



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Actividad antimutagénica de la quercetina en presencia de
CYP1A1 humano**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

PABLO EUGENIO COELLO URIBE

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

2016

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



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.

Contenido

Resumen.....	3
Introducción.....	5
Mutagénesis.....	5
¿Qué es una mutación?.....	5
Mutágenos y pro-mutágenos.....	6
Mutágenos y promutágenos en el ambiente.....	7
Prueba de mutagenicidad de Ames.....	9
Enzimas humanas en prueba de Ames.....	11
Biotransformación de Xenobióticos.....	12
Citocromo P450.....	12
CYP1A1.....	14
Tratamientos con productos naturales.....	15
Flavonoides.....	16
Antecedentes.....	18
Planteamiento del problema.....	20
Hipótesis.....	21
Objetivos.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos particulares.....	22
Metodología.....	23
Reactivos.....	23
Preparación de CYP1A1 humano a partir de recombinantes de E. coli ¹²	23
Pruebas de mutagenicidad de Ames.....	24
Resultados.....	26
Caracterización del ensayo.....	26
Pruebas de antimutagenicidad de la quercetina.....	27
Comparación entre las fuentes de activación metabólica.....	29
Cambio en la actividad mutagénica por el tiempo de exposición a quercetina.....	30
Discusión.....	32
Conclusiones.....	34
Perspectivas.....	35
Bibliografía.....	36

Resumen

Existen productos obtenidos de fuentes naturales que tienen la capacidad de cambiar la manera en que los organismos reaccionan ante diferentes agentes ambientales, debido a que pueden modular los mecanismos metabólicos relacionados con su absorción, transformación o eliminación. Un caso muy particular es el de la quercetina (QT), un flavonoide presente en una gran variedad de organismos vegetales, incluyendo aquellos utilizados en la industria alimenticia. A lo largo de los años se le han atribuido capacidades antioxidantes, anti-inflamatorias, y también efectos anti-mutagénicos. En el caso de este último efecto, se ha probado que este flavonoide puede prevenir los eventos de mutación producidos por diversos agentes químicos ambientales. Existen diferentes procesos en que los organismos previenen la acumulación de estas sustancias en las células; una parte importante de estos procesos es la biotransformación de xenobióticos para facilitar su posterior excreción. Entre las enzimas que realizan este procedimiento, los citocromo P450 (CYP) son de las más importantes. Estas enzimas transforman a compuestos lipofílicos que ingresaron en la célula en productos hidrosolubles por medio de reacciones de oxidación, para posteriormente ser conjugados y eliminados del organismo. Sin embargo, algunos agentes químicos que no producen un daño genético por sí mismos, cambian cuando son transformados por este tipo de enzimas, dándoles la capacidad de interactuar con el DNA.

La QT se ha propuesto como compuesto quimiopreventivo por su capacidad de inhibir a distintas enzimas de CYP, entre estas a CYP1A1. Esta enzima es bien conocida debido a su participación en la bioactivación de compuestos promutagénicos. La QT ha sido estudiada por un largo tiempo con particular atención en la interacción que tiene con los CYP de mamíferos, (principalmente roedores). De la misma forma, se ha demostrado en pruebas de mutagenicidad que la QT reduce los eventos de mutagénesis causados por mutágenos conocidos por requerir activación metabólica. La mayoría de estos estudios involucran la activación de mutágenos por enzimas hepáticas provenientes de mamíferos. Sin embargo, existen diferencias en el comportamiento de las enzimas entre especies, y estas diferencias pueden afectar la eficacia de las reacciones metabólicas y la afinidad a ciertos sustratos. La intención de este trabajo es demostrar que la actividad protectora de la QT ante compuestos pro-mutagénicos se mantiene al utilizar enzimas de activación metabólica para el compuesto mutagénico proveniente de dos distintas especies, rata y humano. También se intenta explorar un poco más sobre el papel de la QT como inhibidor de CYP1A1, al observar lo que sucede cuando el complejo enzima-inhibidor se forma antes de que suceda la exposición a compuestos mutagénicos.

Con la enzima recombinante de CYP1A1 humano transfectada a una cepa de *E. coli* se realizaron las pruebas de mutagenicidad utilizando cepas modificadas de *Salmonella typhimurium* expuestas al conocido pro-mutágeno 2-amino antraceno (2AA) y diferentes concentraciones de QT. Esta metodología se repitió utilizando fracción S9 hepática de rata en lugar de CYP1A1 humano, y también se realizó una variante del experimento, se expuso la fuente enzimática en uso a la QT y a la *S. typhimurium* antes de añadir el 2AA a la mezcla.

Lo que se observa en los resultados es la disminución de los eventos de mutación en los casos donde la QT está presente, que inclusive llega a ser dependiente de la cantidad de QT añadida; esta tendencia se observa al utilizar tanto las enzimas de rata como el CYP1A1 humano. Cabe mencionar que al utilizar el CYP1A1 humano en nuestro estudio, la QT no mostró ser mutagénica.

Al aumentar el tiempo de interacción entre las enzimas, la QT y las bacterias de la prueba, los datos de mutación obtenidos muestran una tendencia muy similar a los experimentos realizados sin esta interacción previa, únicamente mostrando una diferencia al utilizar bajas concentraciones de QT.

De los resultados obtenidos se concluyó que a pesar de existir una diferencia entre los dos métodos de activación metabólica, la tendencia antimutagénica de la QT observada al utilizar una mezcla de enzimas animales se presenta también al utilizar CYP1A1 humano. También se explora la idea de la QT como inhibidor no reversible de CYP, con base en los resultados de los experimentos de preincubación adicional y en datos previos de aproximaciones computacionales sobre la interacción entre QT y CYP1A1.

Al comparar las vías de activación metabólica se generan también perspectivas a futuro sobre el uso del modelo de enzimas humanas recombinantes en pruebas de mutagénesis con el fin de obtener enfoques más cercanos al modelo humano en lo que concierne al descubrimiento de nuevos compuestos mutagénicos, y también de otros que puedan prevenir estos daños.

En general, a pesar de las diferencias entre las enzimas de diferentes organismos, el efecto protector que la QT presenta, y los métodos utilizados en el siguiente trabajo dan pauta para observar los efectos de diversos compuestos de interés sobre enzimas humanas individuales y contrastar los resultados obtenidos con otros modelos que utilizan enzimas de biotransformación.

Introducción

Mutagénesis

¿Qué es una mutación?

Una de las principales causas de la diversidad genética en los organismos y del cambio evolutivo que les afecta constantemente son los cambios que llegan a ocurrir en las secuencias de DNA. Estos cambios pueden generar variaciones fenotípicas que son puestas a prueba por diversas presiones de selección, lo cual es un proceso evolutivo básico. Sin embargo, rara vez es ventajoso un cambio en el código genético, siendo también posible que no tenga ningún efecto, o que pueda con llevar a eventos de muerte celular, padecimientos genéticos y carcinogénesis, los cuales pueden llegar a ser letales para el organismo en cuestión.¹

Se conoce como mutación a los procesos que producen alteraciones en la estructura del DNA o de los cromosomas, los cuales pueden producirse por diversas causas, y ocurrir de diferentes formas. La clasificación de las mutaciones considera factores múltiples, tales como el origen o la causa de la mutación, el cambio molecular en la secuencia de DNA, y el efecto resultante de ésta.

Por origen	Espontánea		Ocurren a una baja frecuencia y no se asocian a algún inductor
	Inducida		Causada por agentes físicos, químicos y biológicos.
Por localización	En células somáticas		Presentes en células no diferenciadas y pueden dar origen a malformaciones.
	En células germinales		Transmisibles a la descendencia
Por cambio molecular del DNA	Puntual (cambio de un nucleótido por otro)	Cambio de sentido	El cambio de nucleótido cambia el triplete codificante, cambiando también el aminoácido final contenido en la proteína.
		Sin sentido	Se cambia el triplete por un codón de término, parando la transcripción.
		Silenciosa	Cambia el triplete, pero codifica para el mismo aminoácido inicial, por ende, no hay efecto
		Corrimiento del marco de lectura (frameshift)	Se insertan o eliminan nucleótidos, por lo que cambian los tripletes al

		ser leídos por los ribosomas.
Por efecto fenotípico	Pérdida de función	Reduce o elimina la función del producto genético. Puede suceder por cualquier tipo de cambio molecular.
	Adquisición de función	El producto genético tiene funciones nuevas o mejoradas.
	Visible	Se produce un cambio morfológico visible que altera un fenotipo regular o <i>wild type</i> .
	Bioquímica/nutricional	Afectan la función de proteínas relacionadas con metabolismo y adquisición de nutrientes, como la capacidad de sintetizar ciertos aminoácidos.
	Regulatoria	Afectan la regulación de la expresión de los genes. Pueden activar y desactivar genes inapropiadamente.
	Letal	Cuando la mutación interrumpe un proceso esencial para la supervivencia del organismo.
	Neutral	Cuando el efecto que tiene una mutación no tiene un efecto legible en el fenotipo (como una mutación silenciosa).

Mutágenos y pro-mutágenos.

Como se mencionó, en ocasiones las mutaciones pueden ser inducidas por diferentes agentes, entre ellos varios compuestos químicos. A la capacidad de un compuesto químico de causar cambios en el material genético celular, se le denomina mutagénesis ². Los organismos están constantemente expuestos a este tipo de agentes, y éstos pueden provenir de fuentes naturales, así como de productos de reacciones químicas realizadas por la actividad humana ³. Estos compuestos mutagénicos suelen ser altamente reactivos y poseer propiedades electrofílicas, que les permiten interactuar con diferentes macromoléculas de las células, incluido el DNA.

El daño que pueden ocasionar estos compuestos es variado y depende de su estructura química: existen moléculas que pueden actuar como análogos de bases cuyo efecto será

cambiar la secuencia de ácidos nucleicos al sustituir los nucleótidos reales. Hay agentes que añaden un grupo alquilo (CH_3 , $\text{CH}_3\text{-CH}_2$) causando un cambio en el apareamiento de las bases. Otros que por su tamaño, se intercalan entre las mismas bases nitrogenadas de los nucleótidos, produciendo un desenrollamiento en el DNA. Otra manera en la que los mutágenos pueden ocasionar daño es por medio de lo que se denominan aductos en el DNA, los cuales son alteraciones estructurales del material genético causado por moléculas que se adhieren covalentemente a los nucleótidos, impidiendo procesos adecuados de replicación y reparación. Se han relacionado con aductos diferentes sustancias encontradas en el ambiente como productos de combustión de diferentes materiales, como por ejemplo las aminas heterocíclicas (AHC) producidas al cocinar ciertos tipos de alimentos de origen animal, así como compuestos contenidos en el humo de tabaco, como el acetaldehído.

Los agentes mutagénicos descritos son causantes directos de los tipos de daño mencionados anteriormente, por su capacidad de interactuar por sí mismos con el material genético. Sin embargo, existen también otros compuestos químicos que por sí mismos no son una amenaza para la estabilidad genética, pero actúan como precursores de agentes mutagénicos; al ser modificados por diversas enzimas en los organismos, los metabolitos resultantes tienen la capacidad de interactuar con el material genético y desestabilizarlo. A estos compuestos se les denomina promutágenos o también pro carcinógenos, tomando en cuenta que el proceso de carcinogénesis tiene como base la mutagénesis ². Una gran variedad de ejemplos de estos compuestos se encuentran en contaminantes del aire en la forma de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's), como el benzo [α]pireno. Estos compuestos en particular son usualmente moléculas liposolubles que pueden atravesar la membrana plasmática y entrar al citoplasma de las células fácilmente, pero al interactuar con los mecanismos metabólicos de la célula, son convertidos a una forma polar y reactiva, conforme a los compuestos mutagénicos de acción directa, descritos anteriormente⁴.

