



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

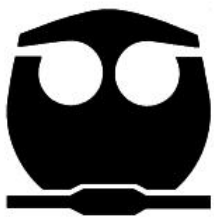
Actividad mutagénica del extracto metanólico de
Heterotheca inuloides y de quercetina

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA

DULCE GRACIELA REYES REYES



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Rafael Castillo Bocanegra
VOCAL: Dra. Gloria Gutierrez Venegas
SECRETARIO: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
1er. SUPLENTE: M. Juan Francisco Palacios Espinosa
2° SUPLENTE: M. Mariana Flores Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio206, Edificio C del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Maestro Mario Cueva UNAM.

Circuito escolar S/N

Ciudad Universitaria, Col. Copilco, C.P. 04510 Coyoacán, México, DF.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

SUPERVISOR TÉCNICO:

Biól. Sandra Luz Hernández Ojeda

SUSTENTANTE:

Dulce Graciela Reyes Reyes





AGRADECIMIENTOS

Te agradezco inmensamente a ti mi Dios porque sola no lo habría logrado.

Gracias a mis padres por todo el amor y cariño que me dan, por todo el sacrificio que me han brindado en todos estos años de estudio, por su paciencia y gran confianza. Gracias a mis hermanos (Nallely, Gisela e Israel).

Gracias a todos mis amigos que me han soportado en la facultad y por aquellos momentos divertidos que hemos pasado (los viajes, fiestas, comidas, etc.) los quiero a todos (Polett, Alejandra, Gina, Cecilia, Celene, Zabdi, Isacc, Geovanni, Oscar, Kikin, Icken, Salvador, Cano, José Juan, Emanuel, Fernando), y a mis queridos amigos que desde el CCH sur aun se encuentran a mi lado (Maritza, Erika, Laura, Fatima, Pablo, Yair, Antonio).

Gracias al Dr. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE por su apoyo, confianza, conocimiento, paciencia y sobre todo por haberme permitido realizar este proyecto, pero sobre todo por que fue mi inspiración para estar en esta área de la ciencia.

Gracias al Dr. Rafael Camacho Carranza por su apoyo, enseñanza y sus comentarios

Gracias la Biól. Sandra Luz Hernández por su gran apoyo y sobre todo por sus consejos académicos y personales, te quiero.

Gracias Al Dr. Omar Arellano Aguilar por el apoyo en el análisis estadístico de mis resultados en este trabajo.

Gracias a todos los miembros del jurado por la revisión y crítica constructiva en este trabajo. En especial a la M. Mariana Flores por su dedicación, paciencia y sus buenos consejos para que este trabajo saliera adelante.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio: Gabriela, Sitlali, Mariana, Dolores, Evelyn, Conny, Claudia, Blanca, Cynthia, Ana, Ulises, Néstor, Neus. A Gina, Olivia y Carlos gracias por su apoyo en esté corto tiempo que tienen en el laboratorio.

Muchas Gracias a mi Alma Mater la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** por brindarme la oportunidad de formarme como profesionista y como persona.





" Aprendí que lo difícil no es llegar a la cima,
sino jamás dejar de subir.
Aprendí que el mejor triunfo que puedo tener,
es tener el derecho de llamar a alguien «Amigo».
Descubrí que el amor es más que un simple
estado de enamoramiento,
«el amor es una filosofía de vida». "

Walt Disney.

Jesús respondió: Tened fe en Dios.
De cierto os digo que cualquiera que
diga a este monte: quítate y arrójate en el mar,
y no duda en su corazón, sino que cree que será
hecho lo que dice, lo que diga le será hecho [...]

Marcos 11:22-23





Indice

1. Resumen	7
2. Abreviaturas	9
3. Introducción	10
3.1 Mutación.....	10
3.1.1 Clasificación según el cambio molecular.....	11
3.1.2 Ensayo de mutagenicidad. AMES.....	12
3.2 <i>Heterotheca inuloides</i>	15
3.2.1 Propiedades farmacológicas de <i>Heterotheca inuloides</i>	16
3.3 Quercetina.....	17
3.4 Citocromo P450 (CYP).....	19
3.4.1 Ciclo catalítico del CYP.....	19
3.4.2 Participación del CYP en la biotransformación.....	21
3.5 Importancia de la subfamilia CYP1A.....	22
3.5.1 CYP1A1.....	22
3.5.2 CYP1A2.....	23
4. Justificación	24
5. Hipótesis	25
6. Objetivo general	25
6.1 Objetivos particulares.....	25
7. Material y Metodología	26
7.1 Reactivos.....	26
7.1.2 Extracto metanólico.....	26
7.1.3 Animales.....	26
7.1.4 Obtención de la fracción S9 y microsomal.....	26
7.1.5 Preparación de la mezcla S9.....	27





7.2 Prueba de Ames.....	27
7.2.1 Métodos para verificar la presencia de los marcadores genéticos y determinar la frecuencia de reversión.....	27
7.2.1.1 Marcadores genéticos.....	28
7.2.1.2 Frecuencia de reversión espontánea.....	29
7.2.2 Antimutagenicidad del extracto metanólico de <i>Heterotheca inuloides</i>	30
7.2.3 Mutagenicidad del extracto metanólico de <i>Heterotheca inuloides</i>	30
7.2.4 Mutagenicidad de la Quercetina (QT).....	31
7.2.5 Antimutagenicidad de la QT	31
7.3 Efecto de la QT sobre la actividad enzimática del CYP1A.....	31
7.4 Análisis estadístico	32
8. Resultados.....	33
8.1 Antimutagenicidad del extracto metanólico de <i>Heterotheca inuloides</i>	33
8.1.2 Mutagenicidad del extracto metanólico de <i>Heterotheca inuloides</i>	34
8.2 Mutagenicidad de la Quercetina (QT) en presencia de BaP.....	35
8.2.1 Antimutagenicidad de la QT.....	36
8.3 Efecto de la QT sobre la actividad enzimática del CYP1A.....	38
9. Discusión.....	40
10. Conclusión.....	44
Apéndice I.....	45
Referencias.....	46





1. Resumen

Heterotheca inuloides (árnica) es una planta utilizada en medicina tradicional por la población mexicana. Su uso se debe a sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antimicrobianas entre otras. Además de que es de bajo costo y fácil adquisición.

Un estudio reciente sobre *Heterotheca inuloides*, indica que los extractos metanólico y acetónico de esta planta poseen capacidad hepatoprotectora. Dicho trabajo mostró que el extracto metanólico presenta un mejor efecto protector que el extracto acetónico. Por otro lado, la quercetina (QT), compuesto mayoritario del extracto metanólico, presenta la capacidad para atrapar especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo uno de los principales compuestos que le confiere al extracto propiedad de protector contra la hepatotoxicidad inducida por el CCl₄. Sin embargo, la QT también ha sido reportada como compuesto mutagénico en ensayos con *Salmonella typhimurium* en las cepas TA98, TA100 y TA102. La actividad mutagénica de QT fue dependiente de la concentración y de la presencia del sistema enzimático, fracción S9, el cual contiene las enzimas encargadas de la biotransformación de xenobióticos, citocromos P450 (CYP).

En este trabajo se evaluó la potencia mutagénica y antimutagenica del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* y la QT, se utilizó como sistema de prueba el ensayo de Ames con la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*. Para evaluar el efecto antimutagénico del extracto metanólico y la QT, se usó el benzo(a)pireno (BaP) compuesto mutagénico. Como sistema enzimático se utilizó la fracción S9, la cual se obtuvo a partir de hígado de ratas pretratadas con fenobarbital (FB) y beta-naftoflavona (β -NF).

También se evaluó el efecto de la QT sobre la actividad enzimática *in vitro* del CYP1A, para determinar la posible relación que se tiene sobre la actividad antimutagénica. Para cuantificar la actividad del CYP1A1 y del CYP1A2, se llevó a cabo la reacción de O-dealquilación de alcoxirresorufinas. Usando la





etoxiresorufina como sustrato para el CYP1A1 y metoxirresorufina para el CYP1A2, de cuyas reacciones se obtiene el producto resorufina, el cual es cuantificable mediante fluorescencia.

Los resultados obtenidos en el ensayo de antimutagenicidad, mostraron que el extracto metanólico presentó antimutagénesis a las concentraciones de 150, 250 y 500 µg/caja. Sin embargo presentó mutagenicidad en presencia y ausencia del sistema enzimático (150, 250, 500, 750 y 800. µg/caja). Para la QT se siguió el mismo esquema de antimutagenicidad y mutagenicidad a las concentraciones de 2,5,7,10 µg/caja. Los resultados obtenidos indican que la QT disminuye el número de colonias revertantes a las concentraciones de 2 y 5 µg/caja, indicando su efecto antimutagénico. Mientras que el efecto mutagénico de la QT se hizo evidente solamente en presencia de la fracción S9.

En la actividad enzimática, los resultados mostraron que la QT tiene la capacidad de inhibir la actividad de las isoenzimas de citocromo P450 CYP1A1 y CYP1A2. El efecto inhibitorio fue mayor para el CYP1A1.

Por lo tanto, los resultados sugieren que la QT puede estar implicada en la prevención de la transformación de compuestos mutagénicos, mediante la reducción de la formación de estos a través de la inhibición de las enzimas CYP1A1 y CYP1A2. Esta propiedad puede contribuir a la actividad antimutagénica del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides*.





1. Abreviaturas

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
BaP	Benzo[a]pireno
CYP	Citocromo P450
EROD	Etoxiresorufin- o –demetilasa
MROD	Metoxiresorufin-o-demetilasa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
h	Horas
min	Minutos
QT	Quercetina
rpm	Revoluciones por minuto
HNO ₂	Ácido nítrico
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
ROS	Especie reactiva de Oxígeno





3. Introducción

3.1 Mutación

La exposición continua a compuestos genotóxicos puede producir daño al DNA, provocando alteraciones tanto a nivel de nucleótidos como a nivel cromosómico [1]. Estas alteraciones son el resultado de una mutación. Una mutación se puede definir como cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del DNA. Mientras que un organismo con la dotación completa de material genético con alteraciones se conoce como un mutante [2].

Aquella mutación que cambia el fenotipo de tipo silvestre a un fenotipo mutante se dice que es una mutación hacia adelante, si el cambio ocurre del fenotipo mutante al tipo silvestre se dice que es una mutación reversa.

Los agentes que ocasionan un aumento en la frecuencia de aparición de mutaciones se conocen como mutágenos. Estos pueden ser físicos tales como radiaciones ultravioleta, radiaciones ionizantes (Rayos X y γ) y no ionizantes o químicos como HNO_2 , 5-bromouracilo, 2-aminopurina y BaP por mencionar algunos [3]. Existen agentes que pueden surgir del proceso oxidativo interno (resultado del metabolismo) como son las especies reactivas de oxígeno (ROS) [4].

