



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFEECTO INHIBIDOR DEL EXTRACTO HEXÁNICO Y
ACUOSO DE CUACHALALATE (*Amphipterygium
adstringens*) SOBRE LAS SUBFAMILIAS DE LOS
CITOCROMOS P450 1A y 2B**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A:**

WENDY CAJERO SÁNCHEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
2016**

Ciudad Universitaria, Cd..Mx.,2016.



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.

1. Datos del alumno
Cajero
Sánchez
Wendy
(55)27623130
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
308065587
2. Datos del tutor
Dr. Jesús Javier
Espinosa
Aguirre
3. Sinodal 1
Dra. Patricia
Ramos
Morales
4. Sinodal 2
Dra. María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte
5. Sinodal 3
Dr. Juan Luis
Chávez Pacheco
6. Sinodal 4
Dr. Sol
Cristians
Niizawa
7. Datos del trabajo escrito.
Efecto inhibitor del extracto hexánico y acuoso de cuachalalate
(*Amphipterygium adstringens*) sobre las subfamilias de los
citocromos P450 1A y 2B.
60 p.
2016

*A la primera sonrisa del día y al último anochecer que quiero mirar: mis padres
Fernando y Lourdes.*

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Ciencias por ser la base de mi conocimiento. Además de ser el lugar que donde he podido crecer en muchos aspectos y donde pude conocer a personas que son muy importantes en mi vida. Por todas las oportunidades brindadas.

Al Dr. Javier Espinosa, quien me dio confianza y libertad de elegir mi propio proyecto, además de permitirme llevarlo a cabo en su grupo de trabajo. Gracias por ser tan paciente conmigo y estar al tanto en cada paso en la elaboración de este trabajo.

A la bióloga Sandra Luz Hernández por su amabilidad y buen trato. Por estar al pendiente de mí trabajo de tesis y de mi vida en general en todo momento. Por su apoyo técnico en la realización del ensayo de Ames.

Al Dr. Fausto Rivero quien me permitió llevar a cabo la obtención de los extractos en su grupo de trabajo y por brindarme las mezclas y compuestos necesarios.

A la Dra. Tzipe Govesensky por su asesoría y apoyo en el análisis estadístico de este trabajo.

A los miembros del jurado sinodal la Dra. Patricia Ramos, Dra. María Eugenia Gonsebatt y el Dr. Juan Luis Chávez por sus comentarios. Al Dr. Sol Cristians, además de haber sido parte de mi formación como bióloga, por su aporte y comentarios en este trabajo.

Agradecimientos personales

A mis papás Lourdes y Fernando porque siempre me han apoyado y estado en los buenos y malos momentos de mi vida. Gracias por el amor incondicional que me brindan. Ustedes forman gran parte de lo que soy.

A mis queridos hermanos Alain y Ulises sin los cuales no sé qué sería de mí. Son con los que puedo gritar de emoción, reír con gran fuerza y sentirme en paz. Gracias por cuidarme, apoyarme en todo lo que hago y hacerme tan feliz.

A mis grandes amigas de la vida Marina, Fany y Dulce.
Fany a quien conozco desde hace más de veinte años, por esos días inolvidables jugando en el jardín. Gracias a ti y a Carol.

Dulce a pesar de que nos hemos ausentado en muchas ocasiones, siempre pasa algo en nuestras vidas que nos vuelve a unir.

Marina mi gran amiga y confidente. Me hace llena de felicidad que compartas conmigo momentos e historias imperecederas en mi vida. Gracias por siempre apoyarme en todo sin juzgarme y animarme a seguir adelante sea cual sea mi meta.

A mis amigos y de la Facultad de Ciencias: Andrea, Daniel, Daniela, Ana Karen, Alma, Mariana, Dulce... Por todos esos momentos compartidos, risas, pláticas, las prácticas de campo, etc.

A los integrantes del laboratorio C206 del Instituto de Investigaciones Biomédicas porque siempre me hicieron sentir como en casa, por su amistad y apoyo.

ÍNDICE

1.RESUMEN	- 1 -
2.INTRODUCCIÓN	- 3 -
2.1 Citocromos P450	- 3 -
2.1.1Subfamilia 1A.....	- 6 -
2.1.2Subfamilia 2B.....	- 7 -
2.2 Inhibición de los citocromos P450.....	- 8 -
2.3 Características generales de <i>Amphipterygium adstringens</i>	- 9 -
2.4 Antecedentes.....	- 12 -
2.4.1 Compuestos aislados de <i>Amphipterygium adstringens</i>	- 12 -
2.4.2 Actividad de <i>Amphipterygium adstringens</i> sobre los citocromos P450	- 15 -
3.JUSTIFICACIÓN	- 18 -
4.HIPÓTESIS.....	- 19 -
5.OBJETIVOS.....	- 20 -
5.1 General.....	- 20 -
5.2 Particulares.....	- 20 -
6.MATERIALES Y MÉTODO.....	- 21 -
6.1 Material vegetal	- 21 -
6.2 Compuestos aislados	- 21 -
6.3 Obtención de extractos.....	- 22 -
6.4 Inducción de CYP1A y CYP2B	- 23 -
6.5 Obtención de la fracción microsomal.....	- 24 -
6.6 Cuantificación de proteínas de la fracción microsomal.....	- 24 -
6.7Determinación de la actividad enzimática.....	- 24 -
6.8 Ensayo de mutagenicidad	- 26 -
6.9Análisis estadístico	- 26 -
7.RESULTADOS	- 28 -
7.1 Apariencia y rendimiento de extractos.....	- 28 -

7.2 Efecto del extracto hexánico sobre la actividad enzimática de CYP1A y CYP2B.....	- 28 -
7.2 Efecto de la mezcla de ácidos anacárdicos y compuestos puros de <i>Amphipterygium adstringens</i> sobre la actividad de CYP2B1.....	- 29 -
7.3 Efecto del extracto acuoso sobre la actividad enzimática de CYP1A y CYP2B.....	- 31 -
7.4 CI50 del extracto acuoso, extracto hexánico, mezcla de ácidos anacárdicos y compuestos puros de <i>Amphipterygium adstringens</i>	- 33 -
7.5Toxicidad de <i>Amphipterygium adstringens</i>	- 34 -
7.6Efecto antimutagénico de la mezcla de ácidos anacárdicos	- 34 -
8. DISCUSIÓN	- 38 -
9. CONCLUSIÓN.....	- 45 -
10. PERSPECTIVAS	- 45 -
11. REFERENCIAS	- 46 -
12. APÉNDICE	- 52 -

1. RESUMEN

México es un país con gran diversidad natural y cultural lo cual ha tenido como consecuencia que la vegetación que se encuentra en nuestro país sea utilizada para diferentes fines. Uno de los diversos usos es en la medicina tradicional, la cual se sabe que desde tiempos prehispánicos se ha enfocado en el alivio de gran variedad de enfermedades; y hasta la fecha sigue vigente en gran parte del territorio mexicano.