Tabla 2: Ejemplos comunes de compuestos mutagénicos y promutagénicos, traducido de ²	
Mutágenos de acción directa	Promutágenos
Gases mostaza de Nitrógeno o azufre	HPA's
Dimetil sulfato	Aminas heterocíclicas
Bis-(clorometil) éter	Aminas aromáticas
Sulfona de Propano	N-Nitrosaminas
Metil metano sulfonato	Micotoxinas

Mutágenos y promutágenos en el ambiente

El incremento en las actividades industriales y los avances tecnológicos realizados por el ser humano en los últimos siglos han tenido consecuencias ambientales que incrementan la exposición de las poblaciones a sustancias potencialmente peligrosas. Muchos compuestos mutagénicos y promutagénicos estudiados provienen, por ejemplo, de actividades humanas relacionadas con la quema de combustibles fósiles. En la actividad industrial, así como en los

motores de combustión interna utilizados en los medios de transporte de la actualidad, se genera un gran número de compuestos potencialmente dañinos tales como los nitroarenos, las aminas aromáticas y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's). En las últimas décadas, se han intentado desarrollar tecnologías de combustión reduciendo las emisiones de sus residuos, sin embargo la exposición a estos compuestos sigue siendo alta y está presente tanto en aire como en agua y suelo^{5,6}.

Los HPA's son posiblemente los contaminantes que se encuentran más ampliamente distribuidos en los ambientes humanos. Se generan en la combustión de cualquier material orgánico y se produce al quemar combustibles principalmente en la generación de energía eléctrica y por los motores vehiculares⁴, además de otros elementos cotidianos tales como en alimentos asados al carbón y humo de tabaco. El Benzo [α] pireno, su representante más estudiado, es un notable promutágeno y procarcinógeno, al ocasionar la formación de aductos en el DNA por medio del metabolito resultante de tres reacciones enzimáticas.²

Los nitroarenos resultan de la combustión del diesel y gasolina, humo de tabaco, y también de emisiones de calefactores. Por su parte, las aminas aromáticas se encuentran como materiales utilizados en la industria, pero también se pueden encontrar y aislar en una variedad de alimentos cocinados. Ambos compuestos son considerados cancerígenos, y requieren de activación metabólica para causar daño al DNA. Al ser oxidados o reducidos sus grupos funcionales, forman aril-hidroxil-aminas, las cuales son posteriormente esterificadas por la enzima *O*-acetil transferasa (OAT)⁷. La figura 1 muestra algunos de los ejemplos más importantes de estos compuestos, tales como el 2-Nitrofluoreno y el 2-aminoantraceno (2AA).

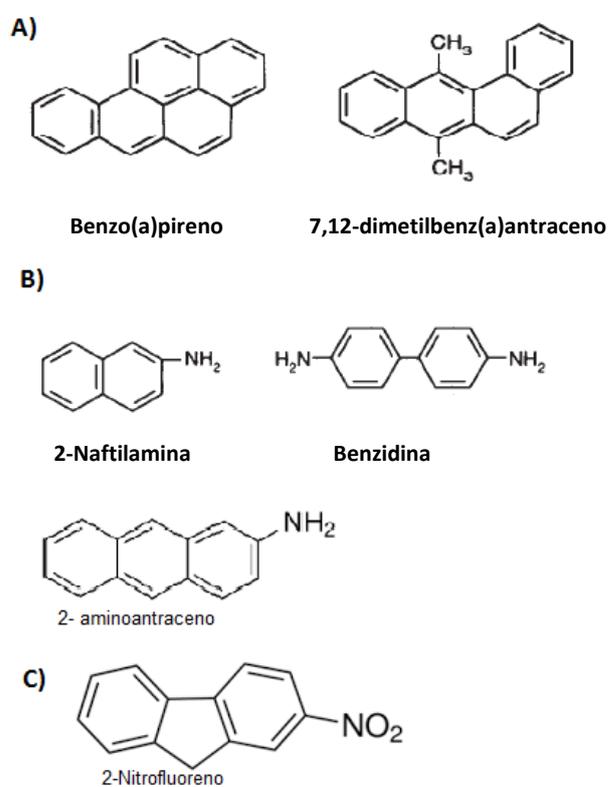


Figura 1: Ejemplos característicos de A) HPA's, B) Aminas aromáticas y C) Nitroarenos

El 2AA ha sido identificado como un componente de combustibles sintéticos que al ser liberado al ambiente es muy fácilmente absorbido al suelo y a los sedimentos acuáticos, también existe en la atmosfera como vapor y como partícula; esta absorción y acumulación también ocurre en organismos vivos⁸. Se le clasifica tanto como mutágeno como carcinógeno⁹, pues ha demostrado inducir tumores en modelos animales, sobre todo en tejidos tales como el hígado y piel. Del mismo modo ha demostrado inducir mutaciones letales ligadas al sexo en el modelo de *Drosophila*¹⁰.

Los efectos mutagénicos de éstos y otros compuestos de interés se evalúan inicialmente en bacterias, en un procedimiento conocido como ensayo de mutagenicidad en *Salmonella* o ensayo de Ames

Prueba de mutagenicidad de Ames.

Existen diferentes maneras en las que se comprueba el potencial de un agente químico para ser mutagénico o promutagénico, una forma es mediante la observación de un marcador genético modificado y conocido, el cual cambia al ser expuesto a estos compuestos. Estas pruebas se han realizado en diferentes modelos celulares tales como hongos, bacterias o inclusive cultivos celulares de mamíferos¹¹.

Uno de los ejemplos más prominentes de esta clase de pruebas es el ensayo de mutagenicidad de Ames. Este ensayo es relevante desde hace décadas pues permite clasificar compuestos no solo por su capacidad mutagénica sino también como por su toxicidad, de tal manera que es realizado por instituciones como la EPA y la FDA, para corroborar la seguridad de diversos productos químicos. Es utilizada frecuentemente debido a que es una prueba directa, sencilla y de bajo costo.

En el ensayo de mutagenicidad¹¹, se utiliza una cepa genéticamente modificada de *Salmonella typhimurium* la cual tiene una mutación en el operón de histidina, impidiendo a las células bacterianas sintetizar este aminoácido. Al no ser capaces de realizar sus funciones vitales sin la histidina, las bacterias no crecen en medios de cultivo que no tengan adicionado previamente el aminoácido. La mutación en este operón es reversible y un evento de mutación puede revertir la modificación genética en la bacteria, ya sea espontáneo o inducido por un agente químico. Para facilitar la acción de estos últimos, las bacterias utilizadas en este ensayo también poseen otras modificaciones con el fin de aumentar su sensibilidad ante mutágenos, es decir, que las siguientes modificaciones aumentan la probabilidad de que un mutágeno altere la estructura del DNA, y pueda revertir la mutación:

- **Mutación *rfa*:** Causa pérdida parcial de la pared de lipopolisacáridos que cubre la superficie de la célula, incrementando la permeabilidad a moléculas más grandes como el benzo [α]pireno.
- **Mutación *uvrB*:** Una delección de un gen que codifica para el sistema de reparación de DNA por escisión. Al eliminar un sistema de reparación, la célula ahora es más sensible a modificaciones del DNA, las cuales ahora pueden permanecer y transmitirse más eficientemente.
- **Plásmido R, pKM101:** aumenta la reversión espontánea e inducida de las células a ciertos compuestos a diferencia de cepas que no lo contienen. Intensifica un sistema

de reparación de DNA propenso a errores que se presenta de manera normal por la presencia de los genes *mucAB*, que constituyen una DNA polimerasa *error prone*.

En el ensayo de mutagenicidad de Ames, se utilizan varias cepas de *S. typhimurium* con características diferentes. Además de las ya enlistadas, existen otras variaciones y modificaciones que se realizan en estas bacterias con el fin de incrementar su sensibilidad a mutagénesis causada por ciertos tipos de compuestos químicos. Existen 4 cepas frecuentemente utilizadas y recomendadas para la mayoría de los estudios de mutagenicidad (**Tabla 3**). Sin embargo, también existen variedades creadas al adicionar genes codificantes para enzimas metabólicas, los cuales aumentan la sensibilidad de la bacteria ante ciertos compuestos, dando resultados más claros y específicos. Por ejemplo, las cepas de prueba YG1024 y YG1029 son obtenidas al añadir un plásmido codificante para una acetil-CoA; N-hidroxilarilamina O-acetiltransferasa (OAT) a las cepas TA98 y TA100 respectivamente. La adición de esta enzima aumenta la sensibilidad de las cepas al efecto mutagénico de los nitroareños y de las aminas aromáticas.⁷

Tabla 3: Cepas de prueba estándar recomendadas ¹¹***Mutación en la membrana de lipo-polisacáridos**

Cepa	Mutación	LPS*	Reparación	Factor R
TA 97	hisD6610	rfa	uvrB	+
TA 98	hisD3052	rfa	uvrB	+
TA 100	hisG46	rfa	uvrB	+
TA 102	hisG428	Rfa	activa	+

La prueba de Ames también es utilizada para evaluar compuestos promutagénicos. Estos compuestos, necesitan ser transformados por enzimas que las bacterias utilizadas en el ensayo no producen por sí mismas, por lo que es necesario añadir dichas enzimas provenientes de una fuente externa. Una fuente de enzimas metabólicas utilizada frecuentemente en ensayos de mutagenicidad de este tipo es la fracción sobrenadante proveniente de un homogenado de hígado de roedor, también denominada como fracción S9. Usualmente antes de remover el hígado de los organismos, se les administra un tratamiento con compuestos que tienen la capacidad de inducir la expresión de ciertas enzimas activadoras, con el fin de hacer más eficiente la detección de los promutágenos ¹¹. Con esta inducción, adicional al contenido enzimático naturalmente contenido en el tejido hepático de roedor, se obtiene en la fracción una variedad de enzimas involucradas en los procesos de biotransformación de compuestos, tales como los CYP.

Enzimas humanas en prueba de Ames.

Para cualquier proceso preclínico o relacionado con el bienestar de la salud humana, es necesario predecir el efecto que tendrán ciertos compuestos en seres humanos. Los modelos animales son efectivos para descubrir inicialmente los efectos de dichos compuestos, sin embargo, tienen limitaciones las cuales se definirían por las diferencias que existen entre las enzimas animales y las humanas, en cuestiones de actividad especialmente.

En la sección anterior se mencionó la llamada fracción S9 proveniente de tejido hepático de roedor utilizada en las pruebas de Ames para evaluar a un compuesto como promutagénico. Sin embargo, debido a las diferencias en cuanto a actividad y afinidad de sustratos que existen específicamente entre las enzimas de rata en esa preparación y sus equivalentes en humano, es importante realizar las pruebas con enzimas humanas en mente. Existen modelos en células de mamíferos, levaduras y bacterias tales como *Escherichia coli* que han sido transfectadas con genes que expresan diferentes enzimas metabólicas que toman parte en la transformación de xenobióticos. En particular los modelos de *E. coli* parecen ser los más adecuados debido a que sus metodologías están más establecidas y son de más fácil manejo que los otros dos. ¹²

Estos modelos principalmente utilizan genes pertenecientes a una superfamilia de enzimas metabólicas denominadas como citocromos P450 (CYP), las cuales, junto con las reacciones de biotransformación que realizan se explicarán a continuación.