Las mutaciones pueden ocurrir en células somáticas o células germinales. Las que ocurren en células germinales son hereditarias y son la base de la diversidad genética y evolución así como de algunas enfermedades genéticas. Aquellas que se producen en las células somáticas pueden conducir a la muerte celular localizada o a una alteración de la función celular y llegan hasta causar tumores [2].

Como se mencionó, el daño causado por una mutación se puede dar a nivel cromosómico (anomalías estructurales y numéricas) o a nivel molecular (mutaciones puntuales). Estas últimas pueden ser ocasionadas por una sustitución de pares de bases, una supresión o inserción de uno o más pares de bases.





3.1.1 Clasificación según el tipo de cambio molecular

Los genetistas suelen clasificar la mutación de un gen en términos de cambio de nucleótidos. El cambio de pares de bases a otro diferente en una molécula de DNA se conoce como una mutación puntual, o sustitución de bases [2]. Cuando ocurre una alteración en un codón específico puede dar lugar a un nuevo codón que codifique un amino ácido diferente (mutación de sentido equivocado) o erróneo. Como consecuencia del cambio de aminoácidos, la proteína que se produce puede ser inestable, inactiva o presentar variaciones de actividad respecto a la proteína normal.

También existe el caso de que el cambio de un nucleótido en un codón, dé como consecuencia un codón de terminación (mutación sin sentido) [5].

Las sustituciones de base pueden ser de transición o transversión

- Una transición es la sustitución de una purina por una purina o bien de una pirimidina por una pirimidina.

Purina: Adenina (A) y Guanina (G)

Pirimidina: Citocina (C) y Timina (T)

Tabla 1. Mutaciones por sustitución de bases.

Transición	Transversión
A → G o G → A	A → C, A → T, G → C, G → T
C → T o T → C	C → A, C → G, T → A, T → G

- Una transversión es el cambio de pirimidina por purina o viceversa, una purina sustituida por una pirimidina.

Las mutaciones puntuales también resultan de la adición o supresión de un pequeño número de pares de bases. Las inserciones y deleciones dentro de secuencias que codifican proteínas pueden conducir a cambios en el marco de





lectura. Estas suelen alterar todos los aminoácidos codificados por los nucleótidos que se ubican después de la mutación y, por lo tanto, tiene efectos drásticos sobre el fenotipo [6].

Las mutaciones que provocan corrimiento del marco de lectura son conocidas como mutaciones “frameshift”. Estas son graves si el desfase se produce al principio del gen.

Las mutaciones más frecuentemente observadas en patologías son las transversiones y las deleciones que provocan cambios de marco de lectura (frameshift). En cambio las inserciones son mucho más raras.[7]

3.1.2 Prueba de mutagenicidad, Ames.

Las pruebas de mutagenicidad están diseñadas para poder detectar mutaciones producidas por agentes genotóxicos. Estas pruebas se han desarrollado en varios organismos, incluyendo hongos, plantas y cultivo de células de mamífero. Sin embargo, una de las pruebas más utilizadas por su sencillez y bajo costo es el ensayo con la bacteria *Salmonella typhimurium* propuesto por Bruce N. Ames [8]. Es una de las pruebas más difundidas, diseñada para identificar una amplia gama de sustancias químicas que pueden producir daño genético que conducen a mutaciones. Se emplea como sistema biológico diversas cepas bacterianas mutantes aisladas a partir de cepas silvestres de *Salmonella typhimurium* [2].

Las bacterias mutantes son auxótrofas a histidina (His^-) a diferencia de las silvestres que son protótrofas (His^+) por lo que requieren histidina para su desarrollo y crecimiento. Esta prueba se basa en revertir el fenotipo mediante la inducción de mutaciones en el operón de la histidina, lo que confiere a las “revertantes” la capacidad de crecer en medios carentes del amino ácido o con cantidades limitantes de histidina [9].

Por lo tanto, la prueba de mutagenicidad en *Salmonella* está diseñada para detectar mutagénesis inducida químicamente principalmente ya que también detecta mutaciones físicas como las radiaciones [10].





Para hacer más sensible este ensayo, las cepas de *Salmollena typhimurium* presentan otros marcadores genéticos:

- Mutación *rfa*. Provoca pérdida parcial de la barrera compuesta por lipopolisacáridos que cubre la superficie bacteriana e incrementa la permeabilidad a moléculas de elevado peso molecular como el BaP que no penetra normalmente en la célula [8].
- Mutación *uvrB*. Es una delección del gen que codifica para el sistema de reparación por escisión del DNA. Esta delección se extiende al gen de biotina y como consecuencia, la bacteria también requiere de biotina para dividirse.
- Introducción del plásmido pKM101. Este plásmido (moléculas circulares de DNA con replicación autónoma) le confiere resistencia a las bacterias a la ampicilina, también permite aumentar la sensibilidad a compuestos mutagénicos [10].
- Adición de enzimas de metabolismo. Algunas sustancias carcinogénicas, como los PAHs son biológicamente inactivos a menos que sea metabolizados para dar formas activas. En el mamífero existen sistemas enzimáticos responsables de la biotransformación metabólica de compuestos exógenos, tal es el caso del CYP. Dado que en *S. typhimurium* estas enzimas se encuentran ausentes, se adiciona a la prueba la fracción sobrenadante (9000 g) de un homogenado de hígado de roedores (S-9 fracción microsomal) [11, 12].
- Secuencia específica de DNA. Cada cepa utilizada en el ensayo tiene diferentes mutaciones en varios genes del operón de histidina, las cuales están diseñadas para responder a las mutaciones que actúan a través de diferentes mecanismos. Tabla 2





Tabla 2. Secuencia específica de DNA de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames [3].

Cepa	DNA blanco	evento de reversión
<i>hisG46</i> TA100 TA1535	G-G-G	sustitución de pares de base
<i>hisD3052</i> TA98 TA1538	C-G-C-G-C-G-C-G	frameshift
<i>hisC3076</i> TA1537	+ 1 frameshift	frameshift
<i>hisD6610</i> TA97	C-C-C-C-C-C	frameshift
<i>hisG428</i> TA102 TA104	TAA	transición/transversión.

La cepa de interés para este trabajo fue la TA98, la cual presenta la mutación *hisD3052*. Las mutaciones que detecta son de tipo frameshift o desplazamiento en el marco de lectura en la secuencia repetida C-G-C-G-C-G-C-G. La mutación de esta cepa está diseñada para la corrección del marco de lectura y permitir la síntesis de histidina (mutación reversa) y por lo tanto el crecimiento de las bacterias en medio carente de histidina.

La exposición continua a compuestos genotóxicos da como consecuencia daño al DNA, el cual puede ocasionar que una célula normal pase a ser una célula con alteraciones. En casos extremos se puede llevar a procesos carcinógenos. Actualmente se buscan tratamientos que sean capaces de prevenir el proceso carcinógeno. Una alternativa es el uso de productos naturales.





3.2 *Heterotheca inuloides*

Heterotheca inuloides es una planta de origen mexicano popularmente conocida como árnica, utilizada en la medicina tradicional. Suele nombrarse también como: acahua, acahualli, árnica de campo, árnica de monte, árnica del país, árnica (purépecha), cuateteco, falsa árnica y tlályetl (nahuatl) [13]. Las propiedades antiinflamatorias, analgésicas, y antimicrobianas de *Heterotheca inuloides* son las más conocidas dentro de la medicina tradicional, además que es de bajo costo y fácil adquisición.

En el mercado se encuentra en diferentes presentaciones como son: tabletas, gotas homeopáticas, tinturas, infusión o pomadas, las cuales son utilizadas para el tratamiento de infecciones de la piel, fiebres, golpes y llagas [14, 15].

Heterotheca inuloides (**Figura 1**) es una planta que mide hasta 1 metro de altura, tiene hojas dentadas, alargadas y anchas. Sus flores, de color amarillo intenso, se agrupan en forma circular. Emite un aroma débil y es de sabor amargo. Se encuentra localizada en las regiones del Valle de México, San Luis Potosí, Aguascalientes, Chihuahua, Veracruz, Nayarit, Oaxaca, Hidalgo y Tlaxcala [13].



Figura 1. *Heterotheca inuloides*



3.2.1 Propiedades farmacológicas de *Heterotheca inuloides*

Como se mencionó anteriormente, *Heterotheca inuloides* es utilizada en la medicina tradicional mexicana. Cuando es ingerida como infusión ayuda a mejorar la circulación sanguínea, es astringente y antiespasmódica. Es eficaz para tratar la insuficiencia cardíaca, la insuficiencia circulatoria en extremidades y los espasmos gástricos. También es utilizada en forma de compresas o pomada, como antiinflamatorio y antibacteriano moderado, siendo un remedio eficaz contra golpes, contusiones y traumatismo en general [16].

Las propiedades farmacológicas de *Heterotheca inuloides* se deben a los componentes químicos presente en la planta, los cuales se encuentran en el extracto metanólico y acetónico en distintas concentraciones, algunos de los componentes han sido caracterizados. Los compuestos químicos base son; poliacetilenos, cadinanos, triterpenos, esteroides, sesquiterpenos y flavonoides (Tabla 3).

Tabla 3. Composición química de los extractos acetónico y metanólico de *Heterotheca inuloides* [17].

Nombre del Extracto	Composición química (% en el extracto)	Propiedades farmacológicas	Referencias
<i>Heterotheca inuloides</i>	Ácido cadalen-15-oico, 3,7-dihidroxi-3(4 <i>H</i>)-isocadaleno-4-uno		
	Dicadaleno		
Extracto Acetónico	7-hidroxicadaleno, 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno 1 α , hidroxil-1(4 <i>H</i>)-isocadaleno-4-uno,	Antiinflamatorio	[18]
	Ácido 1-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15-oico,	Efecto inhibitorio de COX 1 y COX 2	[19]
	7-(3,3-dimetilaliloxi)coumarina	Antioxidante	[20]
	Cariolan-1,9- β -diol,		
	Quercetina,	Inhibición de la peroxidación lipídica	[20]
	Estigmasterol,		





β -sitosterol.			
Heterotheca inuloides	Quercetina (0.19 %),	Inhibición de la actividad Tirosinasa	[18]
Extracto metanólico	Quercetina 3-O-glucósido, Kaempferol,	Antioxidante	
	kaempferol-3-O-glucósido, kaempferol-osoforosido, D-chiro-inositol,		
	Epinasterol, 3-O- β -D- glucopiranosido epinasteril	Inhibición de la peroxidación lipídica	[21]
	7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (0.004%),	Antiinflamatorio	Delgado y cols., 2009
	7-hidroxicadaleno (0.002%).		
Tomado de Coballase Urrutia E, et al. (2010),			

Estudios previos realizados en el laboratorio mediante experimentos *in vivo* con ratas wistar, mostraron que el extracto metanólico y el extracto acetónico de *Heterotheca inuloides* presentan un efecto hepatoprotector, frente al daño producido por tetracloruro de carbono (CCl₄). En dicho trabajo se reportó que el extracto metanólico presenta un mejor efecto protector que el extracto acetónico [17]. El efecto hepatoprotector se asoció a la capacidad que tiene el extracto metanólico de mantener la actividad enzimática de varias enzimas antioxidantes como son: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y glutatión transferasa, o puede actuar como antioxidante directo. Por otro lado, la quercetina (QT) compuesto mayoritario del extracto metanólico, presenta la capacidad para atrapar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tabla 1). Los resultados obtenidos sugieren que esta característica se le puede asociar a las propiedades antioxidantes de la planta [17].