Ejemplo de este uso es el de la corteza del árbol *Amphipterygium adstringens*, comúnmente conocido como cuachalalate, la cual es ampliamente utilizada en México como medicina tradicional para diversos malestares, pero empleada principalmente para padecimientos gastrointestinales. A pesar de que la corteza de cuachalalate se ha utilizado por varias generaciones y que en la actualidad existe una gran cantidad de estudios relacionados con sus principales usos, hasta la fecha no se había considerado la importancia de la interacción con enzimas de fase I como los citocromos p450, los cuales juegan un papel muy importante en el metabolismo de una gran diversidad de xenobióticos, entre ellos los fármacos.

La importancia de conocer el efecto de la corteza de cuachalalate sobre los citocromos p450 radica en que en muchas ocasiones los remedios de uso tradicional son mezclados con fármacos, sin saber si existe algún tipo de interacción y si ésta podría tener un efecto perjudicante.

Por lo tanto con este estudio se pretendió conocer el efecto de dos extractos de diferente polaridad y compuestos puros de la corteza de cuachalalate sobre la actividad enzimática de las isoformas CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2.

A partir de microsomas obtenidos de hígado de ratas tratadas con fenobarbital y β -naftoflavona se realizaron ensayos de actividad enzimática probando diferentes concentraciones de extracto hexánico, acuoso, una mezcla de ácidos anacárdicos y dos compuestos puros.

De acuerdo con los resultados obtenidos el extracto hexánico resultó tener mayor inhibición a concentraciones más bajas que la mezcla de ácidos anacárdicos y que los dos compuestos puros, presentes en dicho extracto y la isoforma que resultó más sensible a la acción inhibitoria fue CYP2B1. Por otro lado el extracto acuoso mostró más inhibición en la isoforma CYP1A1 pero a mayor concentración.

Los resultados de este estudio *in vitro* nos demuestran que el consumo de la corteza de cuachalalate como medicina tradicional, no está libre de riesgo ya que la inhibición de los citocromos p450 puede tener repercusiones al organismo si es mezclado con compuestos metabolizados por estas enzimas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Citocromos P450

Los citocromos P450 (CYP's) forman parte de una superfamilia de enzimas hemo que están presentes desde bacterias hasta mamíferos como el humano. Por lo tanto es razonable suponer que los CYP's se encuentran en todas las especies que viven en la Tierra ya que han sido encontrados en arqueobacterias, también en plantas y en varias especies de animales. A pesar de estar presentes en distintas especies de organismos, estos se encuentran en diferente número ya que cada organismo refleja la necesidad de una función respectiva. Se estima que en bacterias existen 20 citocromos P450, en humanos el número de CYP's es aproximadamente 60, mientras que en plantas el número total de estas enzimas tan solo en *Arabidopsis thaliana* ha sido estimado en más de 300 (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001).

La mayor parte de los estudios acerca de los CYP's se ha enfocado en humano. Los citocromos P450 en humanos se encuentran distribuidos por todo el organismo, pero el órgano con mayor expresión de estas enzimas es el hígado, dicha expresión está regulada por factores genéticos, presentando polimorfismos fisiopatológicos o ambientales (Clarke 1998). Dentro de la célula los citocromos P450 se encuentran anclados en la membrana del retículo endoplasmático a través de una hélice transmembranal hidrofóbica en N-terminal, otros se encuentran hacia membrana mitocondrial interna con su dominio globular orientado hacia matriz (Seliskar & Rozman 2007).

Los CYP's están involucrados en la biosíntesis de compuestos de gran interés, principalmente de bajo peso molecular, los cuales actúan como reguladores en diferentes procesos del organismo como los esteroides, prostaglandinas, derivados de ácidos grasos y derivados de ácido retinoico (Ortiz de Montellano, 1995b); sin embargo, también participan en el metabolismo de compuestos exógenos xenobióticos como fármacos, contaminantes ambientales, aditivos

alimenticios, entre otros; teniendo como función la desintoxicación o bien la bioactivación de compuestos a través de reacciones de óxido-reducción (Costas 1996).

Las reacciones que llevan a cabo los citocromos P450 se basan en un ciclo catalítico. En primer lugar el sustrato se une al átomo de hierro presente en la enzima, teniendo como resultado cambios en el estado de *spin* y en el máximo de absorbancia. Posteriormente se lleva a cabo la reducción del complejo hemoenzima- sustrato al estado ferroso pasando de Fe^{3+} a Fe^{2+} a causa del aporte de un electrón y al aumento en el potencial redox. En tercer lugar se lleva a cabo la unión del oxígeno, cambiando la configuración del complejo el cual es reducido por un segundo electrón teniendo así un complejo hierro-peroxo el cual es protonado y convertido al complejo 0, Fe- hidropoxo, seguido de una segunda protonación que sirve como guía a la dioxigenación, dando lugar a una molécula de agua y teniendo la formación de complejo I, el cual oxigena al sustrato a través de la entrada de una molécula de agua y finalmente completando el ciclo (Fig.1)