Biotransformación de Xenobióticos

En los organismos, existen diversos procesos por los cuales se eliminan sustancias externas desconocidas, evitando su acumulación en las células y previniendo daños potenciales inducidos por estos llamados xenobióticos. Sin embargo, existen muchos agentes externos que ingresan con relativa facilidad al organismo y son difíciles de eliminar, principalmente debido a sus propiedades lipofílicas. Debido a esto, su eliminación depende de que su estructura sea modificada para convertirse en elementos solubles y sean así eliminados con mayor facilidad, en un proceso denominado como **biotransformación**.

Estas reacciones modifican las propiedades de diversos compuestos, haciéndolos más propensos a ser excretados, pero también cambian el efecto que tienen sobre el organismo, ya sea benéfico o negativo, debido a que dichos efectos dependen de la estructura química del xenobiótico en cuestión. En la mayoría de los casos, estos cambios pueden significar la disminución del efecto farmacológico de un medicamento, así como la reducción del efecto tóxico de algún compuesto externo. Existen compuestos que son inertes, o no tienen propiedades reactivas hasta que se involucran en una reacción de biotransformación, como es el caso con ciertos medicamentos, así como el ejemplo de los compuestos promutagénicos mencionado anteriormente.²

Las reacciones mediadas por enzimas de biotransformación suelen generalmente dividirse en 2 tipos: Fase I y Fase II. Las enzimas de fase I (conocida como funcionalización) realizan hidrólisis, oxidación y reducción, exponiendo o insertando un grupo funcional polar, resultando en un aumento en las propiedades hidrofílicas del compuesto. La fase II, denominada como conjugación, consiste en reacciones de glucuronidación, metilación, acetilación, sulfonación, y conjugación con glutatión o con aminoácidos; las cuales por medio de co-factores reaccionan con los grupos funcionales resultantes de las reacciones de fase I, a no ser que ya estén contenidos en el xenobiótico.^{2,13}

La mayoría de las enzimas de fase I están involucradas con procesos de eliminación de sustancias tóxicas, pero también son capaces de activar compuestos precursores de agentes mutagénicos.¹³

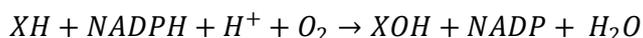
Citocromo P450

Las enzimas de fase I están conformadas en su mayoría (70-80%) por una superfamilia de hemoproteínas denominadas como citocromo P450 (CYP)¹³. Entre todas las enzimas de biotransformación de xenobióticos, los CYP poseen una gran versatilidad y abarcan una gran cantidad de sustratos que pueden tanto preparar para su eliminación del organismo, así como activar metabólicamente a compuestos activos². Estas enzimas fueron encontradas inicialmente en preparaciones microsomales de hígado de mamífero, pero hoy en día se ha confirmado su presencia en una enorme variedad de tejidos y órganos, así como en otros animales, plantas, hongos, bacterias e inclusive virus.¹⁴

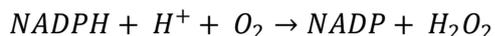
A la fecha se han descubierto más de 230 diferentes genes codificantes para estas enzimas, 57 de ellas en humanos y parecen estar presentes en virtualmente cualquier tejido, especialmente concentradas en el tejido hepático^{2,14,15}.

El sistema enzimático de los P450 está involucrado en varias vías metabólicas tanto de xenobióticos, así como endobióticos y poseen tres tipos diferentes de actividad¹⁶:

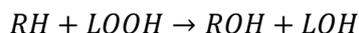
- Actividad Monoxigenasa: En la presencia de Oxígeno y NADPH, los compuestos inertes pasan por un proceso de hidroxilación, epoxidación, desalquilación, desaminación, sulfoxidación, desulfuración y deshalogenación oxidativas. En general, la reacción que ocurre sigue el siguiente patrón:



- Liberación de especies reducidas de Oxígeno (actividad oxidasa): involucra la transferencia de electrones del P450 reducido al oxígeno molecular, formando de esta forma anión superóxido y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), por medio de la siguiente reacción



- Actividad Reductasa: Sucede en condiciones anaerobióticas y en presencia de NADPH; se realiza una transferencia de electrones a un sustrato reducible, produciendo intermediarios de radicales libres.
- Adicionalmente, también presenta una actividad peroxidasa, realizando reacciones de hidroxilación de sustratos, siguiendo la siguiente fórmula:



Estas reacciones pueden realizarse en un muy amplio número de sustratos debido a que existen Enzimas múltiples que conforman a la gran familia de CYP, las cuales están adaptadas, cada una, a metabolizar grupos de compuestos con estructuras similares¹⁵. Las enzimas de CYP, también denominadas isoformas, se encuentran en diferentes proporciones dependiendo del tipo celular, así como diversas condiciones endobióticas y xenobióticas que pueden inducir o inhibir su expresión. Todas estas isoformas se clasifican en diversas familias y subfamilias por un método de nomenclatura que ha sido refinado conforme se han descubierto nuevas formas y nuevos detalles sobre sus secuencias de aminoácidos. La clasificación se hace con base al porcentaje de identidad en su secuencia genética o proteica con otros CYP previamente descubiertos, y son asignados a una familia y subfamilia, las cuales se nombran por valores alfanuméricos después de la abreviatura CYP¹⁵.

En el presente trabajo, se le prestará atención a los CYP encontrados en humano que están relacionados con la biotransformación de xenobióticos, los cuales se listan en la **Tabla 4**. Algunos de estos CYP tienen una gran relevancia en el metabolismo de sustancias externas, como en el caso de la subfamilia 1A así como el CYP3A4 (al cual se le atribuyen reacciones metabólicas de aproximadamente el 50% de los medicamentos desarrollados actualmente) para poner algunos ejemplos.

Tabla 4: Citocromos P450 humanos relacionados con el metabolismo de Xenobióticos. Tomado y traducido de^{14,15}.

CYP	Tejido	Substratos principales	Reacción común
1A1	Pulmón, sitios extra-hepáticos	Hidrocarburos policíclicos aromáticos	Hidroxilación de Benzo [α]pireno
1A2	Hígado	Aminas Heterocíclicas	N-desmetilación de cafeína
2A6	Hígado, Pulmón.	Cumarina Nicotina	Hidroxilación de Cumarina

		Alcoxiéteres Nitrosaminas	
2A13	Tejido nasal	Cumarina NNK(producto de tabaco)	Activación de NNK
2B6	Hígado, Pulmón.	Ciclofosfamida Anestésicos varios	Desmetilacion de S-Mefenitoína
2C8	Hígado	Taxol Troglitazona Verapamil	6 α hidroxilación de Taxol
2C9	Hígado	Ácido linoleico Vitamina A Tolbutamina	Metil Hidroxilacion de Tobutamina
2C18	Hígado	Fenitoina Tolbutamina	Metabolismo de Fenitoina
2C19	Hígado	(S)-Mefenitoina Omeprazol Warfarina Talidomida	Hidroxilacion de S-Mefenitoina
2D6	Hígado	Debrisoquina Triptamina	Hidroxilación de Debrisoquina
2E1	Hígado, pulmón, tejidos varios.	Benceno Etanol Acetona Acetaldehído Cloroxazona 4-nitrofenol N-Nitrosaminas	Hidroxilación de Cloroxazona
2F1	Pulmón	3-Metil Indol Naftaleno Estireno	Activación de 3-Metil indol
3A4	Hígado, intestino delgado	Lovastatina Ciclosporina Sildenafil (viagra) Testosterona Colesterol Tamoxifen	6 β Hidroxilación de Testosterona
3A5	Hígado, pulmón	Similares en general a CYP3A4 Aflatoxina B1	3 α Hidroxilación de Aflatoxina B1
3A7	Hígado fetal	DHEA Testosterona Aflatoxina B1 Aminas heterocíclicas.	16 α Hidroxilación de Deshidroepiandrosterona (DHEA)

CYP1A1

La familia CYP1 se compone de dos subfamilias principales, CYP1A y CYP1B. De ambas, CYP1A ha sido la más extensamente caracterizada y consiste en 2 miembros principales: CYP1A1 y CYP1A2, cuyos genes se encuentran contenidos en tándem en el cromosoma 15 humano, así como también se encuentran en el genoma de otros mamíferos. Estas enzimas se han

relacionado con función desintoxicante, y también con la capacidad de activar promutágenos y procarcinógenos.

CYP1A1 se expresa basalmente en tejido pulmonar, placenta y en tejidos embrionarios de hígado, aunque puede ser inducido en otros órganos por diversas sustancias, tales como la β -naftoflavona¹⁷. Esta inducción se realiza por medio del receptor de aril hidrocarburos (Ahr), el cual es una proteína con acción de factor transcripcional que se encuentra estabilizado en citoplasma por proteínas chaperonas. Al unirse con un agonista apropiado, el receptor se mueve al núcleo y forma un dímero con la proteína ARNT mediante lo cual podrá interactuar con los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE), secuencias específicas de DNA encontradas en las regiones promotoras de diversas enzimas, entre ellas CYP1A1.¹⁵

Entre los sustratos conocidos de esta enzima que pueden ser bioactivados se encuentran principalmente HPAs, tales como el benzo [a] pireno.¹⁵ También se han encontrado y estudiado sus interacciones con otros compuestos encontrados entre los contaminantes del aire, tales como aminas heterocíclicas y aminas aromáticas.¹⁸

Como ya se mencionó, estas isoformas de CYP pueden ser inducidas e inhibidas por compuestos externos, tanto de origen sintético como de origen natural.

Tratamientos con productos naturales

A lo largo de la historia de la humanidad, los tratamientos basados en productos naturales han sido ampliamente utilizados para aliviar malestares simples, así como para reducir los síntomas de enfermedades de mayor magnitud, tales como el cáncer por ejemplo¹⁹. Anteriormente, se evaluaban diferentes extractos o alimentos provenientes de estas fuentes naturales como posibles elementos capaces de prevenir diversas enfermedades o de efectos tóxicos de contaminantes ambientales, como lo han sido, por ejemplo, el té hecho con hojas de plantas como *Camelia sinensis*²⁰ también conocida como el té verde y *Heterotheca inuloides*, también conocida como árnica^{21,22}.

Con las tecnologías desarrolladas en la actualidad, se han descubierto los fundamentos de las terapias tradicionales, así como los productos químicos activos que causan el efecto terapéutico o preventivo. Utilizando estos descubrimientos se han desarrollado múltiples medicamentos con compuestos activos provenientes de plantas, bacterias y animales. Los efectos de estos agentes varían desde antibióticos, antiinflamatorios, antioxidantes, entre muchos otros. Sin embargo, también se ha propuesto el uso de compuestos de origen natural para realizar procesos de quimioprevención^{19,23}.