3.3 Quercetina (QT)

La QT (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi flavona) (**Figura 2**) es un polifenol presente en vegetales como son: tomates, brocoli, y en frutas tales como manzanas, uvas y el vino. Muchos estudios han informado que la QT disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y desarrollo de tumores por mencionar algunos [22]. Es uno de los flavonoides más representativos, actúa como antioxidante, protege contra el daño producido por los radicales libres y también puede actuar como prooxidante en procesos biológicos [23]. Su actividad antioxidante se debe principalmente a los grupos funcionales en su estructura: i) un grupo catecol en el anillo B (sustituyentes hidróxilo en las posiciones 3' y 4'), ii) un enlace doble en la posiciones 2 y 3 conjugado con la función 4-oxo, en el anillo C y iii) la presencia de sustituyentes hidroxilo en las posiciones 3 del anillo C y 5 del anillo A. Estas características son importantes para la actividad atrapadora de radicales libres.

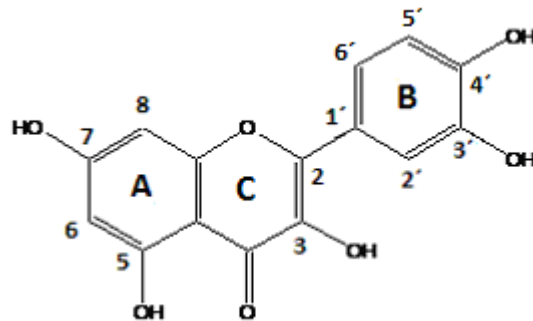


Figura 2. Estructura química de la Quercetina

En contraste con sus efectos benéficos, en la literatura se ha reportado que la QT presenta un efecto mutagénico. MacGregor, *et al* [24], reportaron que la QT presenta mutagenicidad en el ensayo con *Salmonella typhimurium*. Dicha actividad se observó en ausencia del sistema metabólico, el cual contiene las enzimas encargadas de la biotransformación de xenobióticos, Citocromo P450 (CYP) y en presencia de éste se observa un aumento del potencial mutagénico. Estudios más





recientes de Makena, P.S *et. al.* [25] indican que el efecto mutagénico de la QT depende tanto de su concentración como de su activación metabólica.

Por otro lado, se sabe que los flavonoides tienen la capacidad de modular la biotransformación de xenobióticos [26]. Se ha documentado que los flavonoides tienen gran importancia en la quimioprevención a través de la inhibición del CYP1, el cual participa en la formación de compuestos cancerígenos, llevando a la producción de aductos al DNA y al desarrollo de tumores en modelos *in vitro* e *in vivo* [27, 28].

3.4 Citocromo P450 (CYP)

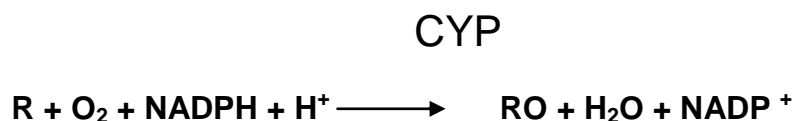
El Citocromo P450 (CYP) es una superfamilia de hemoproteínas muy importantes en el sistema de biotransformación de fase I. Estas enzimas se encuentran presentes en el retículo endoplasmático liso. Se encargan del metabolismo oxidativo de compuestos endógenos, como: hormonas esteroides, vitaminas y ácidos grasos, y de compuestos exógenos entre los que se encuentran fármacos, pesticidas, alcaloides. etc.[29] .

En el humano se han identificado 57 diferentes CYPs, llamadas isoformas o isoenzimas. De estas, 15 están asociadas con el metabolismo de Xenobioticos; CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 Y CYP3A7 [30].

3.4.1 El ciclo catalítico [31]

Las reacciones mediadas por el CYP requieren tanto de NADPH y oxígeno molecular (O₂) para oxidar al sustrato (R).

La reacción general en el ciclo catalítico es:





Estas reacciones que se llevan a cabo en el ciclo catalítico siguen los siguientes pasos:

Paso 1. El sustrato (RH) se une al átomo de hierro en el sitio activo del CYP, en su estado oxidado (Fe^{3+}).

Paso 2. El complejo citocromo-sustrato se reduce con un electrón transferido de la NADPH a través de la flavoproteína, la NADPH citocromo P450 reductasa, pasando del estado férrico Fe^{3+} del grupo hemo a Fe^{2+} .

Paso 3. La reducción del complejo citocromo- sustrato se da por la unión de un oxígeno molecular, favoreciendo la formación del complejo superóxido.

Paso 4. La incorporación de un segundo electrón al complejo superóxido por la NADPH citocromo P450 reductasa o en algunos casos, de citocromo b_5 (formación de especies reactivas) [32].

Paso 5. Se agrega un protón el cual provoca el rompimiento del dioxígeno ($\text{O}=\text{O}$), generando una molécula de H_2O (paso 6). Se origina el complejo FeO^{3+} .

En el paso 7 el complejo atrae electrones de un átomo de hidrógeno o del sustrato.

En el paso 8 se da la generación del producto.

Por último, el producto se disocia de la enzima, paso 9. Se incorpora una nueva molécula del sustrato y comienza nuevamente el ciclo.



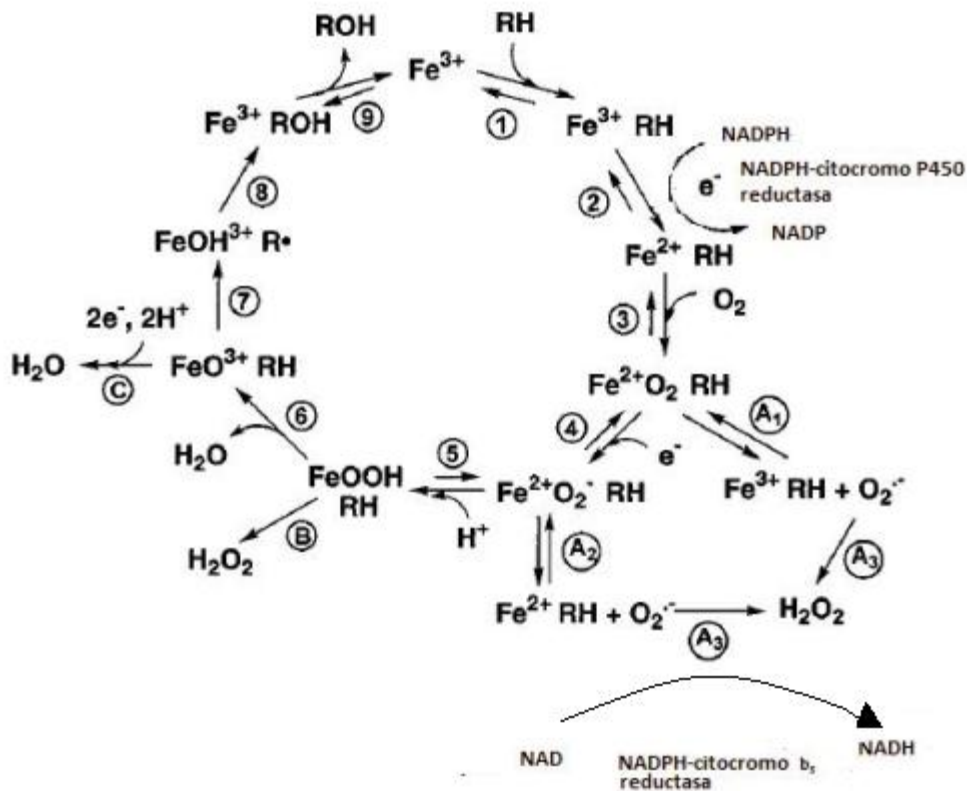


Figura 3. Ciclo catalítico de citocromo P450 [32]

3.4.1.2 Participación del Citocromo en la biotransformación

Para su estudio, el metabolismo de xenobióticos se divide en dos etapas conocidas como reacciones de fase I y fase II. En la fase I los citocromo P450 son las enzimas que se encargan de la transformación del 80% de los compuestos exógenos [33]. Esta fase consiste en modificar los agentes químicos lipofílicos en compuestos hidrofílicos introduciendo grupos polares para facilitar su excreción.

Las enzimas presentes en esta fases son: epoxigenasa, monoamino oxidasa (MAO), las flavin-monooxigenasa (FMO) y los citocromos P450 (CYP) [33]. Las reacciones mediadas por esta fase incluyen reacciones de reducción, oxidación e hidrólisis [34].





Sin embargo, existen compuestos químicos cuya toxicidad depende directamente de la transformación enzimática, por lo que el metabolito resultante es más tóxico que el compuesto original [32].

En la fase II o de conjugación generalmente se adicionan pequeñas moléculas polares a los metabolitos provenientes de la fase I favoreciendo su eliminación. Las reacciones que se presentan en esta fase son: glucoronidación, sulfatación, conjugación con glutatión, metilación, acetilación y conjugación con aminoácidos [30].

El objetivo final de estas dos fases, es aumentar la solubilidad de los compuestos y facilitar su excreción a través de la orina o bilis, principalmente.

3.5 Importancia de la Subfamilia CYP1A

La subfamilia CYP1A se encuentra formada por dos integrantes: CYP1A1 y CYP1A2, y tiene un papel importante en la biotransformación y bioactivación de compuestos con potencial cancerígeno. Son homólogos y presentan un porcentaje de identidad del 80% entre humano y rata [35].

En general, la subfamilia CYP1A está involucrada en el metabolismo de oxidación de sustancias exógenas, tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), aminas heterocíclicas y aminas aromáticas [34]. La característica de estas sustancias es que son compuestos que poseen una estructura molecular plana. Por lo tanto, los miembros de esta subfamilia están estrechamente asociados con la activación metabólica de pro-carcinógenos y mutágenos como el benzo(a)pireno (BaP), dimetilbenzoantraceno (DMBA), β -naftilamina, aflatoxina B₁, 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) y benzidina [36, 37].

