo catalítico CYP450.

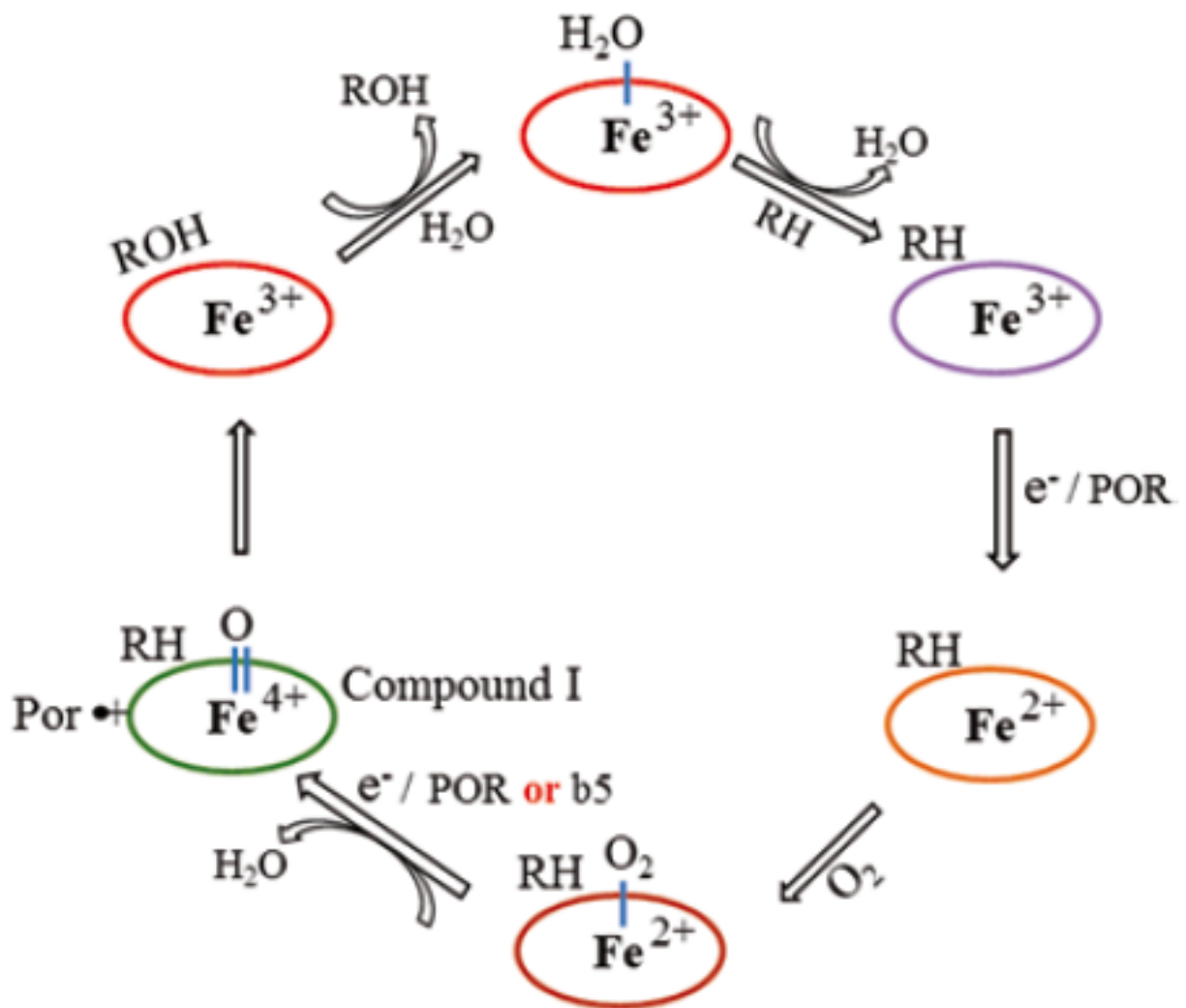


Figura 6. Ciclo catalítico CYP450. Fuente: Paul R. Ortiz de Montellano. (2015). *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Springer International Publishing. p. 49.

Sección ii. Métodos de producción en la cerveza sin alcohol.