En los últimos años, con el incremento en el uso de la medicina alternativa y complementaria, se han utilizado en mayor medida compuestos de origen natural dentro de las poblaciones, y se ha observado en datos epidemiológicos, que estos componentes en la dieta pueden inhibir los procesos que llevan a la carcinogénesis, así como disminuir las posibilidades de riesgo de generar cáncer en humanos.⁶ De manera más particular, se ha observado que diversos extractos herbales pueden inhibir a los CYP y a otras enzimas relacionadas con las reacciones que realizan, interfiriendo en reacciones metabólicas probadas *in vitro*²⁴.

Entre los principales agentes quimiopreventivos se encuentran aquellos como los vinca alcaloides y los taxanos, así como otras sustancias inhibidoras de topoisomerasas. Sin embargo, también se señalan a diversos antioxidantes de origen vegetal, tales como los flavonoides^{6,19}

Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios encontrados en los tejidos vegetales, en particular de plantas vasculares. Son pigmentos presentes tanto en hojas como en flores y frutos, y son en parte responsables de las tonalidades de los mismos y cumplen principalmente funciones defensivas, y también como apoyo a la reproducción. Su papel como pigmentos llamativos logra que los frutos sean esparcidos por los organismos que los consumen; y por otra parte, sus propiedades tóxicas y mutagénicas prueban ser suficientemente efectivas en prevenir que los insectos se alimenten de los tejidos de la planta o del fruto²⁵. Son de una muy amplia distribución, encontrándolos fácilmente en casi todos los productos vegetales producidos para la alimentación humana.

En cuanto a su estructura, los flavonoides son derivados de benzo- γ -pirona y se dividen en seis clases principales por sus estructuras moleculares: Flavonoles, Flavonas, Flavanonas, Flavonoles, isoflavonas y antocianidinas.⁶ (Figura 2)

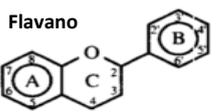
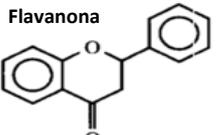
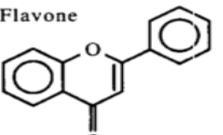
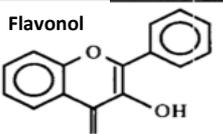
<p>Flavano</p> 	<p>Catequinas</p> <p>Meciadonol</p>
<p>Flavanona</p> 	<p>Taxifolina</p> <p>Naringerina</p> <p>Naringina</p>
<p>Flavone</p> 	<p>Luteolina</p> <p>Apigenina</p>
<p>Flavonol</p> 	<p>Quercetina</p> <p>Miricetina</p> <p>Gosipetina</p> <p>Cirsiliol</p> <p>Morina</p> <p>Kaempferol</p> <p>Gulangina</p> <p>Baicaleina</p> <p>Quercetrina</p> <p>Gospina</p>

Figura 2: Estructura general de los flavonoides, así como ejemplos de compuestos con estas estructuras.⁵

Como se mencionó, muchos compuestos de origen vegetal están siendo estudiados por sus propiedades como nutraceuticos, es decir, como componentes de la dieta que pueden complementar un tratamiento médico al trabajar en conjunto con diversos medicamentos. De la misma forma, se han observado diversas capacidades quimiopreventivas, tales como atrapar especies reactivas de oxígeno y quelar metales pesados. De la misma forma, se ha encontrado que los flavonoides pueden modular a diferentes proteínas involucradas en la homeostasis y

control del ciclo celular^{6,21}, así como a diversas vías del metabolismo entre las cuales se encuentran los citocromos P450.^{5,19}

Quercetina

De todo el grupo de los flavonoides, el que ha sido caracterizado en mayor detalle y estudiado por mayor tiempo es la quercetina (QT). Esto se debe principalmente a que este compuesto es el más comúnmente encontrado en los alimentos de origen vegetal. Está presente en productos tales como cebolla, brócoli, lechuga, tomate, y manzana, entre otras frutas y vegetales de consumo humano.^{5,6}

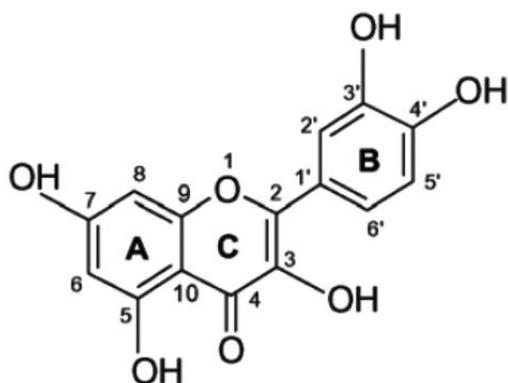


Figura 3: Estructura molecular de la QT.²⁶

Se ha reportado que la QT tiene actividades antiinflamatorias, ayuda en la prevención de enfermedades cardiovasculares y también tiene una importante actividad antitumoral²⁷⁻²⁹. Estos beneficios se han relacionado con las capacidades antioxidantes que comparten muchos flavonoides, así como la actividad moduladora sobre diversas vías metabólicas que realizan estos compuestos⁵. Por ejemplo, se ha observado que la QT puede inhibir la actividad de glutatión S-transferasa hepática de roedor *in vivo*, la cual puede ser un mediador de resistencia al tratamiento en células cancerosas.

Sin embargo, también se han reportado actividades mutagénicas y co-mutagénicas tanto de la QT como de otros flavonoides.⁶ Estudios *in vitro* han descrito que la QT puede interactuar con el DNA con el fin de estabilizar su estructura secundaria, pero que en periodos de tiempo más largos puede perturbar la configuración de la doble hélice³⁰. También se ha especulado que la oxidación del flavonoide puede llevar a la formación de H₂O₂, el cual puede causar mutaciones³¹, sin embargo, al exponer en conjunto con otros compuestos antioxidantes, el daño causado por la QT parece no ocurrir, lo que lleva a los investigadores a pensar que el daño causado por estos compuestos proviene más que nada de grupos hidroxilos³².

Antecedentes

Desde hace muchos años, los flavonoides han sido estudiados por sus propiedades antioxidantes y se han buscado otros efectos benéficos de su consumo²⁵. Entre estos compuestos, la QT se ha caracterizado con mucho detalle y es uno de los más estudiados debido a las diferentes propiedades benéficas que se le han atribuido a través de los años²³.

Principalmente por su propiedad antioxidante, la QT ha mostrado tener efectos protectores en tejido hepático de roedor por sí misma²⁸, y también en conjunto con otros compuestos dentro de un extracto natural²¹. También se ha demostrado que la QT puede tener capacidades para modular ciertas vías metabólicas^{19,23}.

Los flavonoides pueden ser inhibidores importantes de los CYP. En particular de las subfamilias CYP1A y CYP1B³³. Se ha observado en diversos estudios realizados en microsomas tanto de rata como humanos que estos compuestos reducen la actividad de O-desalquilación de etoxiresorrufina (EROD) y de metoxiresorrufina (MROD), reacciones características de CYP1A1 y CYP1A2, respectivamente³⁴. También se han hecho estudios en los que se comprueba la capacidad de los flavonoides de prevenir daño al DNA³⁵ y generación de tumores inducidos por procarcinógenos³⁶⁻³⁸ y por condiciones físicas como la luz UV³⁹. Estos resultados han sido consistentes a lo largo de la literatura, y se ha correlacionado el efecto preventivo de la QT y de otros compuestos similares a su capacidad de inhibir los CYP^{33,40}

Por otro lado, también se han descubierto en la QT efectos prooxidantes y desestabilizadores del DNA en ciertas dosis y tiempos de exposición⁴¹, los cuales también se han estudiado desde hace décadas. Estudios iniciales realizados en animales apuntaron a un posible efecto carcinogénico⁴². Sin embargo aún se ignora si el compuesto daña al DNA después de algún proceso de biotransformación y, de ser así, cuál enzima o enzimas son responsables de este efecto. Por lo pronto, los estudios que se han realizado apuntan a que estos efectos mutagénicos pueden ser causados por incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS)³² y se ha discutido que la actividad promutagénica y antimutagénica de la QT puede ser dependiente del estado de óxido-reducción del ambiente biológico en el que se encuentra⁵.

La mayoría de los experimentos de antimutagenicidad descritos utilizaron enzimas de origen animal (tales como la fracción S9) en sus protocolos, pero existen pocos datos que involucren CYP humanos como activadores de los promutágenos. A pesar de estar presentes en una variedad de mamíferos diferentes, los CYP varían en su capacidad catalítica entre las especies, particularmente aquellos relacionados con el metabolismo de xenobióticos, tales como la subfamilia 1A. Se ha demostrado que los modelos de CYP humanos recombinantes expresados en *E. coli* pueden metabolizar sustratos comunes de CYP1A1^{43,44}, tales como benzo [α] pireno⁴⁵ y también 2AA⁴⁶.

Por otra parte, la mayoría de los experimentos de anti-mutagenicidad utilizan protocolos en los cuales se exponen simultáneamente al mutágeno y al compuesto protector, cuando algunos estudios han logrado resultados diferentes alterando su metodología. En un estudio cuyo objetivo fue la determinación de prevención de carcinogénesis en células cutáneas de roedor se observó que, al administrar QT a las células 30 minutos antes que un promotor tumoral, se podía prevenir la iniciación y promoción de tumores³⁸. En otro estudio utilizando el

ensayo de Ames, se observaron los cambios en la mutagénesis causada por diferentes compuestos, al incluir la presencia de un ácido graso clorado; se observó que existía un efecto protector por parte del compuesto, pero únicamente si estaba en contacto con las enzimas metabólicas antes de exponer la mezcla de reacción a los compuestos⁴⁷

Existen datos de modelado molecular de unión específica entre la QT y CYP1A1, donde la figura 4 muestra las posibles interacciones entre la enzima y el flavonoide⁴⁸, que sugieren fuertemente que la QT pueda actuar como un inhibidor competitivo de CYP1A1; inhibición que puede resultar no reversible, impidiendo la entrada a potenciales substratos al sitio activo. También se puede pensar que estas uniones estructurales pueden suceder entre la QT y CYP1A1 sin importar el organismo que haya sintetizado la enzima.

MOLÉCULA	ENERGÍA DE UNIÓN (Kcal/mol)	INTERACCIONES	IMAGEN
QUERCETINA	-13.4	<p>PHE123, ASN222, PHE224, PHE258, LEU312, ASP313, GLY316, ALA317, PHE319, THR321, ILE386, LEU496, HEM</p> <p>1 INTERACCIÓN π-π CON PHE123, PHE224 Y PHE258</p>	

Figura 4: Datos de “docking” de la QT en el CYP1A1. Se detalla la energía con la cual se unen ambas moléculas y también se detallan los aminoácidos con los cuales interacciona⁴⁸

Planteamiento del problema

A través de los años, numerosos estudios han comprobado las capacidades protectoras de la quercetina ante diversos compuestos mutagénicos y promutagénicos^{28,30,37}. De igual manera, otros trabajos han demostrado que existe el potencial mutagénico de este compuesto, y que además el efecto es dependiente de la dosis. Sin embargo, en el caso específico de protección contra compuestos promutagénicos, es importante resaltar que la mayoría de estos estudios son realizados utilizando enzimas de origen animal con el fin de activar metabólicamente a los compuestos, principalmente la fracción S9 de hígado de roedor.

En el presente trabajo, se evaluarán las capacidades tanto antimutagénicas como mutagénicas de la QT en presencia de CYP humano y se observará si estas propiedades se mantienen similares a como se vieron en estudios previos realizados con enzimas de otros animales.