3.5.1 CYP1A1

Se sabe que esta isoforma es inducible en animales bajo el tratamiento con 3-metilcolantreno (3-MC), β -naftoflavona (β -NF), 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) y otros PAHs. La expresión del CYP1A1 está regulado por un





heterodímero, el receptor aril-hidrocarburo aromático (AhR)/ translocador nuclear del AhR. [38]. Además, se expresa constitutivamente en hígado fetal y es inducible en hígado adulto. Se encuentra expresado en tejido extrahepático como pulmón, placenta, cerebro, testículo y ovarios. También es posible encontrar expresada a la enzima, cuando ésta es inducida, en páncreas, timo, próstata, intestino delgado, colon, útero y glándulas mamarias [39].

Entre los inductores mejor conocidos de esta isoforma se encuentra el BaP que está presente en el humo del cigarrillo, por lo tanto juega un papel importante en la carcinogénesis pulmonar. Trabajos anteriores han demostrado *in vivo* que los inductores pueden ser pro-carcinógenos [40, 41].

Un estudio muestra que la expresión de CYP1A1 en pulmón humano puede estar relacionada con el humo del tabaco ya que es fácilmente inducido por los compuestos presentes en éste. Es posible también que exista una conexión entre la susceptibilidad al cáncer de pulmón y una de las variantes alélicas de este gen (*MspI*) [42].

3.5.2 CYP1A2

El CYP1A2 es exclusivo del hígado y constituye aproximadamente el 15% del total de contenido hepático del CYP [32]. Los inductores reportados de esta proteína incluyen; el BaP y otros hidrocarburos policíclicos y animas presentes en alimentos cocidos a altas temperaturas y fármacos como el omeprazol [43, 44].

Algunos sustratos de esta isoforma son el acetaminofen, la cafeína y la clozapina entre otros [45].

Del mismo modo que para el CYP1A1, la expresión inducible del CYP1A2 está regulada por el receptor aril-hidrocarburo aromático (AhR). Cuando un compuesto xenobiótico se une a él formando un complejo, el AhR viaja al núcleo donde se unen al translocador nuclear del receptor (ARNT) formando un heterodímero, AhR/ ARNT.





4. Justificación

El extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* muestra en un estudio que tiene la capacidad de actuar como hepatoprotector. También se sabe que la QT es el compuesto mayoritario del extracto metanólico, y es capaz de atrapar especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que se propone que la QT es el compuesto que le confiere al extracto metanólico la propiedad de hepatoprotector [17, 46].

A pesar de los efectos benéficos de *Heterotheca inuloides* y los componentes presentes en el extracto metanólico, se tiene evidencia de que la QT puede actuar como compuesto mutagénico [24, 25]. Con base a lo anterior el presente trabajo pretende evaluar la actividad mutagénica del extracto metanólico, debido a la presencia de la QT.





5. Hipótesis.

El extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* presentará un efecto antimutagénico, debido a la capacidad hepatoprotectora, aun en presencia de QT, un compuesto mutagénico reconocido.

6. Objetivo general.

Evaluar el efecto mutagénico del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* y la quercetina en la prueba de Ames.

6.1 Objetivos particulares.

- Determinar el efecto mutagénico del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* y de la QT mediante la prueba de mutagenicidad de Ames.
- Determinar el efecto antimutagénico del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* y de la QT mediante la prueba de mutagenicidad de Ames
- Determinar el efecto de la QT sobre la actividad enzimática del CYP1A1 y CYP1A2.





7 Material y Metodología

7.1 Reactivos. Quercetina (QT) (97.5% HPLC), benzo(a)pireno (BaP), glucosa-6 fosfato, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH), etoxiresorufina, metoxiresorufina, resorufina y β -naftoflavona (β -NF), se adquirieron de Sigma Chemical Co. (Saint Louis MO, USA), Cloruro de potasio (KCl) y cloruro de magnesio ($MgCl_2$) adquirido de J.T. Baker, el fenobarbital (FB) adquirido de Abbott Laboratories México (México, D:F), el dimetilsulfóxido (DMSO) fue adquirido de Merck Kga, Darmstadt, Germany.

7.1.2 Extracto metanólico. Fue donado por la Dra. Elvia Coballase Urrutia del Instituto Nacional de Pediatría. La planta *Heterotheca inuloides* fue colectada en Zacapoaxtla, Puebla, México. El material fue clasificado por la Biol. Myrna Mendoza Cruz del departamento de plantas medicinales del Jardín Botánico (Instituto de Biología, UNAM). La caracterización del extracto fue obtenido respectivamente por Delgado y cols.[20].

7.1.3 Animales. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso corporal entre 200 y 250 gramos, las cuales fueron pretratadas con fenobarbital (FB) a dosis de 60 mg/Kg los días 1, 2, 3 y 30 mg/Kg el día 4; la β -naftoflavona β -NF se aplicó a una dosis de 80 mg/Kg el tercer día de tratamiento. La vía de inoculación para ambos compuestos fue intraperitoneal. Para la obtención de la mezcla S9, se siguió el método de Maron y Ames [47].

7.1.4 Obtención de la fracción S9 y microsomal

Se sacrificaron las ratas por dislocación cervical obteniéndose los hígados que fueron colocados en vasos tarados con 15 mL de solución de KCl 0.15 M (el proceso se continuó a 4 °C para conservar la actividad enzimática). Se pesaron los hígados y se transfirieron a un recipiente con solución de KCl 0.15 M a una porción de 3 mL/g de hígado. Se cortaron en pequeños pedazos. Después de centrifugó a 9000 g por 10 minutos y el sobrenadante (S9) se almacenó en





alícuotas de 2 mL a -70 °C para su uso posterior. El resto se procesó para la obtención de microsomas lo cual se logró centrifugando el S9 a 100000 g por 60 minutos, al cabo de los cuales el botón obtenido se resuspendió en un volumen igual al inicial con amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 7.4 y se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones. El botón final fue resuspendido en un amortiguador de fosfato de potasio pH 7.4, EDTA 1 mM, DTT mM y 20% de glicerol, se hicieron alícuotas almacenándose a - 70 °C

7.1.5 Preparación mezcla S9. En condiciones de esterilidad a 4°C se preparó la mezcla S9 al 10% adicionando: solución de MgCl₂ 0.4M KCl 1.65 M (0.02 mL), glucosa-6 fosfato (0.0013 g), NADP (0.003 g), amortiguador de fosfato 0.2 pH 7.4 (0.9 mL) y 0.1 mL de la fracción S9, obteniendo un volumen final de 1 mL. La solución resultante se filtró con un filtro Swinex (Millipore Corp., Bedford, MA.). Se calcula la cantidad de reactivos y S9 necesaria, de acuerdo al volumen de Mezcla S9 que se va a utilizar.

7.2 Prueba de AMES

El ensayo permite identificar compuestos mutágenos, empleando como sistema biológico *Salmonella typhimurium*.

7.2.1 Métodos para verificar la presencia de los marcadores genéticos y determinar la frecuencia de reversión espontánea

La cepa de *Salmonella typhimurium* que se usó fue la TA98, la cual fue donada por el Dr. Bruce N. Ames de la Universidad de California Berkeley, C.A., USA.

La preparación de medios de cultivo y soluciones se encuentran descritas en el apéndice I.

De un cultivo de reserva congelado a - 80 °C, se tomó con un aplicador de madera una muestra y se sembró por estría en una caja Petri con medio de NB





y antibiótico (ampicilina 25 µg), incubando a 37 °C por 24 h. Posteriormente, con un aplicador de madera se sembró en 5 mL de caldo nutritivo, una colonia proveniente de la caja de NB, en condiciones de esterilidad, incubándose posteriormente a 37 °C por 16 h a 125 rpm.

7.2.1.1 Marcadores genéticos [8, 9]:

* Requerimiento de histidina. A partir del tubo con cultivo bacteriano de 16 hrs de incubación, sembrar con un aplicador de madera en medio mínimo de Vogel-Bonner. Hacer lo mismo sobre medio mínimo complementado con un exceso de histidina 0.1M/biotina 0.5mM (320 µL de solución, apéndice I). Solamente debe de haber crecimiento en la caja con exceso de histidina y biotina.

* Sensibilidad de cristal violeta. Para verificar el marcador *rfa* (modificación de la pared celular). Con un aplicador de madera colocar en una caja Petri con medio NB una línea de la solución de cristal violeta (0.1%), dejar secar. Posteriormente tomar con otro aplicador una muestra del cultivo bacteriano y sembrar una línea que cruce el cristal violeta.

Se debe presentar una zona clara de inhibición de crecimiento al contacto con el cristal violeta. Esto indica la presencia de la modificación de la pared celular.

* Presencia de plásmido. Verificación de la presencia del factor de resistencia a la ampicilina. A partir del medio de cultivo bacteriano, sembrar con un aplicador de madera, en una caja Petri con medio NB sin antibiótico, posteriormente sembrar con otro aplicador de madera en otra caja Petri con medio NB y antibiótico (Ampicilina).

Las cepas que contiene el plásmido no deben presentar inhibición de crecimiento en la caja con ampicilina.

* Sensibilidad de la luz UV. A partir del cultivo bacteriano, sembrar con un aplicador de madera una línea recta en una caja de Petri con medio mínimo Vogel-Bonner complementado con histidina 0.1M/biotina 0.5mM. Marcar la caja





Petri con líneas paralelas y colocar la lámpara de luz UV a 20 cm de la caja. Con papel aluminio cubrir la superficie y cada 15 seg de irradiación, correrlo de acuerdo a las líneas marcadas. Incubar la caja Petri, a 37 °C envuelta en papel aluminio para evitar el contacto con la luz de la región irradiada.

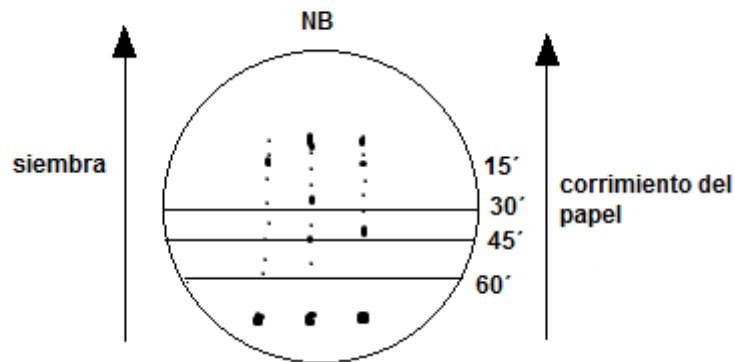


Figura 4. Sensibilidad de la luz UV.

Las cepas con el marcador *uvrB* crecen en la zona no irradiada con la luz UV.