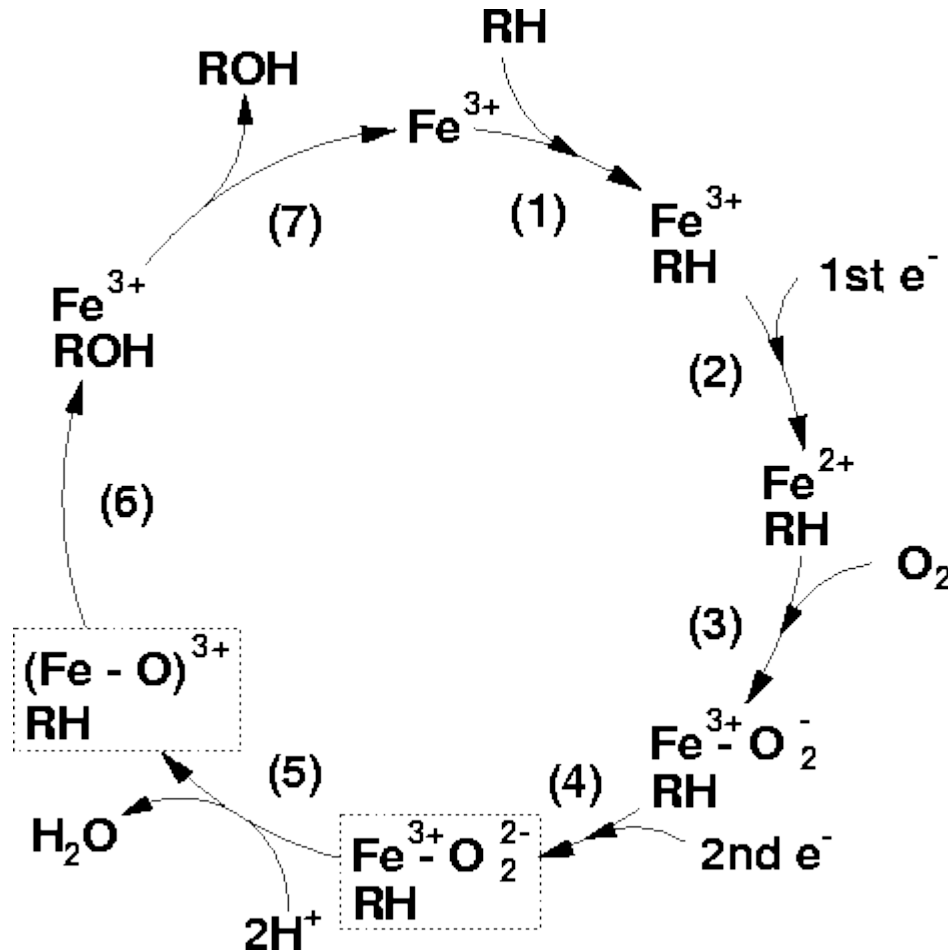


Fig. 1 Ciclo catalítico de citocromo P450. Tomado de <http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/>

De acuerdo a los sistemas actuales de nomenclatura los citocromos P450 se clasifican a partir de la identidad de la secuencia de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas. En una misma familia se agrupan los citocromos que tienen una similitud mayor del 40% en la secuencia de aminoácidos. Dentro de una familia se agrupan distintas subfamilias, el requerimiento para que dos citocromos P450 pertenezcan a la misma subfamilia es que tengan una similitud superior al 55% en la secuencia de aminoácidos. En una misma subfamilia, se distinguen a partir de números arábigos, teniendo en cuenta que dos de estas enzimas son distintas si sus secuencias de aminoácidos difieren en más del 3%.

Las familias CYP1, CYP2 y CYP3 son las de mayor importancia para el metabolismo de una gran variedad de xenobióticos incluyendo medicamentos (Pelkonen et al., 2008).

2.1.1 Subfamilia 1A

Los miembros de la subfamilia 1A tienen un control transcripcional a través de la vía del receptor nuclear AhR (Aryl hydrocarbon receptor). Las isoformas más estudiadas son CYP1A1 y CYP1A2 las cuales se encuentran presentes en mamíferos incluyendo el humano. Además existe un porcentaje de similitud de estos miembros del 80% entre humano y rata. Estas isoformas son de gran interés ya que participan en el metabolismo de xenobióticos y en procesos de activación de procarcinógenos, los cuales pueden dar lugar a metabolitos intermediarios que pueden unirse al DNA provocando mutaciones.

2.1.1.1 CYP1A1

CYP1A1 es la principal enzima extrahepática y su nivel de expresión en el hígado es muy bajo en humanos. Esta isoforma participa en el metabolismo de numerosos insecticidas y herbicidas (Lang et al, 1997; Tang et al., 2002; Abass et al, 2010; Abass et al, 2007). Además de participar en el metabolismo de fármacos tales como 5-fluorouracilo, dexametasona, elipticina, lansoprazol, omeprazol, salicilamida, entre otros (Anwar-Mohamed et al 2009). Esta isoforma activa diversos compuestos como el benzo(a)pireno y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales también actúan como inductores (Bauer et al 1995)

2.1.1.2 CYP1A2

CYP1A2 se expresa principalmente en hígado y en niveles inferiores en pulmón, esta isoforma representa aproximadamente el 10% de las enzimas

CYP totales en el hígado humano, sin embargo los niveles de su expresión tienen cierta variabilidad entre individuos debido al polimorfismo genético que presenta. Juega un papel importante en el metabolismo de gran cantidad de fármacos, incluidos analgésicos y antipiréticos (paracetamol, fenacetina, lidocaína) antipsicóticos (olanzapina, clozapina), antidepresivos (duloxetina), medicamentos antiinflamatorios (nabumetona), fármacos cardiovasculares (propranolol, guanabenz, triamtereno), entre muchos otros fármacos (Zanger & Schwab 2013)

Asimismo participa en la activación de nitrosaminas, aflatoxina B1 y aminas aromáticas (Pelkonen et al, 1998).

2.1.2 Subfamilia 2B

En humanos CYP2B6 es el único miembro identificado de esta subfamilia y representa aproximadamente del 1 al 10% del contenido total de CYP's hepáticos, aunque también se expresa en otros tejidos como el riñón, pulmón, intestino, endometrio uterino, macrófagos, linfocitos y cerebro. Su expresión tiene variabilidad entre individuos y se ve afectada por el genotipo y género. Por ejemplo se ha reportado la expresión del mRNA de CYP2B6 solo en adultos (Ekins & Wrighton, 1999).

Su inducción está regulada por el receptor nuclear CAR (constitutive active receptor) y por PXR (pregnane X receptor) (Sueyoshi et al., 1999).

Se ha informado que la isoforma CYP2B6 de humano y CYP2B1 de rata tienen un porcentaje de similitud del 70% (Gonzalez 1988). En rata otro miembro de esta subfamilia es el CYP2B2, que al igual que CYP2B1 es inducible con fenobarbital. Además presentan un porcentaje de similitud del 97%.

En la actualidad ha sido documentada la importancia de CYP2B6 en el metabolismo de varios pesticidas, fármacos y otros xenobióticos ambientales. Entre los pesticidas que son metabolizados por esta isoforma se encuentran clorpirifós, carbaril, alacloro, metolacloro, acetoclor, butaclor y el repelente de

insectos N, N-Dietil-meta-toluamida (DEET) (Coleman et al., 2000; Tang et al., 2001, 2002; Usmani et al., 2002).

Los fármacos que son metabolizados incluyen los de uso quimioterapéutico, como ciclofosfamida, antiestrógenos, S-mefenitoína, y diazepam (Jinno et al., 2003). Dentro de las drogas de abuso la nicotina, metilendioximetanfetamina (MDMA, "éxtasis") y metilendioxietilamfetamina (MDEA "Eva") se han reportado como sustratos de CYP2B6 (Lang et al., 2001). Por otra parte también se ha notificado que el metabolismo de efavirenz, medicamento utilizado para tratar VIH, es mediado por esta isoforma (Haas et al., 2004).