Esto tiene importancia debido a que se podrán observar los efectos que tiene la QT sobre las enzimas humanas, formando perspectivas sobre su posible utilización en el tratamiento y prevención de padecimientos relacionados con el daño al material genético. Asimismo, la metodología utilizada puede ser prevista para ser usada para evaluar otros compuestos, o utilizar distintos CYP.

Hipótesis

La QT podrá prevenir los eventos de mutación causados por un promutágeno (2-Amino antraceno) activado tanto por CYP1A1 humano, así como por la fracción S9 de roedor, manteniendo este efecto antimutagénico.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto antimutagénico de la QT en presencia del CYP1A1 humano por medio de la prueba de mutagenicidad de Ames

Objetivos particulares

- Determinar la concentración mutagénica efectiva de 2AA.
- Evaluar el efecto antimutagénico del flavonoide utilizando 2AA, un conocido compuesto promutagénico que es activado por CYP1A1 humano.
- Observar los efectos de exponer el CYP humano ante la QT antes de interactuar con un compuesto promutagénico
- Comparar estos resultados contra aquellos obtenidos utilizando enzimas provenientes de rata
- Determinar el efecto que tiene la interacción previa entre la QT y las enzimas sobre la mutagénesis causada por la activación de 2AA

Metodología

Reactivos

QT (QT), 2-Aminoantraceno (2AA), Glucosa 6-fosfato, NADP, NADPH y Dextrosa se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis MS, EEUU.). Dimetil sulfoxido (DMSO, se obtuvo de parte de Merck & Co. (Kenilworth, NJ, EEUU.). Agar bacteriológico se obtuvo de Difco. Medio de cultivo líquido fue adquirido por medio de Oxoid (Thermo Scientific. Basingstoke, Reino Unido).

Preparación de CYP1A1 humano a partir de recombinantes de *E. coli* ¹²

Para utilizar el CYP1A1 humano en este experimento, se obtuvo una preparación de membranas plasmáticas a partir de las cepas de *E. coli* DH5 α , transfectadas con un plásmido codificante de CYP1A1 que fue donado al laboratorio por el Dr. Peter Guengerich, de la Universidad de Vanderbilt en Tennessee, EUA. A partir de un cultivo en medio sólido se tomó una colonia aislada y se incubó en 10 mL de medio líquido LB durante 16 horas a 37°C.

Una vez crecido el cultivo líquido, se transfirió a un volumen mayor de medio Terrific Broth (TB) suplementado con tiamina, y se incubó a 30°C durante 5 horas. Posteriormente se realizó la inducción de las enzimas por medio de isopropil β -D-triogalactósido (IPTG) y ácido aminolevulínico (ALA).

El cultivo se dejó crecer durante 20 horas a 30°C con una agitación de 150 rpm. Al finalizar este proceso, se separó la biomasa por medio de centrifugación a 4000 g durante 15 minutos. Se resuspendió la biomasa en un buffer de Tris-acetato y se diluyó 2 veces. Se le adicionó lisozima, dejando incubar la solución en hielo durante 30 minutos.

Se volvió a centrifugar a 4000 g durante 15 minutos con el fin de recuperar los esferoplastos. A estos se les adicionó inhibidores de proteasas (PMSF, leupeptina, bestatina y aprotina). Utilizando un sonicador al 70% de la potencia máxima, se lisaron las células a intervalos de 30 segundos de sonicación y reposo por 15 minutos. Este lisado se colocó a 10,000 g durante 20 minutos, y el sobrenadante resultante se colocó en una ultracentrífuga a 100,000 g durante 90 minutos. El botón se resuspendió y almacenó a -80°C. Posteriormente se determinó la concentración de proteína contenida en la preparación por el método de Bradford⁴⁹.

Cuantificación de CYP total en la preparación de membranas

Para cuantificar la cantidad de CYP's totales en la fracción se utilizó un método de espectroscopia diferencial con monóxido de carbono¹².

A 2 ml de buffer de fosfatos de potasio adicionado con EDTA, glicerol y tritón se le añadió un volumen de la fracción obtenida para resultar en una concentración de 1mg/mL. De este volumen, se tomó 1 mL y se introdujo en una celda de policarbonato, la cual se colocó en un espectrofotómetro y se leyó una línea base entre 400 y 500 nm. Posteriormente este volumen se transfirió a un tubo distinto, y se expuso a monóxido de carbono (CO) a un ritmo de 1 burbuja por segundo durante 3 minutos. Posteriormente se le añadió al tubo una pizca de espátula de ditionita de sodio (Na₂S₂O₄), y se repitió la lectura, tomando en cuenta la longitud de onda con el pico de lectura más alto, así como las lecturas en las longitudes de 420, 450 y

490nm. Este proceso se realizó por triplicado, obteniendo un promedio de las tres repeticiones.

Una vez obtenidos los datos, se calculó la concentración de CYP por gramo de proteína utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{CYP450}]_{\text{total}} = \frac{A_{450} - A_{490}}{0.091} * \text{Factor de dilución}$$

Pruebas de mutagenicidad de Ames

Para las pruebas siguientes se siguió el protocolo de preincubación de la prueba de mutagenicidad de *Salmonella typhimurium*¹¹, el cual se describirá a continuación:

Selección de la cepa

Se utilizó la cepa YG1024 de *S. typhimurium*, la cual es una versión modificada de la cepa TA98 productora de OAT.

En una caja petri con medio completo adicionada con 25µg de ampicilina y 6.25µg de tetraciclina se sembró un cultivo de la cepa a partir de una reserva congelada donada por el Dr. Bruce Ames de la universidad de California Berkeley. Se dejó incubar 72 horas y posteriormente se tomaron 5 colonias de este cultivo, y se incubaron en medio Oxoid #2 líquido durante 16 horas.

Verificación de marcadores fenotípicos

Utilizando los 5 cultivos líquidos de la cepa, además de uno de la cepa control de *S. typhimurium*, se verificó la presencia de los marcadores fenotípicos a partir de 5 colonias de dicho cultivo, además de verificar su frecuencia de reversión espontánea. En todos los casos, las cajas se incubaron a 37°C durante 72 horas.

Pruebas de antimutagenicidad de la QT

En un tubo de centrifuga de 2mL se colocaron por triplicado 0.1 mL del cultivo líquido de 16 horas, 0.01 mL de una solución de la preparación de CYP1A1 humano inducido (suplementado con 0.1 mL de solución NADPH al 5mM) o 0.5 mL de mezcla S9, la cual contiene el extracto hepático de rata (previamente tratada con fenobarbital y α-naftoflavona), y los componentes necesarios para recrear el ambiente metabólico que necesita la enzima tales como NADP y Glucosa 6-fosfato. A ambos tipos de reacción se les añadió 0.01 mL de 2-amino antraceno a 0.01mg/mL (disuelto en DMSO) y 0.1mL de QT en concentración para colocar 0, 2, 5, 7 y 10 µg por tubo (el punto 0 siendo únicamente el disolvente, DMSO). Posteriormente estos tubos fueron incubados a 37°C durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo su volumen fue transferido a tubos conteniendo 2mL de agar de superficie, mezclado vigorosamente y vaciado a cajas Petri de medio mínimo. Se dejó gelificar el agar de superficie a temperatura ambiente y las cajas se incubaron a 37°C durante 72 horas.

Para evaluar la posible inhibición irreversible de la QT sobre el CYP1A1 y el efecto que tiene sobre el metabolismo del mutágeno, se realizó un triplicado adicional de los tubos de grupos concernientes a este trabajo, que fueron constituidos con el cultivo, la fuente enzimática (S9 o fracción membranal/NADPH) y su respectiva concentración de QT. Estos tubos se incubaron 10 minutos a 37°C a agitación de 150 rpm para posteriormente agregarles el 2AA. Una vez adicionado el agente pro-mutagénico se incubaron de nuevo a 37°C durante 30 minutos, y se siguió el mismo procedimiento de vaciado e incubación de cajas.

Resultados

Caracterización del ensayo.

Para la determinación de antimutagenicidad de QT la primera aproximación fue la determinación de la concentración efectiva mutagénica de 2-amino antraceno en presencia de CYP1A1 recombinante de humano. Por el propósito del experimento, el ensayo se realizó una vez con su triplicado interno.

Para hacer esto se realizaron curvas de mutagenicidad, inicialmente para determinar la dosis de 2AA a utilizar (Figura 5), activado por la fracción S9 y después, ya con una cantidad de promutágeno constante, se hizo una curva con diferentes cantidades de CYP1A1 (Figura 6). En ambos casos, se decidió por las cantidades que generaron la reversión más alta, sin que hubiese eventos de toxicidad.

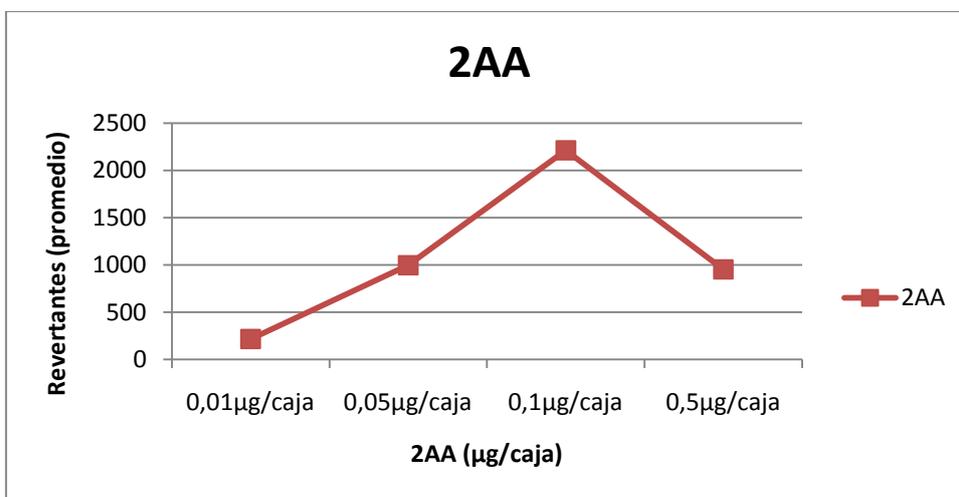


Figura 5: Curva de mutagenicidad de diferentes concentraciones de 2AA activado por fracción S9 de rata. Los resultados son comparados con la reversión de la cepa en presencia de la activación metabólica de la fracción S9, la cual es un promedio de 58

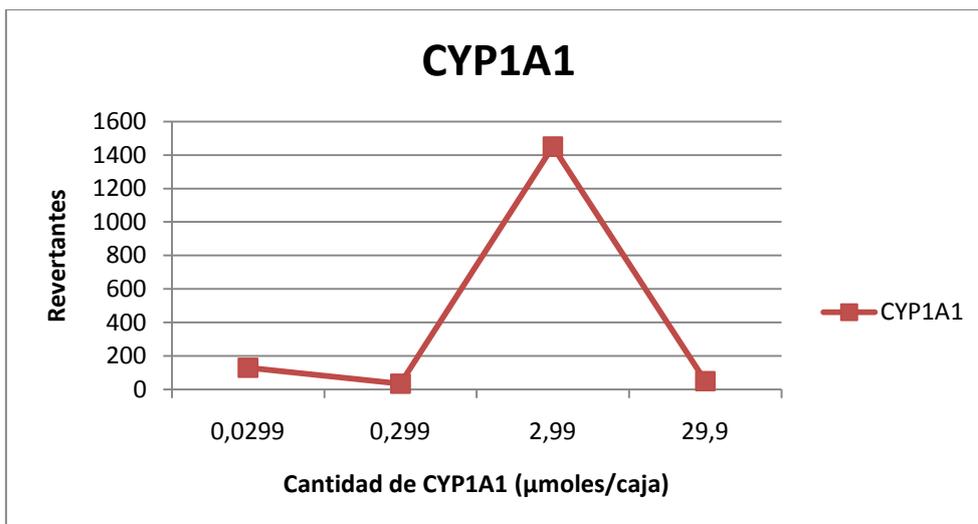


Figura 6: Curva de mutagenicidad de 0.1 µg de 2AA activado por la preparación de CYP1A1 humano en diferentes cantidades de CYP total. Los resultados son comparados con la reversión de la cepa en presencia de la activación metabólica de la fracción S9, la cual es un promedio de 52

De acuerdo con estas dos curvas, se decidió utilizar en los experimentos de mutagenicidad 0.1µg de 2AA por cada mezcla de reacción, y suficiente cantidad de la preparación membranal de CYP1A1 humano con tal de que se estuviesen utilizando aproximadamente 3 µmoles de CYP.