7.2.1.2 Frecuencia de reversión espontánea

Para la frecuencia de la reversión espontánea, se colocaron 0.1 mL medio del cultivo bacteriano a un tubo con tapón de rosca que contiene 2 mL de agar de superficie a 45 °C, agitar suavemente y distribuir en medio mínimo de Vogel-Bonner complementado con histidina 0.1mM/biotina 0.5mM. Realizar movimientos circulares en la caja para homogenizar. Dejar solidificar el medio e incubar a 37 °C por 48 h.

Las colonias resultantes son revertantes espontáneas.





7.2.2 Antimutagenicidad del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides*

A un tubo estéril con 2 mL de agar de superficie (48° C) se le agregó 0.1 mL de cultivo bacteriano, 0.5 mL de la mezcla S9, 5 µg de BaP (10 µL) y 0.1 mL del extracto metanólico a las siguientes cantidades 150, 250, 500, 750 y 800 µg/caja. La mezcla se distribuyó en cajas Petri con medio de Vogel-Bonner complementado con histidina 0.1mM/biotina 0.5mM rotando suavemente para formar una capa homogénea. El medio se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubaron a 37 °C por 48 hrs. El número de colonias revertantes se contaron manualmente.

Las diferentes concentraciones del extracto metanólico con y sin mezcla S9 se realizó por triplicado.

7.2.3 Mutagenicidad del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides*

El ensayo se realizó con la adición y sin la adición de la mezcla S9 (0.5 mL).

A un tubo estéril con 2 mL de agar de superficie (48 °C) se le agregó 0.1 mL de cultivo de la cepa TA98, 0.5 mL de la mezcla S9 ó 0.5 mL de amortiguador de fosfato pH 7.4 y 0.1 mL del extracto metanólico conteniendo 150, 250, 500, 750 y 800 µg/caja. La mezcla se distribuyó en cajas Petri con medio de Vogel-Bonner complementado con histidina 0.1mM/biotina 0.5mM rotando suavemente las cajas para formar una capa homogénea. El medio se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubaron a 37 °C por 48 h. El número de colonias revertantes se contaron manualmente.

7.2.4 Antimutagenicidad de la QT

A un tubo estéril se le agregó 0.1 mL de cultivo de la cepa TA98, 0.5 mL de la mezcla S9, 5 µg de BaP (10 µL) y 0.1 mL de la QT a diferentes concentraciones 2, 5, 7 y 10 µg/caja (DMSO como disolvente), la mezcla se preincubó a 37 °C a 125 rpm. Después de 20 min se adicionó 2 mL de agar de superficie (48 °C). Posteriormente se distribuyó en cajas Petri con medio de Vogel-Bonner





complementado con histidina 0.1mM/biotina 0.5mM rotando suavemente para formar una capa homogénea. El medio se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubaron a 37 °C por 48 h. El número de colonias revertantes se contaron manualmente.

7.2.5 Mutagenicidad de la Quercetina (QT) [25]

El ensayo se realizó con la adición y sin la adición de la mezcla S9 (0.5 mL).

A un tubo estéril se le agregó 0.1 mL de cultivo con la cepa TA98, 0.5 mL de la mezcla S9 ó 0.5 mL de amortiguador de fosfato pH 7.4 y 0.1 mL de la QT a las siguientes concentraciones 2, 5, 7 y 10 µg/caja (DMSO como disolvente), la mezcla se preincubó a 37 °C a 125 rpm. Después de 20 min se adicionó 2 mL de agar de superficie (48° C). Posteriormente se distribuyó en cajas Petri con medio de Vogel-Bonner complementado con histidina 0.1mM/biotina 0.5mM rotando suavemente para formar una capa homogénea. El medio se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubaron a 37 °C por 48 h. El número de colonias revertantes se contaron manualmente

7.3 Efecto de la QT sobre la actividad enzimática del CYP1A

Este ensayo se basa en la conversión de un metabolito cuantificable mediante fluorescencia de un sustrato específico para cada tipo de CYP. Para cuantificar la actividad del CYP1A1 y del CYP1A2, se llevó a cabo la reacción de O-dealquilación de alcoxirresorufinas [48, 49]. Usando la etoxiresorufina como sustrato para el CYP1A1 y metoxirresorufina para el CYP1A2, de cuyas reacciones se obtiene el producto resorufina. Se preparó una curva de calibración con resorufina utilizando las siguientes concentraciones: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 pmol/mL. Se utilizaron diferentes concentraciones de QT. 1.6, 0.8, 0.2 y 0.5 µg/mL.

La actividad se determinó de la siguiente manera:





En una celda para fluorimetría se mezcló una solución amortiguadora de tris-HCl 50 mM y MgCl₂ 25mM a pH 7.6 (950 - 960 µL), sustrato específico (la alcoxi-resorrufina correspondiente a cada CYP) EROD 50 µM (20 µL) y MROD 0.5mM (20 µL), 10 µL de QT, más la fracción microsomal, CYP1A1 y CYP1A2 10 µL de volumen total. La mezcla se incubó a 37 °C por 3 min.

Posteriormente se inició la reacción con la adición de NADPH 50 mM (10 µL) en un volumen final de reacción de 1 mL. La cinética de reacción evaluada fue a 37 °C por lecturas de 15 segundos en un fluorómetro Versa Fluor ® de BioRad. La medición se realizó en una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

7.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS statistic, versión 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Los resultados se expresan como el promedio ± desviación estándar (D.E).

Los datos obtenidos no siguieron una distribución normal, los valores se transformaron (transformación logarítmica) para la homogeneidad de las varianzas. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía como pruebas estadísticas y las pruebas post hoc de Tukey (para diferencias entre tratamientos), con una $p < 0.05$ se consideró significativo.





8. Resultados

8.1 Antimutagenicidad del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides*

El efecto antimutagénico del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides*, fue evaluado por medio de su capacidad para inhibir la mutagénesis del BaP, en el ensayo de Ames. Para ello la cepa TA98 se puso en contacto con diferentes cantidades del extracto metanólico (150, 250, 500, 750 y 800 $\mu\text{g}/\text{caja}$) más la mezcla S9 y BaP (5 $\mu\text{g}/\text{caja}$). Se utilizó como control positivo BaP (5 $\mu\text{g}/\text{caja}$) en presencia de la fracción S9. El efecto antimutagénico se determinó de acuerdo a la disminución de número de colonias revertantes observadas (**Figura 5**).

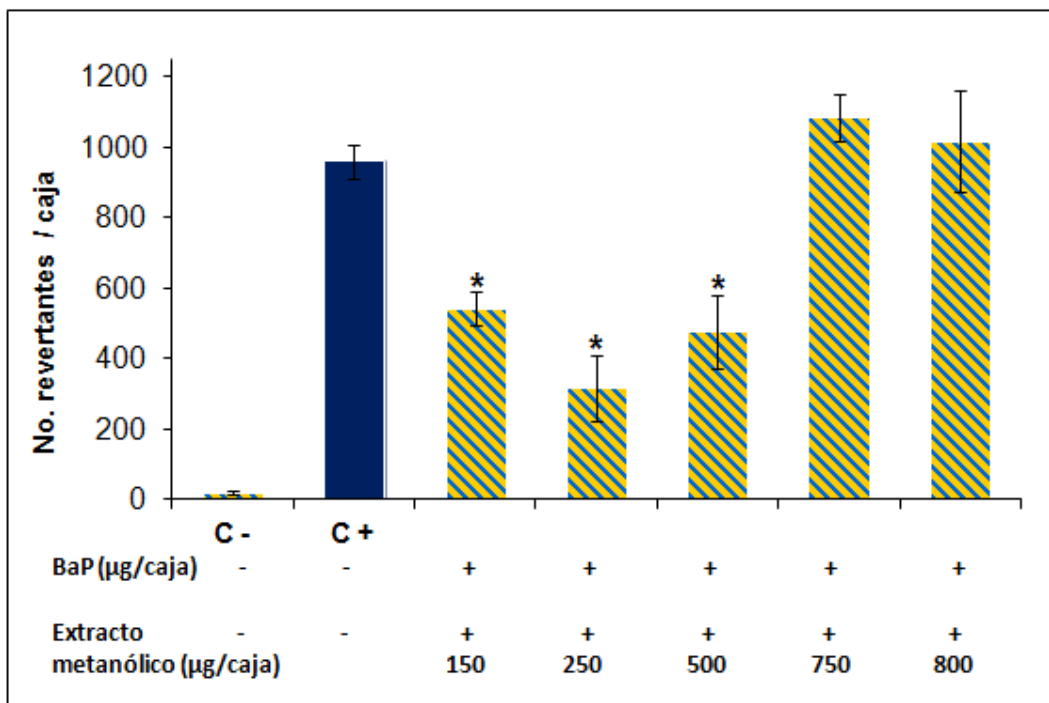


Figura 5. Efecto del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* (150, 250, 500, 750 y 800 $\mu\text{g}/\text{caja}$) sobre la mutagenicidad de BaP (5 $\mu\text{g}/\text{caja}$), en presencia de la fracción S9. Control Negativo (C-): reversión espontánea en presencia la fracción S9, Control Positivo (C+): BaP (5 $\mu\text{g}/\text{caja}$) en presencia de la fracción S9. Cada barra en la gráfica corresponde al promedio de las colonias revertantes \pm D.E, n=3, * P < 0.05.





En la **Figura 5**, se observa que el extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* tiene la capacidad de disminuir el número de revertantes inducidas por el BaP (5 µg/caja) a las concentraciones de 150, 250 y 500 µg/caja. Sin embargo, a las concentraciones de 750 y 800 µg/caja este efecto no se observa, y al contrario, existe un ligero aumento en el número de revertantes.

8.1.2 Mutagenicidad del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides*

Debido a que el extracto metanólico no presentó antimutagenicidad a las concentraciones de 750 y 800 µg/caja en presencia de BaP, se decidió evaluar la mutagénesis del extracto metanólico, en presencia y ausencia de la fracción S9. El ensayo se realizó, adicionando diferentes concentraciones del extracto metanólico (150, 250, 500, 750 y 800 µg/caja) en la cepa TA98, más la mezcla S9 o amortiguador de fosfato pH 7.4. El efecto mutagénico se determinó de acuerdo al incremento del número de colonias revertantes (**Figura 6**).