2.2 Inhibición de los citocromos P450

La inhibición de los citocromos P450 es un proceso por el cual se da una reducción de la actividad enzimática debido a la interacción fármaco- fármaco o por la administración de un agente inhibidor. Cuando este proceso ocurre aumentan las concentraciones plasmáticas del fármaco y la prolongación del efecto, lo que puede provocar toxicidad debido a la sobredosificación.

La administración de los fármacos casi nunca se da de manera aislada, por lo que la competencia de varios fármacos por la unión al sitio activo de la enzima puede disminuir el metabolismo de uno de ellos, dependiendo de las concentraciones en las que se encuentren y de la afinidad de los citocromos P450.

Existen dos tipos de inhibición de estas enzimas, irreversible y reversible. El tipo de inhibición irreversible requiere de la biotransformación del inhibidor, mientras que la inhibición reversible se da directamente, sin metabolismo, las interacciones fármaco-fármaco comúnmente causan este tipo de inhibición.

El tipo más común de inhibición es el reversible y se produce como resultado de la competencia en el sitio activo de la enzima y probablemente involucra sólo el primer paso del ciclo catalítico P450, se da a través de la unión a la enzima por lo general con enlaces débiles, que se forman y se rompen fácilmente. Suele dividirse en inhibición: competitiva, no competitiva y mixta

(Pelkonen et al., 2008). La inhibición competitiva se da por la interacción entre el sustrato y el inhibidor por unirse a la misma posición en el sitio activo de la enzima. En la inhibición no competitiva el inhibidor se une al complejo enzima-sustrato, pero no a la enzima libre. Frecuentemente el tipo de inhibición que más se observa en la práctica es la mixta, presenta elementos de inhibición competitiva y no competitiva (Madan et al. 2002).

2.3 Características generales de *Amphipterygium adstringens*

Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht, sinonimia *Juliana adstringens* Schlechter, *Hypopterygium adstringens* Schltld. Es un árbol perteneciente a la familia Anacardiaceae que puede llegar a medir 8 metros, su tronco generalmente es torcido con pocas ramas gruesas, ascendentes y torcidas de ramificación simpodial (Guizar & Sánchez, 1991). Posee yemas, obtusas, desnudas, amarillentas, muy pubescentes. Tiene dos estípulas lanceoladas. Las hojas se encuentran dispuestas en espiral, aglomeradas en las puntas de las ramas, imparipinnadas, compuestas por 3-5 folíolos opuestos y sésiles, con el folíolo terminal más grande; ovados o elípticos, con el margen crenado, ápice agudo, base aguda u obtusa; verde opacos y amarillentos en la haz, verde grisáceos en el envés, tomentosos en ambas superficies, más densamente en el envés; raquis tomentosos y pulvinado en la base (Navarrete 2009). Al ser una especie dioica posee flores masculinas y femeninas. Florece de mayo a junio en clima cálido seco (Solares F. et al 2002). Los frutos son nueces abultadas con estigmas persistentes, sobre los pedicelos aplanados y acrescentes hasta formar una especie de ala. Contienen una o dos semillas muy aplanadas (Argueta, 1994; Pennington & Sarukhán, 1998).

Es una planta endémica de México y Centroamérica. En México es cultivada en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Morelos, Puebla y Estado de México (Olivera et al. 1999) (Fig. 2)

La corteza de *Amphipterygium adstringens* es ampliamente utilizada alrededor del país, sin embargo se ha reportado que su aprovechamiento e importancia se encuentra concentrada en los estados de Guerrero y Morelos. En el estado de Morelos el cuachalalate ocupa el octavo lugar de cuatrocientas especies que se encuentran registradas con algún tipo de uso en la medicina tradicional; además se sabe que es utilizada para curar más de treinta enfermedades (Solares-Arenas et al., 2006).



Fig. 2 Principales estados de la República Mexicana en donde se cultiva *Amphipterygium adstringens*

Dependiendo la región del país este árbol se va nombrar de diferentes maneras, por ejemplo cuachalalate en Michoacán, Jalisco, Morelos y Guerrero, cuachalalá, nun o palo de manteca en Oaxaca, cuacha o maticerán en Michoacán, macerán o sumal en Guerrero, mapicerán en Jalisco y volador en Puebla (Solares et al., 2002). Sin embargo es comúnmente conocido como

cuachalalate a lo largo del país. Su nombre proviene del náhuatl, donde *cuáhuatl* significa árbol y *chachalatli* hace referencia al ave conocida como chachalaca, por lo tanto cuachalalate significa árbol de la chachalaca (Cabrera 1980).

El cuachalalate tiene gran importancia en la medicina tradicional ya que su corteza es utilizada por la población mexicana atribuyéndole distintas propiedades curativas como cicatrizante, antibiótico, para disolver cálculos renales, para cólicos, contra la malaria, antiinflamatorio, para lesiones cutáneas, mordeduras o piquetes de animales venenosos, enfermedades de las encías, caída del cabello, infecciones vaginales, manchas en la piel, diabetes, dolor de muelas. Pero principalmente se utiliza en cáncer del tracto digestivo, gastritis y úlceras (Olivera et al. 1999 y Argueta-Villamar 1994)

El modo de empleo de la corteza de cuachalalate depende de la zona geográfica y del padecimiento para el cual se va utilizar. En el caso específico de padecimientos gastrointestinales tales como la gastritis y úlceras gástricas una forma en que se emplea esta planta es remojando la corteza en agua hasta tomar color y tomándolo como agua de uso. Otras manera de administrar es en decocción o infusión solo con la corteza de *Amphipterygium adstringens* o en algunos casos acompañando con la corteza de otras plantas como árnica, cancerina y encino. También se hacen extracciones con alcohol del 96°, administrando unas gotas de la tintura en agua (Argueta-Villamar 1994, Magdaleno 1987 y Castillo-Juárez 2011)

2.4 Antecedentes

2.4.1 Compuestos aislados de *Amphipterygium adstringens*

Estudios fitoquímicos de la corteza de cuachalalate han informado la presencia de varios triterpenos, esteroides como acotilona de sarsapogenina, una saponina de tipo esteroideal y fenoles de cadena larga en donde se encuentran ácidos y aldehídos anacárdicos (Navarrete et al, 1998) (Fig. 3)

Dentro de los triterpenos aislados se ha identificado el ácido 3- α -hidroximasticadienónico, ácido masticadienónico, ácido 3-epi-oleanólico y β -sitosterol. Estudios previamente reportados han informado que los terpenos como el ácido 3- α -hidroximasticadienónico, ácido 3-epi-oleanólico y β -sitosterol son los principios activos del extracto metanólico de la corteza de cuachalalate los cuales poseen un efecto gastroprotector (Arrieta et al. 2003). Por otro lado el ácido 3- α -hidroximasticadienónico ha sido identificado como el principal compuesto con actividad antiinflamatoria en edemas de rata inducido por TPA (Oviedo-Chávez et al., 2004). También se ha observado que el ácido 3- α -hidroximasticadienónico actúa amplificando la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT) inducida por Ca^{2+} , además se reportó que a diferentes concentraciones puede ocasionar muerte celular (Dalla Via et al., 2012). Otro trabajo dio a conocer que el ácido 3- α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico mostraron un efecto citotóxico frente a células de leucemia (Makino et al, 2004).