Pruebas de antimutagenicidad de la quercetina

Utilizando protocolos ya descritos en metodología, la siguiente aproximación fue evidenciar el efecto antimutagénico de QT sobre 2AA, para lo cual el control de reversión espontánea y el efecto de QT en presencia de S9 nos muestra que este flavonoide por sí mismo es mutagénico bajo estas condiciones (Figura 7), aunque a un nivel mucho menor que 2AA. Por otro lado, en la figura 8 se muestra la capacidad antimutagénica de la QT frente al 2AA como mutágeno. Como control del experimento se tuvo a la QT en presencia de la cepa YG1024, la activación metabólica de fracción S9 (enriquecida principalmente con CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 gracias al tratamiento previo del animal con fenobarbital y α-naftoflavona).

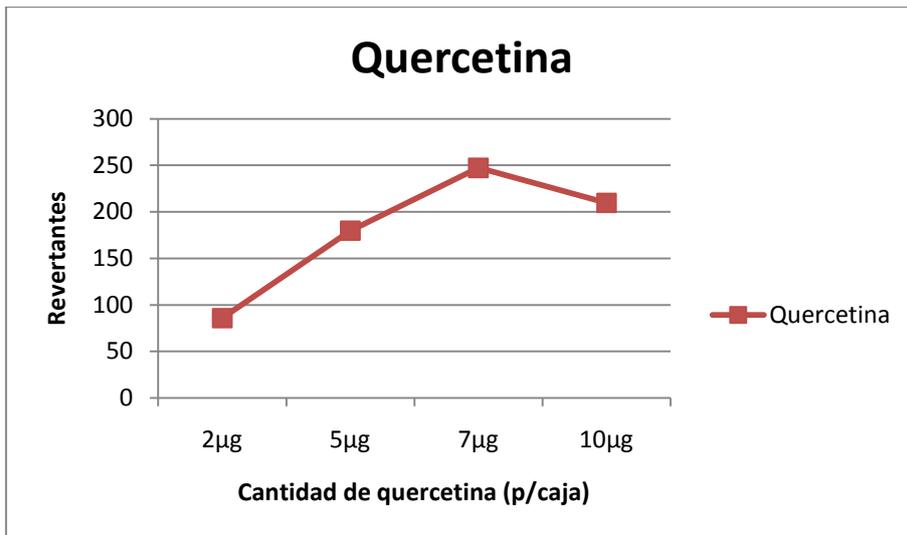


Figura 7: Actividad mutagénica de la QT. La línea superior muestra el efecto de la QT sobre la reversión de la cepa en presencia de las enzimas de la fracción S9 de rata. Se comparan estos resultados contra la reversión espontánea en presencia de S9, la cual es en promedio, 55 colonias.

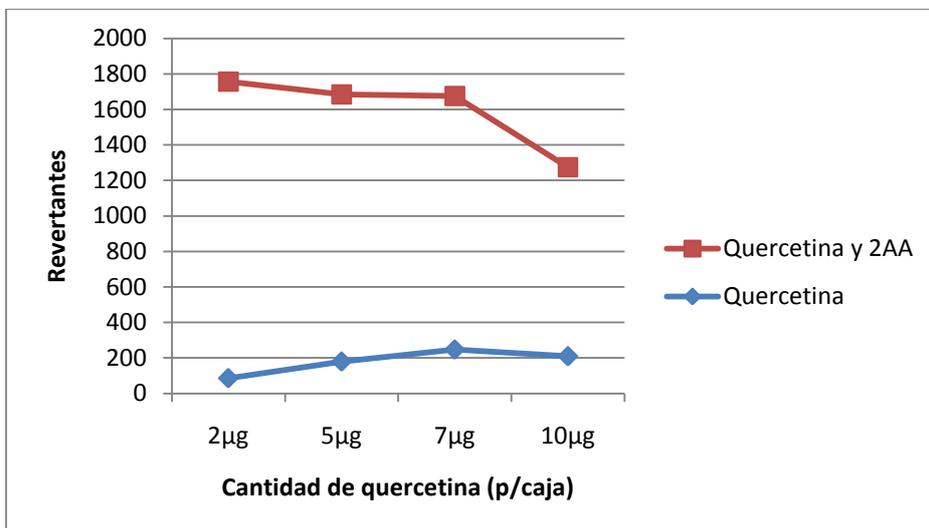


Figura 8: Efecto de las diferentes concentraciones de la QT en la mutagénesis inducida por el 2AA activado por la fracción S9 de rata. La línea azul indica la reversión causada en presencia de la QT y activación sin el mutágeno (visto en la figura 7). Se comparan estos resultados contra la reversión espontánea en presencia de S9, la cual es en promedio, 55 colonias.

Bajo estas mismas condiciones, se realizaron experimentos utilizando el recombinante de CYP1A1 humano, obteniendo los resultados observados en la figura 9. En este caso la QT no muestra efecto mutagénico, pero sí se muestra su efecto protector ante la mutagénesis de 2AA.

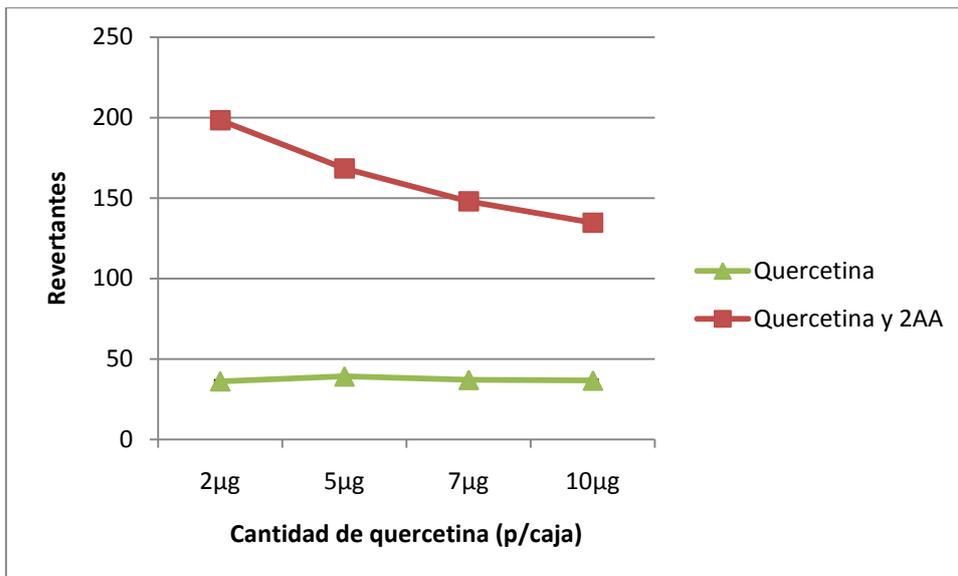


Figura 9: Efecto de la QT sobre la reversión de la cepa YG1024 en presencia de CYP1A1 humano (línea verde). Se muestra también el efecto sobre la mutagénesis ocasionada por 2AA activado por la enzima (línea roja). La reversión espontánea en presencia de activación metabólica por el CYP1A1 humano fue, en promedio, de 34 colonias.

Comparación entre las fuentes de activación metabólica.

Los datos obtenidos utilizando la preparación de CYP1A1 humano se contrastaron con aquellos utilizando fracción S9 de rata, con el fin de observar posibles diferencias o similitudes en las tendencias de mutagenicidad (Figura 10) y antimutagenicidad frente al 2AA activado (Figura 11). Es notable que al utilizar el S9 la reversión es considerablemente mayor y la QT ejerce un efecto mutagénico al aumentar la concentración, a diferencia de los resultados al utilizar CYP1A1 humano. Sin embargo, en ambos casos se muestran un efecto protector por parte de la QT, al reducirse el número de revertantes en ambos casos, y en una manera dependiente de la dosis.

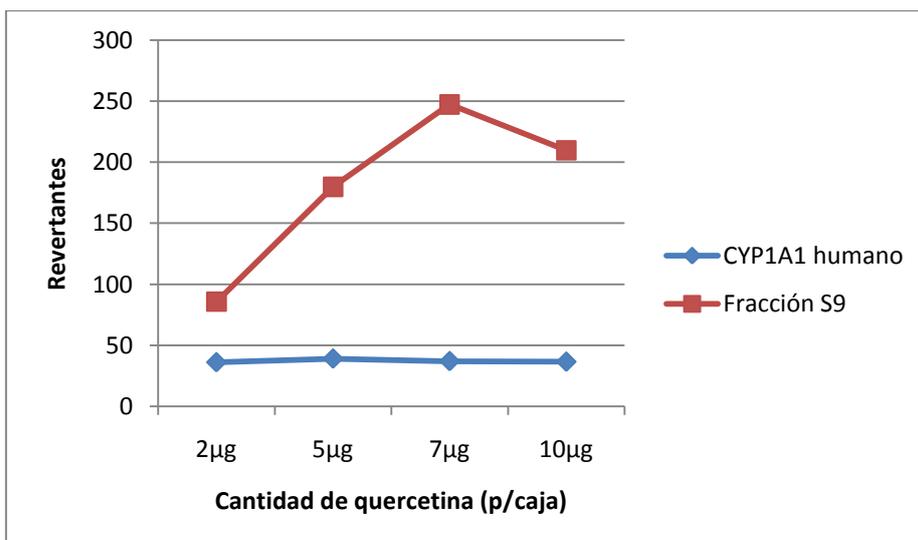


Figura 10: Efecto de la QT sobre la cepa YG1024 en presencia de fracción S9 de rata (línea roja) y CYP1A1 recombinante (línea azul).