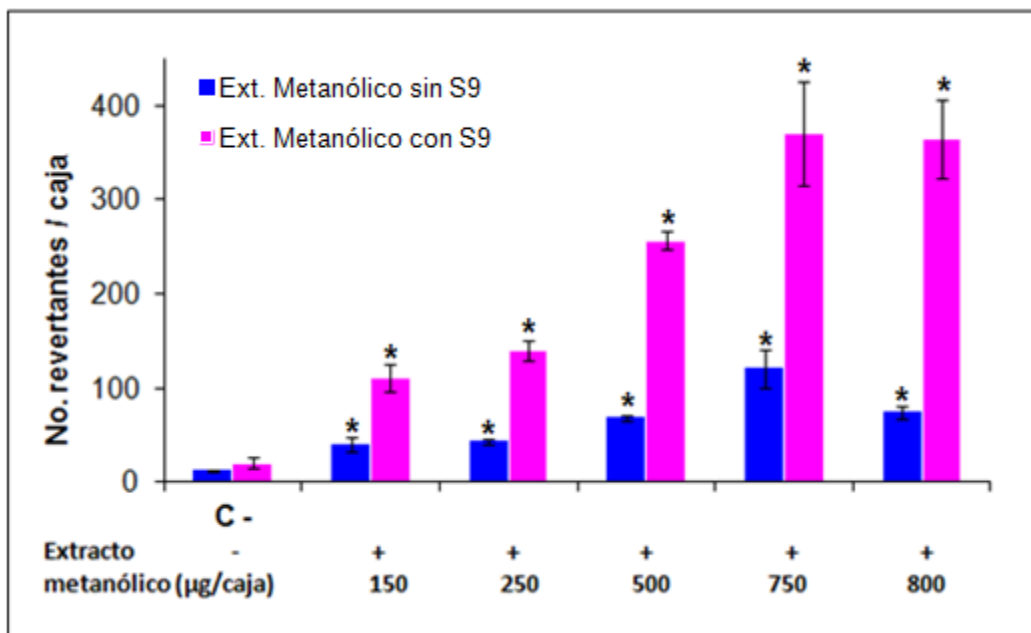


Figura 6. Efecto mutagénico del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* (250, 500, 750 y 800 µg/caja) en la cepa TA98 de en presencia (rosa) y ausencia (azul) de la mezcla S9. Control Negativo (C-): reversión espontánea de la cepa TA98). Cada barra en la gráfica corresponde al promedio de las colonias revertantes ± D.E, n=3, * P < 0.05.





El extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* en ausencia de la fracción S9, presenta un ligero aumento de colonias revertantes, al aumentar las concentraciones. Sin embargo a 800 µg/caja se observa una disminución de estas. Cuando se encuentra presente la fracción S9, se observa un incremento en el número de revertantes al ir aumentando las concentraciones del extracto metanólico, mostrando un efecto mutagénico (**Figura 6**).

8.2 Antimutagenicidad de la QT

El efecto antimutagénico de la QT fue evaluada por la capacidad de inhibir la mutagénesis del BaP, en presencia del sistema enzimático, fracción S9, en el ensayo de Ames. Para ello (**Figura 7**), a la cepa TA98 se adicionó diferentes concentraciones de la QT (2, 5, 7 y 10 µg/caja) más la mezcla S9 y BaP (5µg/caja). Se utilizó como control positivo BaP (5µg/caja) en presencia de la fracción S9. El efecto antimutagénico se determinó de acuerdo a la disminución del número colonias revertantes.



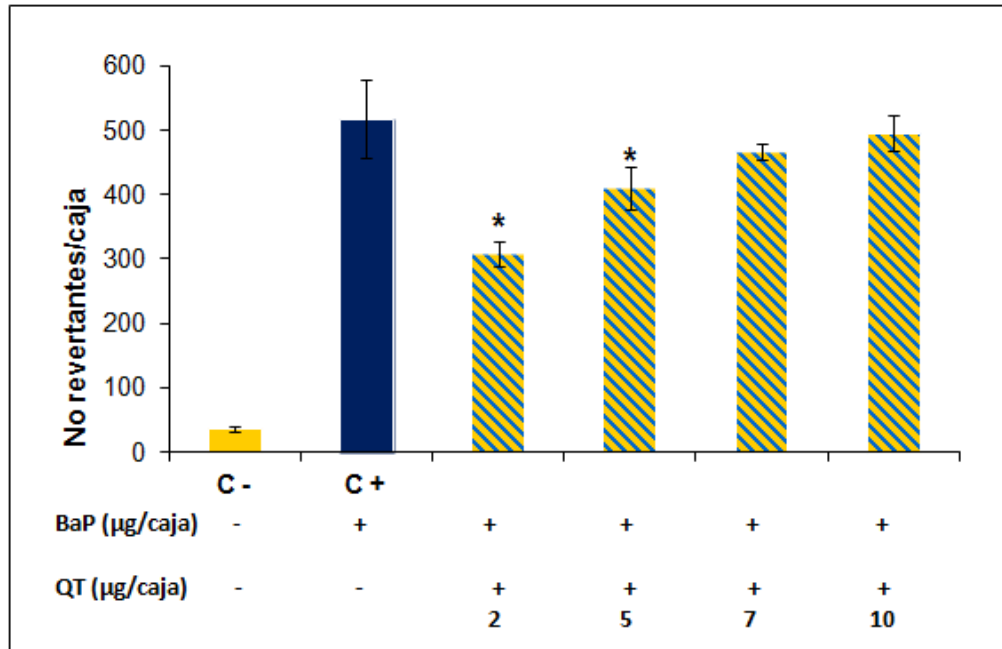


Figura 7. Efecto de la QT (2, 5, 7, 10 µg/caja) sobre la mutagenicidad de BaP (5µg/caja), en presencia de la fracción S9. Control Negativo (C-): reversión espontánea en presencia la fracción S9, Control Positivo (C+): BaP (5µg/caja) en presencia de la fracción S9. Cada barra en la gráfica corresponde al promedio de las colonias revertantes encontradas en tres cajas ± D.E, * P < 0.05 vs Control Positivo.

En la **Figura 7**, se observa que la QT tiene la capacidad de disminuir ligeramente el número colonias revertantes a las concentraciones de 2 y 5 µg/caja en presencia del BaP.

8.2.1 Mutagenicidad de la QT

Se sabe que la QT presenta un efecto mutagénico en el ensayo de AMES. Para conocer que tanto contribuye la QT en la mutagenicidad del extracto metanólico, ya que es el compuesto presente en mayor proporción, se decidió evaluar la mutagenicidad a dicho compuesto.

Se probaron las siguientes concentraciones de QT (2, 5, 7 y 10 µg/caja) en presencia y ausencia de la mezcla S9, como se observa en la **Figura 8**. Se utilizó





como control negativo la cepa TA98 en presencia y ausencia de la fracción S9. El efecto mutagénico se determinó de acuerdo al incremento del número de colonias revertantes.

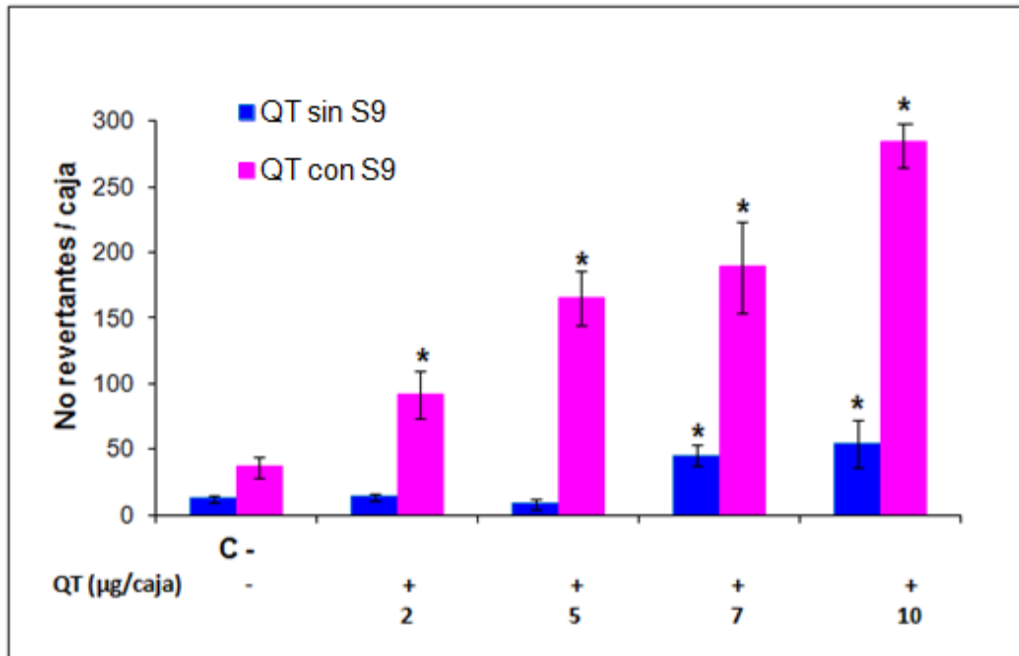


Figura 8. Efecto mutagénico de la QT a las concentraciones de 2, 5, 7 y 10 µg/caja en la cepa TA98 de en presencia (rosa) y ausencia (azul) de la mezcla S9. Control Negativo (C-): reversión espontánea de la cepa TA98. Cada barra en la gráfica corresponde al promedio de las colonias \pm D.E, n=3, * P < 0.05

La QT en ausencia de la fracción S9 no presentó efecto mutagénico a las concentraciones de 2 y 5 µg /caja, sin embargo a las concentraciones 7 y 10 µg/caja si hay un ligero aumento en el número de revertantes. Cuando se encuentra presente dicha fracción, se observa un incremento en el número de revertantes dependiente de las concentraciones de la QT (**Figura 8**). El incremento del número de revertantes se observa cuando se adicionó la fracción S9, por lo tanto, la mutagenicidad de la QT depende de la concentración de dicho compuesto y de la presencia de la fracción enzimática.





8.3 Efecto de la QT sobre la actividad enzimática del CYP1A

Se determinó el efecto que tiene la QT sobre la actividad EROD relacionada con CYP1A1 (**Figura 9**) y MROD relacionada con CYP1A2 (**Figura 10**) *in vitro* utilizando diferentes concentraciones (0.05, 0.2, 0.8 y 1.6 $\mu\text{g/mL}$). El control corresponde a la actividad basal hepática del CYP1A1 y CYP1AA2 inducida en ratas con $\beta\text{-NF/FB}$.