Estudios relacionados con efectos protectores en problemas gástricos han demostrado que los terpenos aislados tales como el ácido 3-epi-oleanólico >ácido 3- α -hidroximasticadienónico> β -sitosterol y el ácido masticadienónico mostraron un efecto gastroprotector, de mayor a menor actividad en el orden antes mencionado (Arrieta et al. 2003)

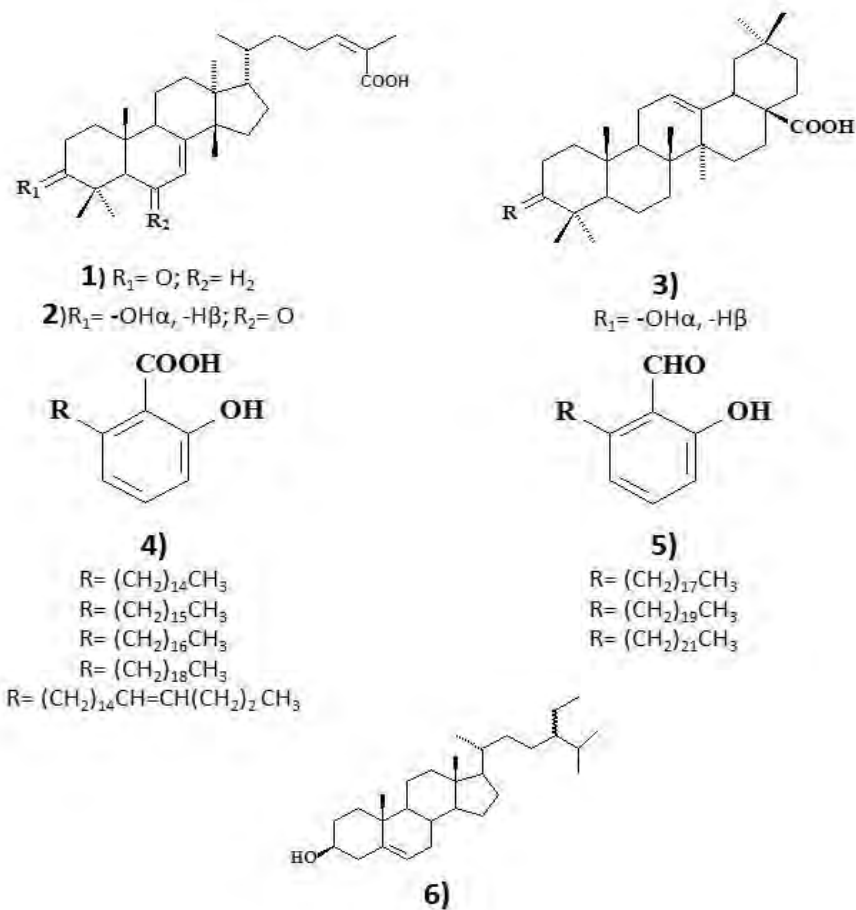


Fig. 3 Principales compuestos aislados de la corteza de *Amphipterygium adstringens*. 1) Ácido masticadienónico, 2) ácido 3- α hidroximasticadienónico, 3) ácido 3- epi-oleanólico, 4) ácidos anacárdicos, 5) aldehídos anacárdicos y 6) β -sitosterol. Tomado de Navarrete 2009.

Los fenoles de cadena larga presentes en el extracto hexánico identificados a partir de cromatografía de columna de sílica gel, se agrupan en dos mezclas, en una de ella se encuentran ácidos fenólicos y en una segunda mezcla se encuentran aldehídos fenólicos. Con un porcentaje de 0.0960% en el caso de los ácidos fenólicos y 0.0023% de aldehídos fenólicos del peso seco de la corteza. (Mata et al 1991).

Dentro de los fenoles de cadena larga, la mezcla de ácidos anacárdicos presenta el mayor número de estudios. El análisis de espectrometría de masas de cromatografía de gases (GC/MS) de la mezcla de ácidos anacárdicos presentes

en la corteza de *Amphipterygium adstringens* reveló que la mezcla se compone de cuatro ácidos fenólicos de cadena larga que poseen C15-46.8%, C16- 7.2%, C17- 29.9 %, y C19 7.5 %.

Entre los estudios con estos compuestos existen informes acerca de la actividad antimicrobiana que presenta la mezcla de ácidos anacárdicos sobre *Helicobacter pylori* con una respuesta dosis- dependiente, mostrando una concentración mínima inhibitoria de 10 µg/ml (Castillo-Juárez et al, 2007); sobre *Chromobacterium violaceum* y *Pseudomonas aeruginosa* esta mezcla mostró la inhibición de la percepción de quórum (QS) (Castillo-Juárez et al, 2013)

El principal compuesto de la mezcla de los ácidos anacárdicos aislado y que hasta la fecha tiene el mayor número de estudios es el ácido 6-pentadecil salicílico, el cual presenta un porcentaje de concentración del 50% en la mezcla de ácidos anacárdicos de la corteza de *Amphipterygium adstringens* (Mata et al 1991). Es importante destacar que este compuesto no es exclusivo del cuachalalate y que se encuentra presente en plantas pertenecientes a la familia Anacardiaceae y del género Ginkgo.

Los estudios anteriormente reportados han demostrado que el efecto antiinflamatorio del ácido 6-pentadecil salicílico se debe a su propiedad inhibitoria de la histona acetiltransferasa (Sung et al., 2008). Además se ha informado que este compuesto es un potente inhibidor de la angiogénesis tumoral por la vía de señalización de Src/FAK/Rho GTPasa (Wu et al., 2011).

2.4.2 Actividad de *Amphipterygium adstringens* sobre los citocromos P450

A pesar del considerable uso de la corteza de cuachalalate en México, no existen estudios que muestren los efectos de la interacción con los citocromos P450.