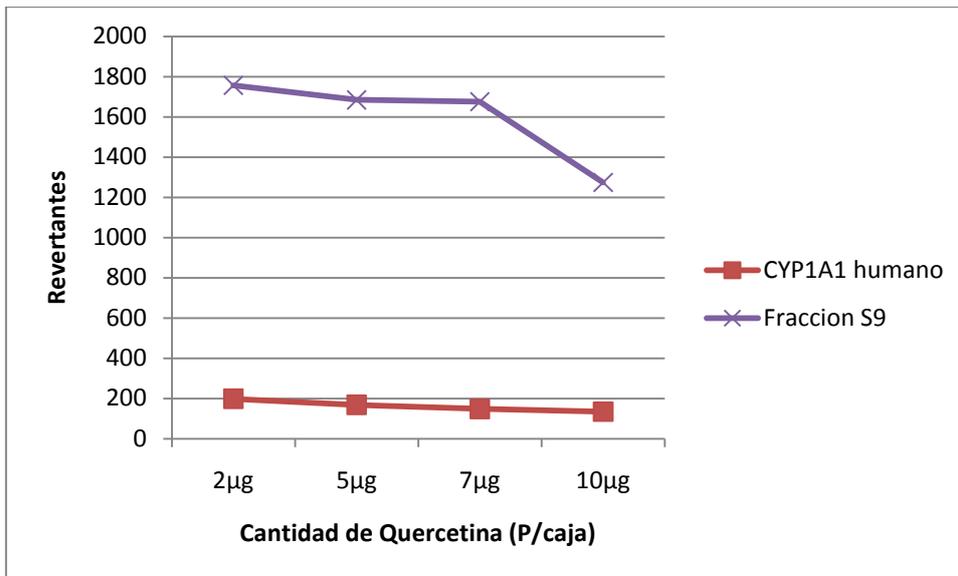


Figura 11: Comparación de la protección de mutagenicidad inducida por 2AA en presencia de fracción S9 y preparación recombinante de CYP1A1 humano por QT.

Cambio en la actividad mutagénica por el tiempo de exposición a quercetina

Se trabajó con grupos con periodo previo de incubación, en los cuales se colocó toda la mezcla de reacción de la prueba, con excepción del promutágeno (2AA), para añadirlo posteriormente a esta incubación previa. Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos de estos grupos y aquellos sin este paso adicional en presencia únicamente de QT (Figura 12) y también en presencia del promutágeno (Figura 13), en los grupos que utilizaron CYP1A1 humano como fuente de activación.

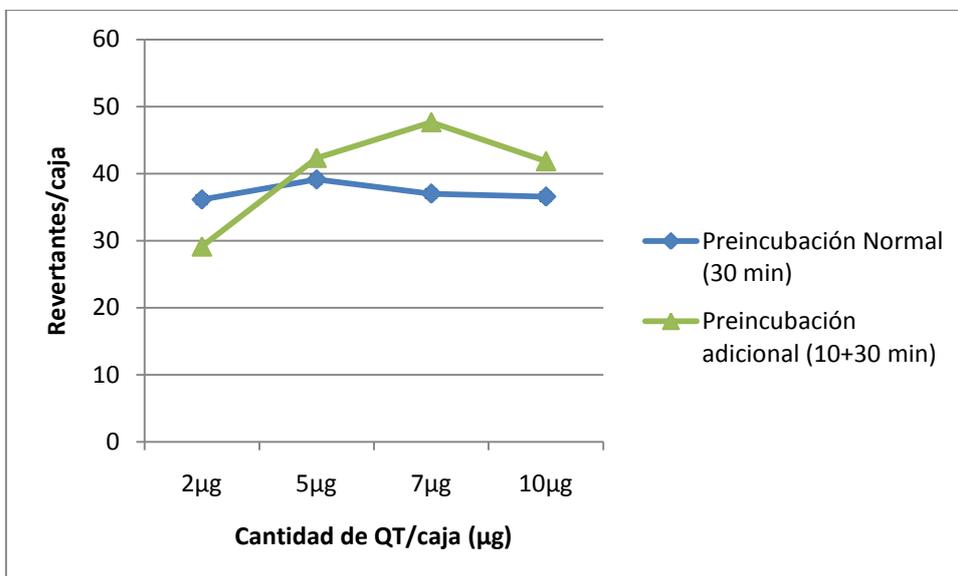


Figura 12: Comparación del efecto de la QT en la reversión de la cepa YG1024 en presencia de CYP1A1 humano entre diferentes métodos de preincubación. Se señala el protocolo común de incubación de 30 minutos (línea azul) y el método con 10 minutos adicionales de incubación (línea verde). En estos grupos no se expuso al promutágeno.

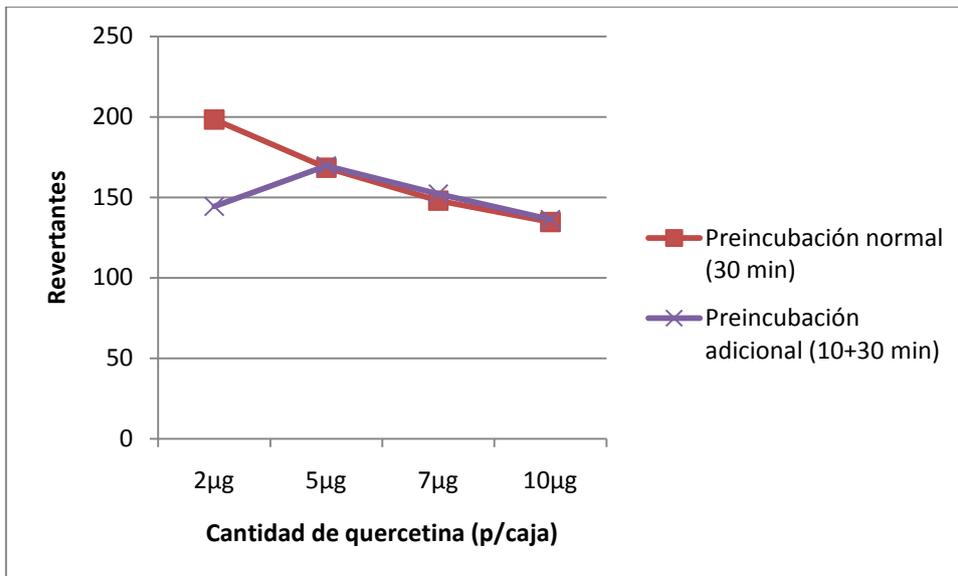


Figura 13: Efecto de la QT sobre la mutagénesis de 2AA activado por CYP1A1 humano en diferentes condiciones de exposición. Se muestran los resultados bajo el protocolo normal de preincubación (línea roja) y también aquellos realizados al exponer la enzima a la QT 10 minutos antes de añadir el 2AA (línea morada).

Interpretación:

La interpretación de los resultados en el ensayo de Mutagenicidad de Ames suele darse en modelos empíricos de observación de las tendencias de reversión. Es una convención entre investigadores que utilizan esta técnica el clasificar un compuesto como un mutágeno cuando se cumplen las siguientes condiciones^{11,50}.

- La presencia del compuesto duplica el número de colonias revertantes a comparación de la reversión espontánea
- El efecto inductor o mutagénico se da en una curva dependiente de la dosis.

Del mismo modo, para categorizar un compuesto como anti-mutagénico, se debe observar una reducción de la reversión inducida por el compuesto mutagénico de al menos la mitad, e igualmente presentar una curva dependiente de la dosis.

Discusión

Las pruebas realizadas durante este trabajo indican que el CYP1A1 humano utilizado en este experimento metaboliza al 2AA a su forma activa, produciendo un incremento en el número de revertantes en la prueba de Ames. La QT utilizada previno dicho efecto aún en la concentración más baja. En la **figura 8** se observa que existe una tendencia a reducir el efecto mutagénico de 2AA conforme se aumenta la concentración de QT. Se ha demostrado que la QT tiene la capacidad de modular a diversas enzimas pertenecientes a los CYP reduciendo su actividad⁵¹. Estos antecedentes, así como el proceso por el cual el 2AA es biotransformado concuerdan con los resultados observados en el experimento.

Se observó una tendencia similar que en el efecto protector de la QT al utilizar tanto la preparación de CYP1A1 humano como la fracción S9, reduciendo el número de revertantes conforme aumenta la dosis; sin embargo, una diferencia que se hace notar es que al ser activado por el S9, el 2AA produce un número de revertantes mucho mayor a comparación de la activación por CYP1A1 humano. La diferencia entre ambas fracciones es principalmente el origen del gen, así como la cantidad y variedad de enzimas que se encuentran en la mezcla. La fracción membranal obtenida a partir de *E. coli* únicamente tiene el CYP1A1 de origen humano, mientras que la fracción S9 contiene una mezcla de diferentes enzimas tales como las subfamilias CYP1A y CYP2B, así como enzimas de fase II como la UDP-glucuroniltransferasa (UDPGT) todas provenientes del retículo endoplásmico liso de hígado de rata. Estas enzimas también puede interactuar con elementos del experimento, como la QT y el 2AA, a diferencia de la preparación proveniente de *E. coli*, donde sabemos que actúan únicamente el CYP1A1 humano y la OAT contenida en la cepa de prueba.

Además de la variedad enzimática, es importante también notar que la cantidad total de enzimas en ambas fuentes enzimáticas son diferentes. En la preparación de CYP1A1 humano se realizó una cuantificación de la cantidad de la enzima, la cual no se realizó en el caso del S9. Esta diferencia fundamental hace que resulte difícil comparar directamente ambas fuentes enzimáticas, y probablemente influya en gran medida en la mencionada disparidad entre los efectos mutagénicos observados en cada una de ellas. En lugar de realizar esta comparación directa de efectos, lo que se buscaba observar fue si las tendencias tanto de mutagénesis así como de anti-mutagénesis continuaban ocurriendo.

A pesar de conocerse ciertas características estructurales que hacen a algunos flavonoides inhibidores más eficaces de los CYP^{33,52}, el mecanismo preciso de inhibición aún no ha sido comprendido del todo. Diversos modelos moleculares presentan a la QT en particular como un sustrato eficiente de CYP1A1 y CYP1A2⁵³, por lo que se piensa que puede tratarse de una inhibición competitiva. Con conocimiento de las interacciones que tiene la QT con CYP1A1⁴⁸, existe la posibilidad de que dicha inhibición no sea reversible debido a que el flavonoide puede quedarse unido al sitio activo de la enzima.

Con el fin de averiguar un poco más sobre la interacción que tiene la QT con el CYP1A1, se realizó otro diseño experimental en conjunto con los experimentos anteriores. En estas pruebas de mutagenicidad, se añadieron 10 minutos adicionales de incubación en los cuales la enzima, la QT y el cultivo están en contacto antes de añadir el compuesto promutagénico. Se esperaba observar que la reversión se redujera en comparación con los grupos donde no se realizó esta incubación previa. Como se observó en los resultados de la **figura 12**, a pesar de

que en la tendencia entre los dos métodos es muy similar, existe una diferencia en los valores promedio de reversión al utilizar la concentración más baja de la QT. En este y otros flavonoides no se observa que en efecto los cultivos con la incubación adicional tuvieran menor cantidad de revertantes. Dado que los datos utilizados son un promedio de varios procesos experimentales, parece ser una tendencia que se repite, sin embargo se necesitan más pruebas para corroborar si dicha tendencia es producida por el efecto de inhibición no reversible que se propuso.

Conclusiones

A pesar de las diferencias que existen al usar el CYP1A1 humano en las pruebas de mutagenicidad, las tendencias observadas en los experimentos son relativamente similares en ciertas aéreas a aquellas resultantes de experimentos donde se utilizó la fracción S9. La QT en ambos casos tiende a reducir los números de revertantes en las pruebas de mutagenicidad de Ames, pero la tendencia no es completamente igual al utilizar diferentes fuentes enzimáticas. Por otra parte, los resultados obtenidos al probar los diferentes tiempos de exposición no fueron suficientemente claros como para establecer a la QT como un inhibidor no reversible de CYP1A1.