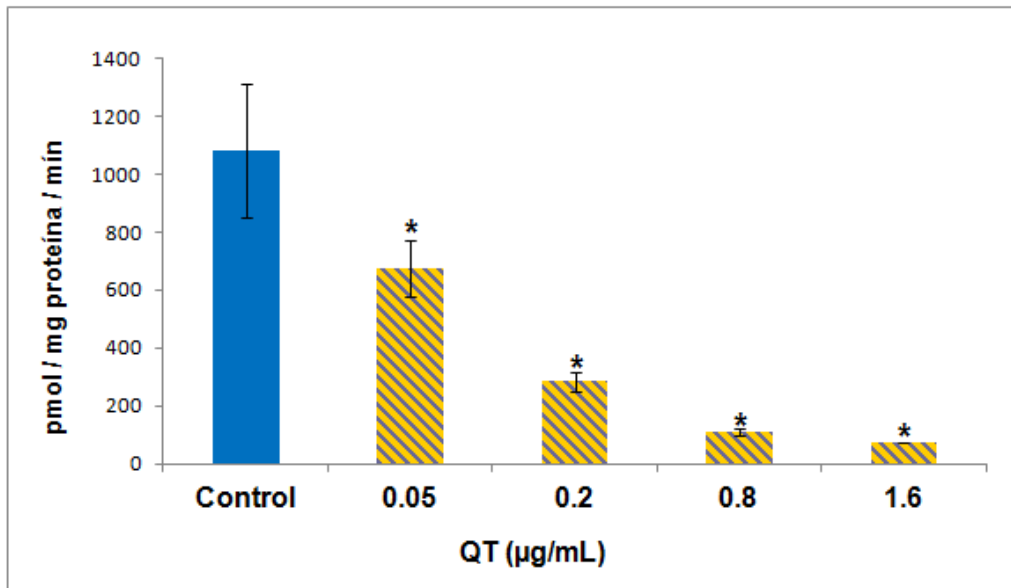


Figura 9. Efecto de la QT (0.05, 0.2, 0.8 y 1.6 $\mu\text{g/mL}$) sobre la actividad EROD del CYP1A1 en microsomas de hígado de rata tratada con $\beta\text{-NF/FB}$. Cada barra corresponde al promedio de 3 experimentos independientes realizados para cada concentración de QT \pm D.E. * $P < 0.05$ vs Control.

La QT presenta un potente efecto de inhibición sobre la actividad EROD del CYP1A1, ya que en todas las concentraciones de la misma, disminuye la actividad.



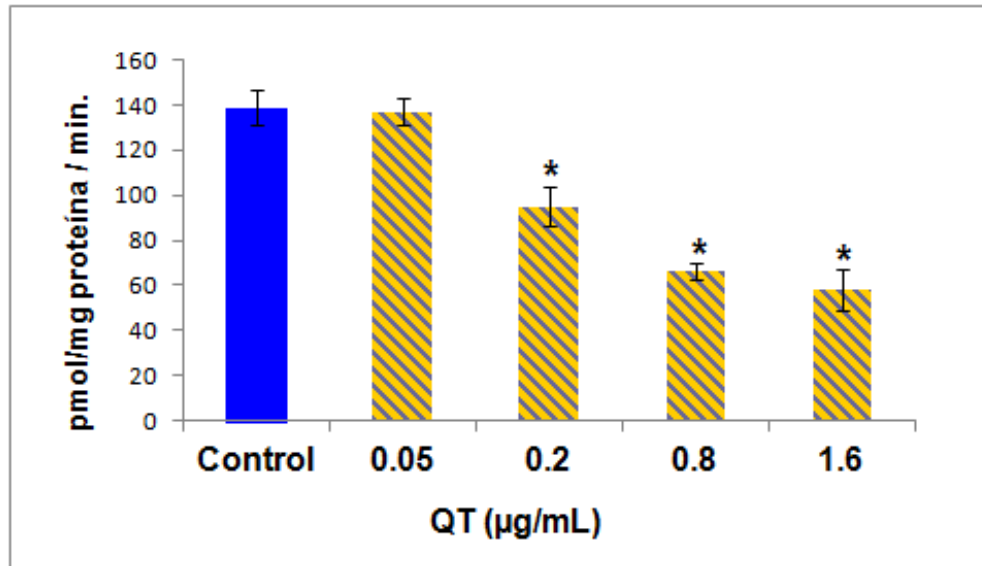


Figura 10. Efecto de la QT (0.05, 0.2, 0.8 y 1.6 µg/mL) sobre la actividad MROD del CYP1A2 en microsomas de hígado de rata tratada con β-NF/FB. Cada barra corresponde al promedio de 3 experimentos independientes realizados para cada concentración de QT ± D.E. * P < 0.05 vs Control.

La QT presenta un efecto de inhibición dependiente de la concentración sobre la actividad MROD de CYP1A2. Sin embargo, el efecto es menor que el observado sobre CYP1A1.





9. Discusión

Los resultados obtenidos indican que el extracto metanólico de *Heterotheca inuloides*, presentó un efecto dual, antimutagénico y mutagénico. Esto fue dependiente de la concentración y de la presencia de la fracción enzimática S9. La actividad antimutagénica del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* se observó a las concentraciones de 150, 250 y 500 µg/caja, en presencia del BaP (**Figura 5**), ya que fue capaz de disminuir el número de colonias revertantes. Este resultado indicó que el extracto metanólico tiene la capacidad de inhibir la mutagenicidad provocada por el BaP en la cepa TA98.

Se ha reportado que el extracto metanólico de *Euphorbia hirta*, presenta un efecto antimutagenico en la cepa TA98, en presencia de 2-aminoantraceno y 2-nitroflureno [50]. Dicho extracto contiene entre sus compuestos la QT. Este extracto al igual que el extracto metanólico de *Heterotheca inuloides*, a pesar de contener a la QT, es capaz de inhibir la mutagenicidad producida por compuestos mutagénicos.

Sin embargo, en nuestro experimento, este efecto inhibitorio no se observó a las concentraciones de 750 y 800 µg/caja, en donde se presentó un ligero aumento en el número de revertantes en comparación del control positivo que contenía BaP. Este efecto se puede atribuir a que la concentración de QT se encuentra en mayor proporción, permitiendo la formación de metabolitos mutagénicos o a la presencia de otro compuesto químico presente en el extracto. Para corroborar si el extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* por si sólo es mutagénico, se realizó el ensayo de Ames en presencia y ausencia de la fracción S9.

En el ensayo de mutagenicidad (**Figura 6**) se observó que el extracto metanólico provocó un aumento discreto del número de colonias revertantes en ausencia del sistema enzimático (S9). Pero cuando se encuentra en presencia del sistema enzimático, se observó un incremento en el número de colonias revertantes el cual





es dependiente de la concentración. Por lo tanto el efecto mutagénico del extracto metanólico depende de la concentración así como de la activación enzimática.

Existe evidencia de que el compuesto mayoritario del extracto metanólico, la QT, presenta mutagenicidad en la cepa TA98 y TA100 [24, 50, 51], la cual depende de la concentración y la activación enzimática. Estos datos sugieren que la QT tiene cierta influencia en la respuesta observada con el extracto metanólico. Sin embargo hay que tener en cuenta, que en el extracto metanólico, se encuentran presentes otros compuestos que pueden participar en la mutagenicidad de él.

Los resultados obtenidos en la antimutagenicidad de la QT (**Figura 7**), muestran el efecto de la QT en presencia del BaP, se observó que la QT fue capaz de disminuir el número de colonias revertantes a las concentraciones 2 y 5 µg/caja de QT. Sin embargo, a 7 y 10 µg/caja, el número de revertantes se asemeja al obtenido cuando el cultivo bacteriano estuvo solamente en presencia de BaP. A pesar de que no se presentó antimutagenicidad a concentraciones altas tanto de la QT como del extracto metanólico, tienen la capacidad de inhibir la mutagénesis de BaP a concentraciones bajas.

La mutagenicidad de la QT según McGregor y Jurd [24] se debe a la formación de metabolitos por enzimas que se encargan de la biotransformación. La estructura química de la QT permite que los hidroxilos libres en las posiciones 3, 5, 3' y 4', formen especies que pueden reaccionar con el DNA.

Para confirmar los datos encontrados en la literatura respecto a potencial mutagénico de la QT, se realizó el ensayo de Ames en presencia y ausencia de la fracción S9 (**Figura 8**). Los resultados muestran que en ausencia de la fracción S9, la QT no aumenta el número de colonias revertantes y sin embargo, es capaz de aumentar el número de colonias revertantes dependiente de la concentración y en presencia de la fracción S9. Dado lo anterior, los resultados confirman lo ya reportado en la literatura, que la mutagenicidad de la QT depende de la concentración así como del sistema enzimático (S9). La mutagenicidad de la QT





sobre la cepa TA98 en comparación con el control positivo (BaP), fue menor, por lo que es evidente que los metabolitos de la QT son menos reactivos que los producidos por el BaP. Por otro lado estos dos compuestos son sustratos de la familia CYP1A [22]. Esto nos permite pensar que la QT es capaz de competir por el sitio de unión enzima-sustrato., inhibiendo la actividad enzimática del CYP1A.

El resultado obtenido en el experimento, efecto de la QT sobre la actividad enzimática del CYP1A, muestra que la QT actúa como inhibidor de las isoformas CYP1A1 y CYP1A2.

En la **Figura 9** se observa que QT a las concentraciones 0,2, 0,8 y 1,6 µg/mL, actúa como un potente inhibidor de la actividad EROD. Trabajos *in vitro* realizados por Androutsopoulos *et al.* y Zhai, *et al.* [28, 52], mencionan que los flavonoides, entre ellos la QT, juega un papel muy importante en la modulación del CYP1A1, actuando como inhibidor.

Debido a que la QT es sustrato del CYP1A1, cuando se encuentra en presencia con el BaP en el ensayo de Ames, estos compiten. La formación de los metabolitos de la QT también son tóxicos y mutagénicos capaces de unirse al DNA, sin embargo son menos tóxicos que los producidos por el BaP provocando lesiones premutagénicas. Del mismo modo, la QT actúa como un inhibidor de la actividad MROD la cual es mediada principalmente por CYP1A2 aunque, si se compara con el efecto sobre la actividad del CYP1A1, el efecto es menor. A pesar de ello se confirma lo ya reportado en la literatura, que la QT tiene la capacidad de inhibir el CYP1A2 [52].

Por lo tanto, los resultados sugieren que la QT puede estar implicada en la prevención de la transformación de compuestos mutagénicos, mediante la reducción de la formación de estos a través de la inhibición de las enzimas CYP1A1 y CYP1A2, las cuales están involucradas en la activación de carcinógenos. Esta propiedad puede contribuir a la actividad antimutagénica del extracto metanólico de *Heterotheca inuloide*.





10. Conclusión

El extracto metanólico de *Heterotheca inuloides*, posee actividad mutagénica y antimutagénica, dependiente de la concentración y de la presencia de la fracción S9

La mutagenicidad del extracto metanólico puede atribuirse, por lo menos en parte, a la presencia de la QT ya que este compuesto presenta tanto mutagenicidad como antimutagenicidad en la cepa TA98.