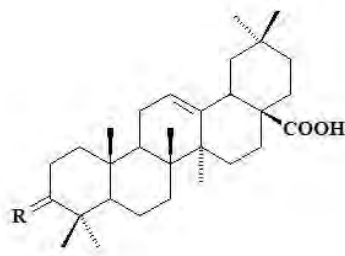
Debido a la falta de datos relacionados con *Amphipterygium adstringens* y las subfamilias de citocromos P450 involucradas en el metabolismo de xenobióticos; a continuación se muestran datos de los efectos de la interacción de los citocromos P450 con algunas plantas de la familia Anacardiaceae misma a la que pertenece el árbol de cuachalalate, además de informes de unos compuestos semejantes a los que constituyen la corteza de *Amphipterygium adstringens*.

Cuadro 1.

Interacción de citocromos P450 con plantas de la familia Anacardiaceae.

Especie	Interacción con citocromos P450
Extracto acuoso de <i>Mangifera indica</i> L.	Inhibición de CYP 1A1, 1A2, 3A4, 2D6, 2C9 y 2A6 en hepatocitos de humano (Rodeiro et al. 2013)
Extracto estandarizado de <i>Rhus verniciflua</i> Stokes	Inhibición de CYP2C9 con una Cl_{50} <0.001 $\mu\text{g/mL}$, CYP2C19 mostrando una Cl_{50} de 0.68 $\mu\text{g/mL}$, y CYP1A2 con una Cl_{50} de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Jung & Lee 2014)
Aceite de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	Inhibe la actividad y la expresión de CYP2E1, 3A4, 1A1, y 1A2 en diferentes tejidos de ratón (Attoub et al, 2014)
Extracto de leche de nuez de <i>Semecarpus anacardium</i> Linn.	Disminución en los niveles de contenido de citocromos P450 en microsomas de hígado de rata (Premalatha et al., 2000)

Entre los estudios reportados con compuestos similares a los que constituyen la corteza *Amphipterygium adstringens* se encuentra la inhibición de citocromos P450 por el ácido oleanólico un triterpeno con composición química afín a la del ácido 3-epi-oleanólico, un compuesto presente en la corteza de cuachalalate (Fig. 4), el estudio demuestra la capacidad del ácido oleanólico de inhibir de manera competitiva dos isoformas de microsomas hepáticos humanos tales como CYP3A4 (IC_{50} de 78.9 μM) y CYP1A2 (IC_{50} de 143.5 μM) (Kim et al. 2004).



1) $R_1 = O$

2) $R_1 = -OH\alpha, -H\beta$

Fig. 4 Fórmula estructural de 1) ácido olenólico y 2) ácido 3-epi-oleanólico. Tomada de Navarrete 2009.

En otro trabajo se ha informado la inhibición de CYP3A4 (Cl_{50} 37.06 μ M) de cultivos de células de placas de Peyer *ex vivo* por el ácido anacárdico aislado de las nueces de la india del árbol de *Anacardium occidentale* L. (Sou et al. 2012)

3. JUSTIFICACIÓN

En México el uso de plantas medicinales se ha llevado a cabo desde tiempos prehispánicos, en la actualidad se estima que de todas las plantas con flor documentadas en el país, alrededor del 15% tienen un uso medicinal y tan solo el 5% tienen un tipo de validación científica (Ocegueda et al 2005).

En el caso particular de la corteza del árbol *Amphipterygium adstringens* mejor conocido como cuachalalate se le han atribuido distintas propiedades curativas y es empleada como cicatrizante, para disolver cálculos biliares y renales, como antiinflamatorio; sin embargo se utiliza principalmente en enfermedades como gastritis, úlceras y cáncer del tracto digestivo (Olivera et al.,1999). A pesar de que se han hecho diversos estudios de esta planta y se han logrado aislar compuestos químicos, no se sabe cuál es el efecto que puede causar la interacción de los compuestos presentes en la corteza con las enzimas de fase I como los citocromos P450.

Esto es de gran importancia debido a que estas enzimas participan en el metabolismo de fármacos. Se ha reportado que las familias CYP1, 2 y 3 son responsables de la biotransformación del 70-80% de todos los medicamentos de uso clínico (Zanger & Schwab 2013).

Si bien no hay información bibliográfica acerca del uso de decocciones o infusiones de la corteza de cuachalalate en enfermedades gastrointestinales acompañando con algún medicamento específico para tratar los padecimientos, se sabe que en nuestro país gran parte de la población, particularmente personas de edad avanzada, adquieren la tendencia a tomar diversos tipos de medicamentos y mezclarlos con infusiones de plantas de uso tradicional como lo es el cuachalalate (Navarrete et al 2005).

Por lo tanto,este trabajo tiene como finalidad conocer si los componentes del extracto hexánico y acuoso, así como compuestos puros aislados de la corteza

de *Amphipterygium adstringens* tienen algún efecto inhibitor en los citocromos de las subfamilias 1A y 2B las cuales tienen una importante participación en el metabolismo de varios xenobióticos.

4. HIPÓTESIS

Los extractos de la corteza del árbol de *Amphipterygium adstringens* tendrán un efecto inhibitorio sobre las subfamilias 1A y 2B de los citocromos P450.