	Nombre	Descripción
Restricción de la formación de alcohol	Fermentación interrumpida	Remoción de la levadura.
	Contacto con frío	La fermentación se lleva a temperaturas bajas.
	Cepa especial de levadura	Levaduras que producen poco alcohol. Ej. <i>Saccharomyces rouxii spp.</i> es ineficaz en la degradación de maltosa. Cepas mutantes. Ej. <i>Saccharomyces ludwigii</i> a la cual se le eliminó la alcohol deshidrogenasa.
	Levadura inmovilizada o bioreactores	Las levaduras están atadas a un acarreador como DEAE-celulosa. Se posiciona en el reactor donde el mosto fluye. Se induce mayor biomasa por unidad en menor tiempo.
Remoción de alcohol	Tratamiento térmico	<ul style="list-style-type: none"> • Evaporación al vacío • Destilación al vacío • Destilación con centrifugación
	Extracción	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción con solventes (CO₂ supercrítico) • Por adsorción.
	Procesos de membrana	<ul style="list-style-type: none"> • Nanofiltración • Ósmosis reversa • Destilación osmótica • Diálisis • Pervaporación (membranas semipermeables selectivas)

Cuadro 2. Resumen de los métodos para la producción de cerveza sin alcohol. Fuente: No. 68 en la bibliografía.

Sección iii. Esquema de producción de la cerveza.