Esta diferencia en los resultados de las pruebas de antimutagenicidad enfatiza las diferencias que tienen ambas preparaciones en cuanto al número de enzimas que contienen, así como a la cantidad, siendo el S9 un sistema de activación muy competo pero poco específico; asimismo se da a conocer la importancia en este caso de la fracción membranal de las cepas recombinantes como una forma de estudiar las capacidades mutagénicas y antimutagénicas de los compuestos enfocándose en el papel que puede jugar una enzima específica, y también enfocando las pruebas al nivel del ser humano. Este modelo presenta una alternativa al uso otros modelos, tales como el de hepatocitos humanos o al de citocromos expresados en células de insecto. Esto con el fin de aproximar la investigación a los objetivos médicos y farmacológicos que buscan un mejor entendimiento del daño producido por contaminantes ambientales, así como potenciales modos de prevención y tratamiento de enfermedades producidas por los efectos mutagénicos de los contaminantes.

La QT actuó reduciendo el efecto mutagénico de 2AA en presencia de la fracción membranal en una forma dependiente de la dosis, similar en tendencia al efecto en presencia del S9, pero en una escala diferente.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo no sólo comprueban la probable capacidad antimutagénica de la QT en humanos, sino también demuestran la utilidad que tiene el modelo de CYP1A1 humano recombinante en ensayos de mutagenicidad de Ames. Al contrastar los datos obtenidos utilizando este modelo para activar promutágenos conocidos en estos ensayos con los datos que se obtienen al utilizar enzimas de origen animal, se observa que la tendencia antimutagénica esperada continúan apareciendo sin importar el origen de dichas enzimas.

Estos resultados pueden servir como un precedente para que se continúe utilizando este modelo de relativo bajo costo y fácil manejo en pruebas de mutagenicidad y antimutagenicidad con compuestos conocidos por estas propiedades. Esto con el fin de saber si las propiedades protectoras (o mutagénicas) se conservan al involucrar un metabolismo humano. De la misma forma, debido a que estas preparaciones son exclusivamente de una isoforma de CYP, se podrá averiguar con mayor exactitud cuales enzimas están relacionadas con el metabolismo del compuesto a probar, cosa que otros modelos, como la fracción S9 hepática no podrían responder.

En el caso de la QT en particular, sus propiedades mutagénicas aún no han sido completamente descifradas. Los resultados obtenidos en el presente estudio no dan una pauta suficiente para saber qué enzima humana es responsable de metabolizar este compuesto natural, pero es posible que estudios futuros utilizando otros CYP puedan llegar eventualmente a esa respuesta.

Finalmente, se espera que los hallazgos en el presente trabajo formen una base sobre la cual las pruebas para la utilización de compuestos naturales en tratamientos y prevención de cáncer, así como otras enfermedades relacionadas con el genoma, sean llevadas con mayor facilidad a las fases de prueba con metabolismo humano, potencialmente agilizando el desarrollo de dichos tratamientos.

Bibliografía

1. Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A. & Palladino, M. A. *Concepts of Genetics*. (Pearson Education, 2014). at <<https://books.google.com/books?id=95ZUBAAAQBAJ&pgis=1>>
2. Casarett, L. J. & Doull, J. *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. (2013). at <<http://www.toxipedia.org/pages/viewpage.action?pageId=1415>>
3. Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A. & Palladino, M. A. *Concepts of Genetics, Book 1*. (Pearson College Division, 2014). at <https://books.google.com.mx/books/about/Concepts_of_Genetics.html?id=YjvioAEACAAJ&pgis=1>
4. Harvey, R. G. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity*. **7**, (CUP Archive, 1991).
5. Formica, J. V. & Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 1061–1080 (1995).
6. Gibellini, L. *et al.* Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2011**, 591356 (2011).
7. Watanabe, M., Ishidate, M. & Nohmi, T. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of Salmonella typhimurium tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* **234**, 337–348 (1990).
8. National Center for Biotechnology Information. 2-Aminoanthracene |C₁₄H₁₁N - Pubchem. *PubChem Compound Database; CID=11937* at <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11937>>
9. MeSH Browser - 2016. at <<https://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>>
10. Woodruff, R. C., Mason, J. M., Valencia, R. & Zimmering, S. Chemical mutagenesis testing in Drosophila. V. Results of 53 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environ. Mutagen.* **7**, 677–702 (1985).
11. Maron, D. M. & Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173–215 (1983).
12. Phillips, I. R., Shephard, E. A. & Ortiz de Montellano, P. *Cytochrome P450 Protocols 3rd Ed.* (2013). doi:10.1007/978-1-62703-321-3_17
13. Nebert, D. W. & Dalton, T. P. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 947–60 (2006).
14. Lewis, D. F. V. *Guide to Cytochromes: Structure and Function, Page 450*. (CRC Press, 1996). at <<https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=jl7WLZdJe6QC&pgis=1>>
15. De Montellano, P. R. O. *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry: Third edition. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry: Third edition* (2005). doi:10.1007/b139087
16. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. (Springer, 2015). at <<https://books.google.com/books?id=abZnBwAAQBAJ&pgis=1>>

17. Pretti, C., Salvetti, A., Longo, V., Giorgi, M. & Gervasi, P. G. Effects of beta-naphthoflavone on the cytochrome P450 system, and phase II enzymes in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **130**, 133–44 (2001).
18. Shimada, T. *et al.* Activation of Chemically Diverse Procarcinogens by Human Cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* **56**, 2979–2984 (1996).
19. Nobili, S. *et al.* Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol. Res.* **59**, 365–78 (2009).
20. Jha, A., Saha, S. & Verma, R. Renoprotective effect of black tea against aflatoxin induced toxicity in mice. *Toxicol. Environ. Health Sci.* **6**, 25–32 (2014).
21. Coballase-Urrutia, E. *et al.* Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology* **276**, 41–48 (2010).
22. Coballase-Urrutia, E. *et al.* Hepatoprotective effect of acetonetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* **63**, 363–370 (2011).
23. Cossarizza, A. *et al.* Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2011**, (2011).
24. Liu, K. H. *et al.* Inhibition of human cytochrome P450 isoforms and NADPH-CYP reductase in vitro by 15 herbal medicines, including *Epimedii herba*. *J. Clin. Pharm. Ther.* **31**, 83–91 (2006).
25. Grotewold, E. *The Science of Flavonoids*. (Springer, 2005). at <https://books.google.com.mx/books/about/The_Science_of_Flavonoids.html?id=DS8DGwAACAAJ&pgis=1>
26. Furia, E., Marino, T. & Russo, N. Insights into the coordination mode of quercetin with the Al(III) ion from a combined experimental and theoretical study. *Dalton Trans.* **43**, 7269–74 (2014).
27. Yang, K. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis* **21**, 1655–1660 (2000).
28. Ji, L. *et al.* Quercetin prevents pyrrolizidine alkaloid clivorine-induced liver injury in mice by elevating body defense capacity. *PLoS One* **9**, e98970 (2014).
29. Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 427–42 (2007).
30. Alvi, N. K., Rizvi, R. Y. & Hadi, S. M. Interaction of quercetin with DNA. *Biosci. Rep.* **6**, 861–868 (1986).
31. Hatcher, J. F. & Bryan, G. T. Factors affecting the mutagenic activity of quercetin for *Salmonella typhimurium* TA98: metal ions, antioxidants and pH. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **148**, 13–23 (1985).
32. Sahu, S. C. & Washington, M. C. Effects of antioxidants on quercetin-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Lett.* **60**, 259–264 (1991).
33. Androutsopoulos, V. P., Papakyriakou, A., Vourloumis, D., Tsatsakis, A. M. & Spandidos,

- D. A. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacol. Ther.* **126**, 9–20 (2010).
34. Siess, M. Heterogenous Effects of Natural Flavonoids on Monooxygenase Activities in Human and Rat Liver Microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **130**, 73–78 (1995).
 35. Lautraite, S., Musonda, A. C., Doehmer, J., Edwards, G. O. & Chipman, J. K. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis* **17**, 45–53 (2002).
 36. Lamartiniere, C. A., Moore, J., Holland, M. & Barnes, S. Neonatal Genistein Chemoprevents Mammary Cancer. *Exp. Biol. Med.* **208**, 120–123 (1995).
 37. Jin, N. *et al.* Preventive effects of quercetin against benzo[a]pyrene-induced DNA damages and pulmonary precancerous pathologic changes in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **98**, 593–8 (2006).
 38. Khan, W. A., Wang, Z. Y., Athar, M., Bickers, D. R. & Mukhtar, H. Inhibition of the skin tumorigenicity of (\pm)-7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene by tannic acid, green tea polyphenols and quercetin in Sencar mice. *Cancer Lett.* **42**, 7–12 (1988).
 39. Birt, D. F., Mitchell, D., Gold, B., Pour, P. & Pinch, H. C. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res.* **17**, 85–91 (1996).
 40. Wei, H., Bowen, R., Zhang, X. & Lebowitz, M. Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two-stage skin carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* **19**, 1509–14 (1998).
 41. Mazumdar, M., Giri, S. & Giri, A. Role of quercetin on mitomycin C induced genotoxicity: Analysis of micronucleus and chromosome aberrations in vivo. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **721**, 147–152 (2011).
 42. Ertürk, E., Hatcher, J. F., & Pamukcu, A. M. Bracken ferns carcinogens and quercetin. *Fed. Proc* **44**, 2344 (1985).
 43. Winn, M. D. *et al.* Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as substrate. *Archives of biochemistry and biophysics* **312**, 306–8 (2006).
 44. Parikh, A., Gillam, E. M. & Guengerich, F. P. Drug metabolism by Escherichia coli expressing human cytochromes P450. *Nat. Biotechnol.* **15**, 784–788 (1997).
 45. Bauer, E. *et al.* Oxidation of Benzo[a]pyrene by Recombinant Human Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 136–142 (1995).
 46. Carrière, V., de Waziers, I., Courtois, Y. A., Leroux, J.-P. & Beaune, P. H. Cytochrome P450 induction and mutagenicity of 2-aminoanthracene (2AA) in rat liver and gut. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **268**, 11–20 (1992).
 47. Vereskuns, G., Wesén, C., Skog, K. & Jägerstad, M. Inhibitory effect of threo-9, 10-dichlorostearic acid on the mutagenic activity of MeIQx, 2-AF and B P in the Ames/Salmonella test. *Mutat. Res. ...* 149–157 (1998). at <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571898000886>

48. Santes Palacios, R. Caracterización bioquímica de la dihidroxibergamotina como inhibidor de citocromo p450. (2015).
49. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
50. Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J. & Pike, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* **97**, 267–281 (1982).
51. Choi, E. J., Kim, T. & Kim, G.-H. Quercetin acts as an antioxidant and downregulates CYP1A1 and CYP1B1 against DMBA-induced oxidative stress in mice. *Oncol. Rep.* **28**, 291–296 (2012).
52. Doostdar, H., Burke, M. D. & Mayer, R. T. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* **144**, 31–38 (2000).
53. Iori, F., da Fonseca, R., Ramos, M. J. & Menziani, M. C. Theoretical quantitative structure-activity relationships of flavone ligands interacting with cytochrome P450 1A1 and 1A2 isozymes. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 4366–74 (2005).