5. **O**BJETIVOS

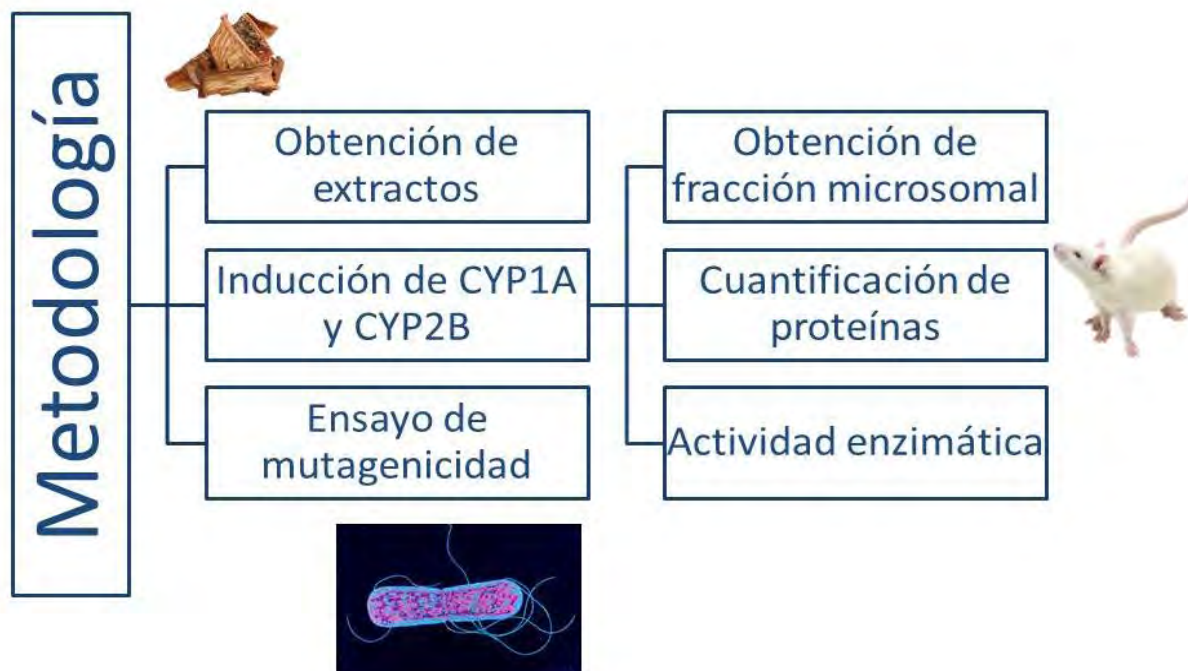
5.1 General

Mediante un estudio *in vitro* evaluar el efecto inhibitorio del extracto acuoso y hexánico de la corteza de *Amphipterygium adstringens* en la actividad enzimática de CYP1A y CYP2B.

5.2 Particulares

- Medir la actividad microsomal hepática de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 con el extracto acuoso y hexánico.
- Medir la actividad microsomal hepática de CYP2B1 con la mezcla de ácidos anacárdicos, ácido 6-pentadecil-salicílico (ácido anacárdico) y ácido 6-[16'Z-nonadecenil]-salicílico.
- Probar el efecto antimutagénico del extracto hexánico y de la mezcla de ácidos anacárdicos en la cepa TA1535 y TA98.

6. MATERIALES Y MÉTODO



6.1 Material vegetal

Fueron proporcionados por el Dr. Fausto Rivero Cruz del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química UNAM 2 kilos de corteza del árbol *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Schiede ex Standl. Los cuales fueron colectados e identificados por la bióloga Irma Acosta Calixto en la Estación de Biología Chamela (EBCh), en Marzo del 2010.

6.2 Compuestos aislados

El ácido 6-[16'Z-nonadecenil]-salicílico y la mezcla de ácidos anacárdicos fueron proporcionados por el Dr. Fausto Rivero Cruz del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química UNAM.

El ácido anacárdico (ácido 6-pentadecil salicílico) con 98% de pureza fue adquirido de Sigma-Aldrich, St Louis, MO.

6.3 Obtención de extractos

Extracto hexánico

Se colocaron 630 gramos de corteza de *Amphipterygium adstringens* previamente cortada en trozos pequeños en un frasco Erlenmeyer de 3L con 1 L de hexano puro, se dejó macerar durante tres días. Se recuperó el líquido, se filtró y el disolvente fue eliminado en un evaporador rotatorio a una temperatura de 60 °C a 75 rpm. El disolvente fue recuperado y reutilizado para hacer extracciones consecutivas cuatro veces más, por último se colocó en un vial de cristal utilizando como disolvente diclorometano.

Extracto acuoso

Se colocaron en un matraz 630 gramos de corteza de *Amphipterygium adstringens* cortada en trozos pequeños y 3.7 L agua destilada hirviendo durante 1 hora. El líquido recuperado se filtró y se concentró en un rotavapor conectado a una bomba de vacío.

Mezcla de ácidos anacárdicos

Un kilogramo de corteza de *Amphipterygium adstringens* molida fue sometida a un proceso de extracción por maceración a temperatura ambiente utilizando 2.5 L de éter de petróleo por un periodo de 8 días. Se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida y finalmente se obtuvieron 27 g de un residuo oleoso verde oscuro.

El extracto fue sometido a un proceso de cromatografía de columna al vacío con 0.5 kg de gel sílice el cual se eluyó utilizando como fase móvil hexano y una mezcla hexano-acetato de etilo (80:20) y acetato de etilo. Una porción de 3.3 g de la fracción generada fue sometida a un fraccionamiento de columna abierta

utilizando como fase estacionaria 300g de gel sílice (Kieselgel 60 Merck con un tamaño de partícula de 0.063-0.0200 mm, 70-230 mesh ASTM) y como fase móvil se utilizó un gradiente de hexano: acetato de etilo (1:0--> 0:1). Mediante este proceso se obtuvieron 18 fracciones que posteriormente fueron reunidas por su similitud cromatográfica, obteniéndose 9 fracciones combinadas.

Una vez reunidas todas las fracciones, se realizó una cromatografía de capa fina, con base en los resultados se reunieron dos fracciones y una fracción combinada.

La fracción combinada se sometió a una cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo (1:1) y (4:6). Este proceso permitió la obtención de ocho fracciones las cuales se agruparon de acuerdo a su similitud cromatográfica en cuatro (F: a-d).

La fracción F-a se sometió nuevamente a una cromatografía de columna abierta utilizando gel de sílice y como eluyente mezclas de hexano- acetato de etilo (6:4). A partir de este fraccionamiento cuaternario se obtuvieron 3 fracciones de las cuales fue aislada una mezcla de ácidos anacárdicos. La identificación se realizó utilizando muestras auténticas aisladas previamente por el Dr. Andrés Navarrete (Carrasco & Rivera, 2009).

6.4 Inducción de CYP1A y CYP2B

Se utilizaron cinco ratas macho Wistar de 200 gramos de peso, procedentes del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. A cuatro ratas se les administró vía intraperitoneal fenobarbital (60 mg/kg) durante tres días y en el cuarto (30 mg/kg). En el cuarto día de tratamiento se administró β - naftoflavona (80 mg/kg) para inducir la expresión de las subfamilias de CYP1A y 2B. Una rata fue utilizada como control negativo a la cual se le administró durante cuatro días 200 μ L aceite de maíz. Al quinto día todas las ratas fueron sacrificadas por decapitación.

6.5 Obtención de la fracción microsomal

Posterior al sacrificio se extrajeron los hígados de cada animal, se cortaron en trozos pequeños y se homogenizaron en una solución de KCl 0.15 M a una porción de 3 mL/g del peso de cada hígado. Después se centrifugaron a 9000 g por 10 minutos y el sobrenadante (S9) se procesó para la obtención de la fracción microsomal centrifugando a 100000 g por 60 minutos. El botón resultante se resuspendió en un amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M en un pH 7.4 y se centrifugó con las mismas condiciones antes mencionadas. El botón obtenido se resuspendió en un amortiguador de fosfato de potasio pH 7.4, EDTA 0.1 M DDT 0.1M y 20% de glicerol y se almacenó en alícuotas a una temperatura de -70 C °.