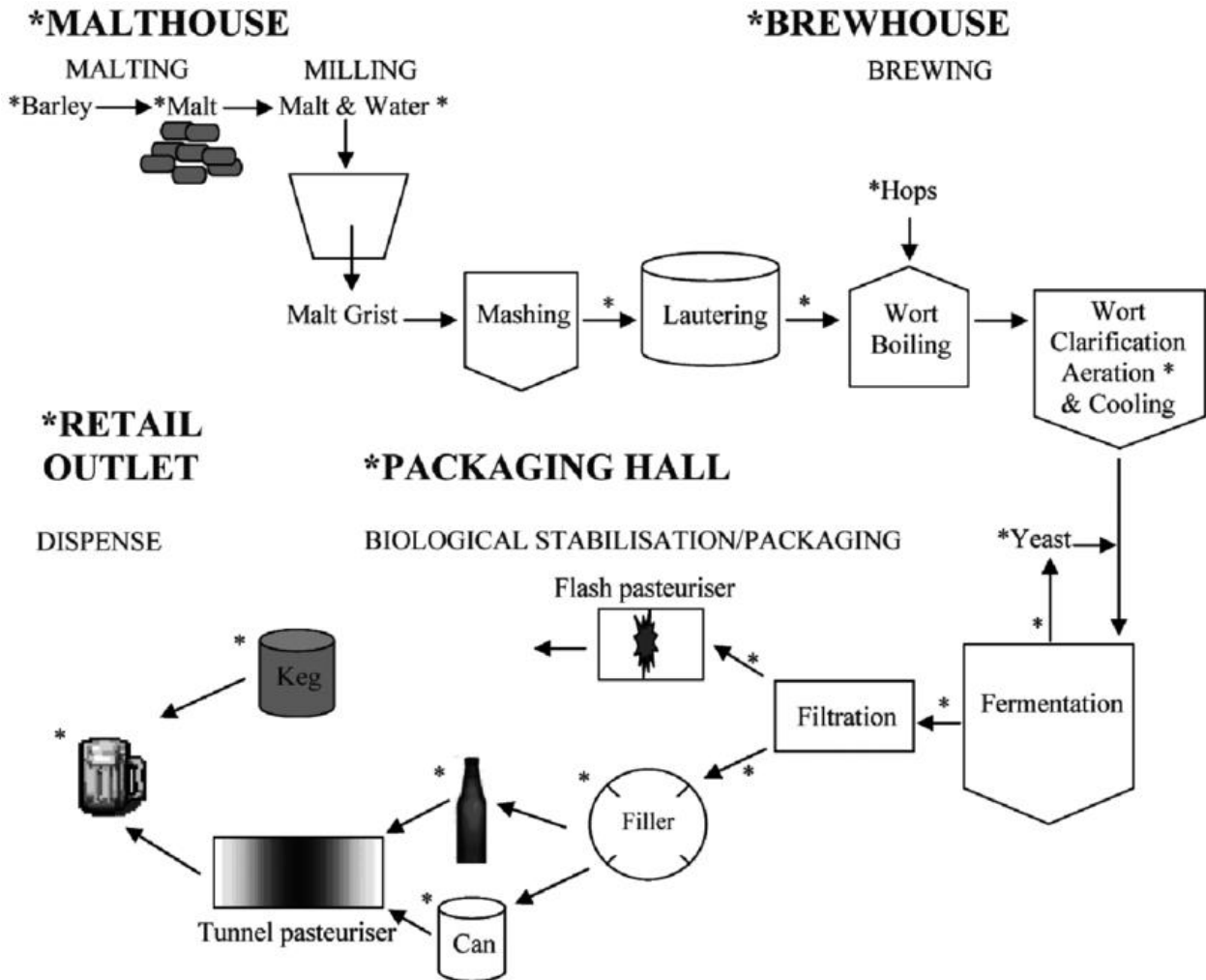


Figura 7. Esquema de producción de la cerveza. Fuente: Mamvura, T. A., Iyuke, S. E., Cluett, J. D., & Paterson, A. E. (2011). *Soil Films in the Beverage Industry: A Review. Journal of the Institute of Brewing*, 117(4), 608–616. doi:10.1002/j.2050-0416.2011.tb00511.x

Sección iv. Compuestos bioactivos clave del lúpulo.

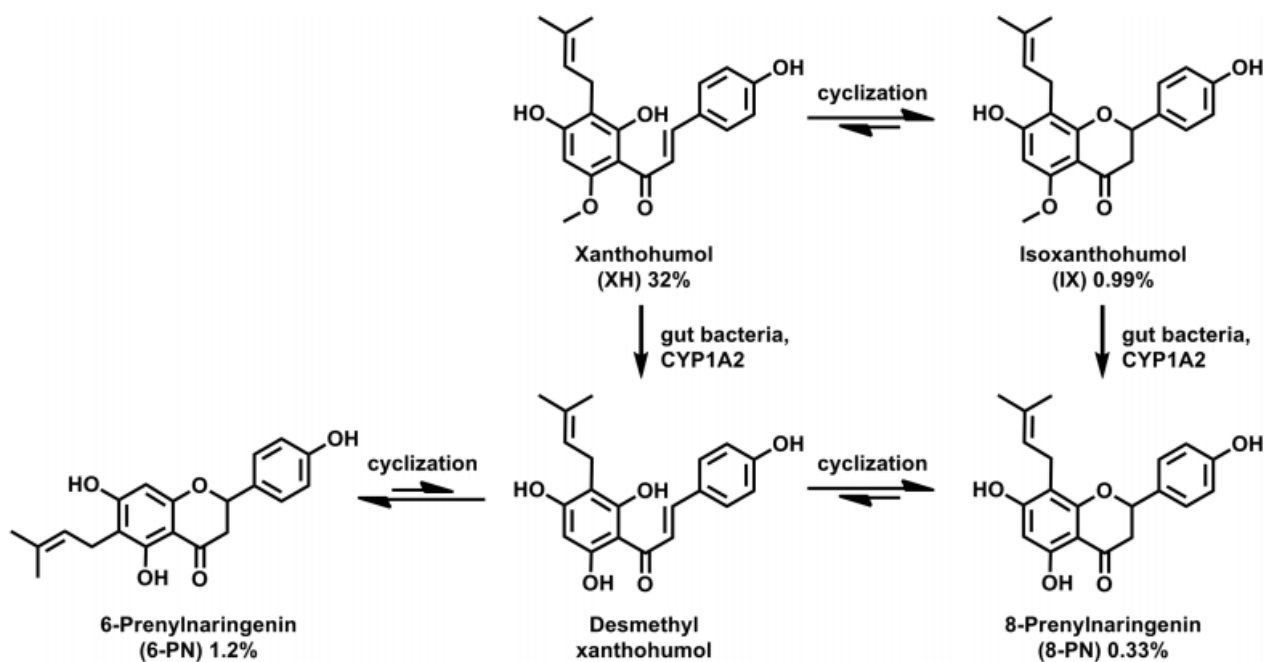


Figura 8. Compuestos bioactivos clave del lúpulo. Fuente: Wang, S., Dunlap, T. L., Howell, C. E., Mbachu, O. C., Rue, E. A., Phansalkar, R., ... Bolton, J. L. (2016). *Hop (Humulus lupulus L.) Extract and 6-Prenylnaringenin Induce P450 1A1 Catalyzed Estrogen 2-Hydroxylation. Chemical Research in Toxicology*, 29(7), 1142–1150. doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00112