La QT tiene la capacidad de inhibir a las enzimas CYP1A1 y CYP1A2, las cuales están involucradas en activar compuestos carcinógenos. Esta propiedad explicaría la actividad antimutagénica tanto del extracto metanólico como de la quercetina.





Apéndice

MEDIOS Y SOLUCIONES

Amortiguador de Fosfatos 0.2M pH 7.4

Solución A: Disolver 28.369 g de Na_2HPO_4 en 1000mL de agua destilada.

Solución B: Disolver 27.6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 1000 mL de aguas destilada.

Amortiguador. PH = 7.4 Tomar 81.0 mL de solución A + 19.0 mL de solución B

Guardar en refrigerador.

Cloruro de Potasio 0.15M:

Disolver 11.18 g de KCL en 1000 mL de agua destilada.

L-histidina 0.5mM/biotina 0.5mM:

Disolver 0.0077 g de L-histidina + 0.0122 g de biotina en 100 mL de agua destilada. Guardar a 4 °C en la oscuridad.

L-histidina 0.1M/biotina 0.5mM:

Disolver 1.5516g de L-histidina + 0.0122 g de biotina 100 mL de agua destilada. Guardar a 4 °C en la oscuridad.

Cloruro de Magnesio 0.4M/Cloruro de potasio 1.65M:

Disolver 8.1332 g de $\text{MgCL}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 12.3019 g de KCL en 100 mL de agua destilada. Guardar a 4 °C en la oscuridad.

Agar de superficie:

Componentes:

Bacto agar 0.6 g

Cloruro de Sodio 0.5 g





Agua destilada 100 mL.

Agar con medio mínimo, Vogel-Bonner (1L)

Solución de Vogel-Bonner: En 600 mL de agua destilada se disuelven en el siguiente orden:

MgSO₄ * 7H₂O 10 g

Acido cítrico* H₂O 100 g

K₂HPO₄ anhidro 500 g

NaNH₄ HPO₄ * 4 H₂O 175 g

Pesar 15 g de agar de bacteriológico y disolver en 600 mL de agua destilada en un matraz de 2 L

Pesar 20 g de dextrosa anhidra y disolver en 200 mL de agua destilada en un matraz de 500 mL

Disolver 20 mL de la solución Vogel-Bonner en 200 mL de agua destilada en un matraz de 500 mL

Esterilizar todos los matraces a 20 libras de presión durante 20 minutos.

Al enfriarse un poco, afin de poder manipularlas, adicionar las soluciones de dextroa y de Vogel-Bonner en el matraz que contiene el agar bacteriológico.

Agitar. Distribuir aproximadamente 30 mL de la mezcla por cada caja de Petri en condiciones estériles.

Almacenar las cajas con agar medio mínimo ya solidificado en refrigerador. El tiempo de vida es de aproximadamente 30 días.





Bibliografía

1. Strachan T, R.A., *Génética Humana*. 3a. ed, México 2006: McGraw-Hill Interamericana. 316-318.
2. Klug WS, C.M., Spencer CA, *Conceptos of genetics*. 8a ed, ed. 8a. 2006, New Jersey: Person P.H. 365-366.
3. Errol, F.C., Graham C. Walker, and Wolfram Jiede., *DNA repair and mutagenesis*. 1995, Washihg: ASW Press. 60-61.
4. Hodek P, K.J., Burdová k, Sulc M, Kizek R, Hudecek J, Stiborová M., *Chemopreventive compounds-view from the other side*. Chem Biol Interact., 2009 Jun 15. **180(1):1-9**.
5. Watson D. J, B.A.T., Bell P. S., *Molecular Biology of the Gene*, ed. 6a. 2008: PEARSON, New York. 531.
6. Pierce, B.A., *Gènética. Un enfoque conceptual*, ed. 3. 2009, España: Medica paramericana. 470-473.
7. Étienne, J., *Bioquímica genética y biología molecular*. 2001, Barcelona: Masson.
8. Ames B.N., M.D.M., *Revised methods for the salmonella mutagenicity test*. Mutat. Res, 1983. **113**: p. 173-215.
9. Espinosa-Aguirre, J.J., *Métodos para la evaluación de mutaciones génicas en Salmollena typhimurium*, in *Manual de métodos para la identificación de Mutágenos y carcinógenos químicos ambientales*. 1980, Instituto de Investigaciones Biómedicas: D.F.
10. Ames B.N., M.J., Yamasaki E., *Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity tes*. Mutation Resear, 1975. **31**: p. 347-364.
11. Ames B.N., D.W.E., Yamasaki F.D., *Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1973. **70**: p. 2281-2285.





12. Mortelmans, K. and E. Zeiger, *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. *Mutat Res*, 2000. **455**(1-2): p. 29-60.
13. Martínez, M., *Catálogo de Nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. 1984: México. p. 145-146.
14. Rzedowski G. C. de, J.R.y.c., *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2 ed. 2001, Pascuaro Michoacan. México: Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
15. Villaseñor-Ríos J. L., E.-G.F.J., *Catálogo de malezas de México*. 1998, Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica. México D.F.
16. Pérez-Agustin, *Enciclopedia de las plantas*, EDIMAT, Editor. 2001, España: Madril. p. pp.66.
17. Coballase-Urrutia, E., et al., *Hepatoprotective effect of acetonic and methanolic extracts of Heterotheca inuloides against CCl(4)-induced toxicity in rats*. *Exp Toxicol Pathol*. **63**(4): p. 363-70.
18. Haraguchi, H., et al., *Antioxidative constituents in Heterotheca inuloides*. *Bioorg Med Chem*, 1997. **5**(5): p. 865-71.
19. Segura L, F., RingbomT,VilaR,PereraP,AdzetT,, *Anti-inflammatory activity of dicloromethane extract of Heterotheca inuloides invivo and in vitro*, P. Med., Editor. 2000. p. 553-5.
20. Delgado, G., et al., *Antiinflammatory constituents from Heterotheca inuloides*. *J Nat Prod*, 2001. **64**(7): p. 861-4.
21. Kubo, I., et al., *Antimicrobial agents from Heterotheca inuloides*. *Planta Med*, 1994. **60**(3): p. 218-21.
22. Pedreschi, R. and L. Cisneros-Zevallos, *Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (Zea mays L.)*. *J Agric Food Chem*, 2006. **54**(13): p. 4557-67.
23. Fiorucci, S., et al., *DFT study of quercetin activated forms involved in antiradical, antioxidant, and prooxidant biological processes*. *J Agric Food Chem*, 2007. **55**(3): p. 903-11.





24. MacGregor, J.T. and L. Jurd, *Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in Salmonella typhimurium*. *Mutat Res*, 1978. **54**(3): p. 297-309.
25. Makena, P.S., et al., *Comparative mutagenic effects of structurally similar flavonoids quercetin and taxifolin on tester strains Salmonella typhimurium TA102 and Escherichia coli WP-2 uvrA*. *Environ Mol Mutagen*, 2009. **50**(6): p. 451-9.
26. Lautaitė S. Musonda A. C., D.J.E.a., *Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1*. *Mutagenesis*, 2002. **17**: p. 45-53.
27. Anderson O. and M. K., *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and applications.*, C.T. Francis, Editor. 2006.
28. Androutsopoulos, V.P., et al., *Comparative CYP1A1 and CYP1B1 substrate and inhibitor profile of dietary flavonoids*. *Bioorg Med Chem*. **19**(9): p. 2842-9.
29. Montellano, O.d., *Cytochrome P450, structure, mechanism, and Biochemistry*. 2a ed. 1995, New York: Plenum Press.
30. González FJ, G.H., *Role of human cytochrome P450 in risk assessment and susceptibility to environmentally based disease*. *Toxicol. Environ. Health*, 1993. **40**: p. 289-308.
31. Derelansks, M.J., *Metabolic biotransformation of xenobiotics*, in *Handbook of toxicology*, CRC-PRESS, Editor. 2002.
32. Guengerich, F.P., *Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity*. *Chem Res Toxicol*, 2001. **14**(6): p. 611-50.
33. Nebert, D.W. and T.P. Dalton, *The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(12): p. 947-60.
34. Ionannides, C., *Cytochromes P450: Metabolic and toxicological aspects*. CRC Press. 1996, New York. 32.
35. Soucek, P. and I. Gut, *Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms*. *Xenobiotica*, 1992. **22**(1): p. 83-103.





36. Guengerich, F.P., *Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy*. *Cancer Res*, 1988. **48**(11): p. 2946-54.
37. Guengerich, F.P., *Molecular advances for the cytochrome P-450 superfamily*. *Trends Pharmacol Sci*, 1991. **12**(8): p. 281-3.
38. Fujii-Kuriyama Y. and Mimura, M., *Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes*. *Biochemical and Biophysical Research*, 2005. **338**: p. 311-317.
39. Shimada, T., et al., *Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs*. *Drug Metab Dispos*, 1996. **24**(5): p. 515-22.
40. Conney, A.H., *Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture*. *Cancer Res*, 1982. **42**(12): p. 4875-917.
41. Nebert, D.W., *The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects*. *Crit Rev Toxicol*, 1989. **20**(3): p. 153-74.
42. Gonzalez, F.J. and H.V. Gelboin, *Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins*. *Drug Metab Rev*, 1994. **26**(1-2): p. 165-83.
43. Vistisen, K., H.E. Poulsen, and S. Loft, *Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine*. *Carcinogenesis*, 1992. **13**(9): p. 1561-8.
44. Rost, K.L., et al., *Increase of cytochrome P450IA2 activity by omeprazole: evidence by the 13C-[N-3-methyl]-caffeine breath test in poor and extensive metabolizers of S-mephenytoin*. *Clin Pharmacol Ther*, 1992. **52**(2): p. 170-80.
45. Guengerich, F.P., *Human cytochrome P450 Enzymes*, in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. 2005: New York. p. 337-398.
46. Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., et al., *Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites*. *Toxicology*. **276**(1): p. 41-8.





-
47. Matsushima T, S., Hara K, Sugura T, *A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system*. Elsevier/North-Holland, 1976: p. 85-88.
 48. Rodrigues A. D., P.P.A., *Induction of Cytochromes P4501A1 and P4501A2 and measurement of catalytic activities*. Methods in enzymology, 1991. **26**: p. 423-43.
 49. Burke, M.D., et al., *Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver*. Biochem Pharmacol, 1994. **48**(5): p. 923-36.
 50. Loh, D.S., H.M. Er, and Y.S. Chen, *Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of Euphorbia hirta*. J Ethnopharmacol, 2009. **126**(3): p. 406-14.
 51. Bjeldanes, L.F. and G.W. Chang, *Mutagenic activity of quercetin and related compounds*. Science, 1977. **197**(4303): p. 577-8.
 52. Zhai, S., et al., *Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids*. Drug Metab Dispos, 1998. **26**(10): p. 989-92.