6.6 Cuantificación de proteínas de la fracción microsomal

Se siguió el protocolo establecido por Bradford en 1976, en este caso se realizó la lectura en microplaca. Se hizo una dilución 1:80 de proteína en agua y se colocaron 10 µL de los cinco puntos de la curva por triplicado en cada pocillo, posteriormente se añadieron 200 µL del reactivo de Bradford en una dilución de 1:4 y finalmente se midió a una longitud de onda de 595 nm en el lector Synergy H4™.

6.7 Determinación de la actividad enzimática

A través de la capacidad de O-dealquilación que tienen los citocromos P450 de convertir determinados sustratos en resorufina cuantificable mediante fluorescencia, se evaluó la actividad enzimática de CYP1A1 utilizando como sustrato etoxiresorufina (EROD), CYP1A2 con el sustrato metoxiresorufina (MROD), CYP2B1 con el sustrato pentoxiresorufina (PROD) y CYP2B2 con benciloxiresorufina (BROD).

A partir de una curva patrón de resorufina se determinó la cantidad formada de ésta para cada reacción enzimática.

La reacción se llevó a cabo en una microplaca la cual se incubó durante 3 minutos a una temperatura de 37 C° 145 µL en caso de CYP 1A1, CYP 2B1 y CYP 2B2 y 138 µL para CYP 1A2 de buffer pH 7.6 Tris 50 mM y MgCl₂ 25 mM, 80 µg de proteína/mL de la fracción microsomal, 5 µL del sustrato correspondiente para cada isoforma disuelto en DMSO, 5 µL de extracto hexánico (concentraciones 0.008, 0.01, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25 y 0.5 mg/mL) disuelto en DMSO; del extracto acuoso (concentraciones de 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL) disuelto en agua; de la mezcla de ácidos anacárdicos (concentraciones de 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL) disuelto en DMSO; de ácido 6-pentadecil salicílico (concentraciones de 250, 500, 1000 y 1425 µM) disuelto en DMSO y de ácido 6-[16'z-nonadecenil]-salicílico (concentraciones de 100, 1000, 1100 y 1225 µM) disuelto en DMSO. Después de la incubación se adicionaron 40 µL de NADPH 2.5 mM, teniendo como volumen final 200 µL.

Las lecturas de fluorescencia se tomaron a intervalos de 20 s durante 15 minutos a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm en un lector de microplaca Synergy H4™.

Para conocer si los extractos y compuestos probados tenían interferencia con la fluorescencia de la resorufina se realizaron curvas de resorufina incorporando las diferentes concentraciones probadas en la actividad enzimática del extracto acuoso y hexánico y con la concentración más alta para el caso de la mezcla de ácido anacárdico y los compuestos puros.

6.8 Ensayo de mutagenicidad

Se utilizaron las cepas TA98 y TA1535 de *Salmonella thypimurium* donadas por el Dr. B.N. Ames de la Universidad de California de Berkeley. C.A. USA. El promutágeno que se utilizó fue ciclofosfamida la cual es metabolizada principalmente por CYP1A y 3-metilcolantreno metabolizado por CYP2B.

Como sistema enzimático se utilizó la fracción S9 de hígados de rata tratados con β -naftoflavona y fenobarbital (β -NF/ FB) con las isoformas de interés inducidas (CYP1A y CYP2B).

Se siguió el protocolo establecido por Maron y Ames 1993, en tubos estériles que contenían 2 mL de agar de superficie precalentados a 45°C se les agregó 0.1 mL del cultivo de 16 horas de las cepas de *Salmonella thypimurium* TA98 o TA1535 dependiendo del experimento, la concentración utilizada del mutágeno fue de 5 μ g de 3-metilcolantreno para la cepa TA98 y 500 μ g de ciclofosfamida para la cepa TA1535, 0.5 mL de la mezcla S9 que contenía fracción S9 β -NF/ FB, MgCl₂ 0.4 M KCl 1.65 M, NADP 4 mM, glucosa 6-fosfato 5 mM y amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.4 y finalmente se añadió 10 μ L de extracto hexánico (concentraciones 0.03, 0.06, 0.1, 0.125 y 0.25 mg) disuelto en DMSO y 10 μ L de mezcla ácidos anacárdicos (concentraciones 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg) disuelto en DMSO. La mezcla que se encontraba en cada tubo se agregó a cajas Petri con medio mínimo Vogel-Bonner, se dejó solidificar y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Finalmente se contó el número de colonias revertantes y se observó el crecimiento de fondo para saber si existía toxicidad.

6.9 Análisis estadístico

Los ensayos de actividad enzimática fueron experimentos que se realizaron por triplicado de manera independiente. Para calcular la inhibición de cinética enzimática de cada isoforma, solo se tomaron en cuenta los datos que correspondían a la pendiente, es decir no se tomaron en cuenta los datos de

saturación de la enzima. Para estandarizar los datos, las pendientes correspondientes a cada concentración se dividieron entre la pendiente de la concentración cero.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistical Analysis Software, (SAS) versión 9.0. A los datos obtenidos de la inhibición de la cinética enzimática se les realizó un análisis de varianzas con respecto a los datos control (concentración cero) con pruebas pos Hoc Dunnett con una $P \leq 0.05$. Para comparar la inhibición entre los CYP's se aplicó una prueba Tukey. La concentración para inhibir al 50% (CI_{50}) se calculó ajustando una curva que se adecuaba a la curva de inhibición y se le aplicó una prueba Tukey. Los datos de antimutagénesis se calcularon con regresión lineal, observando que la pendiente fuera diferente a cero $P < 0.0001$.

7. RESULTADOS

7.1 Apariencia y rendimiento de extractos

Se obtuvieron dos extractos con aspecto y rendimiento diferente. En el caso del extracto hexánico, presentó una consistencia aceitosa y un rendimiento total de 18 gramos, mientras que del extracto acuoso se obtuvo un polvo con un rendimiento de 20 gramos.

7.2 Efecto del extracto hexánico sobre la actividad enzimática de CYP1A y CYP2B

En la figura 5 se muestra el efecto inhibitorio del extracto hexánico a concentraciones de 0.01, 0.03, 0.06, 0.125, 0.5 mg/mL sobre las isoformas CYP2B1 y CYP2B2 y 0.008, 0.01, 0.03, 0.06, 0.125 mg/mL y 0.25 mg/mL sobre CYP1A1 y CYP1A2.

Se puede observar que el efecto inhibitorio no es el mismo para las diferentes isoformas evaluadas, el orden de inhibición de mayor a menor es CYP2B1 > CYP2B2 > CYP1A1 y en el caso de CYP1A2 el extracto hexánico no tuvo un efecto inhibitorio.

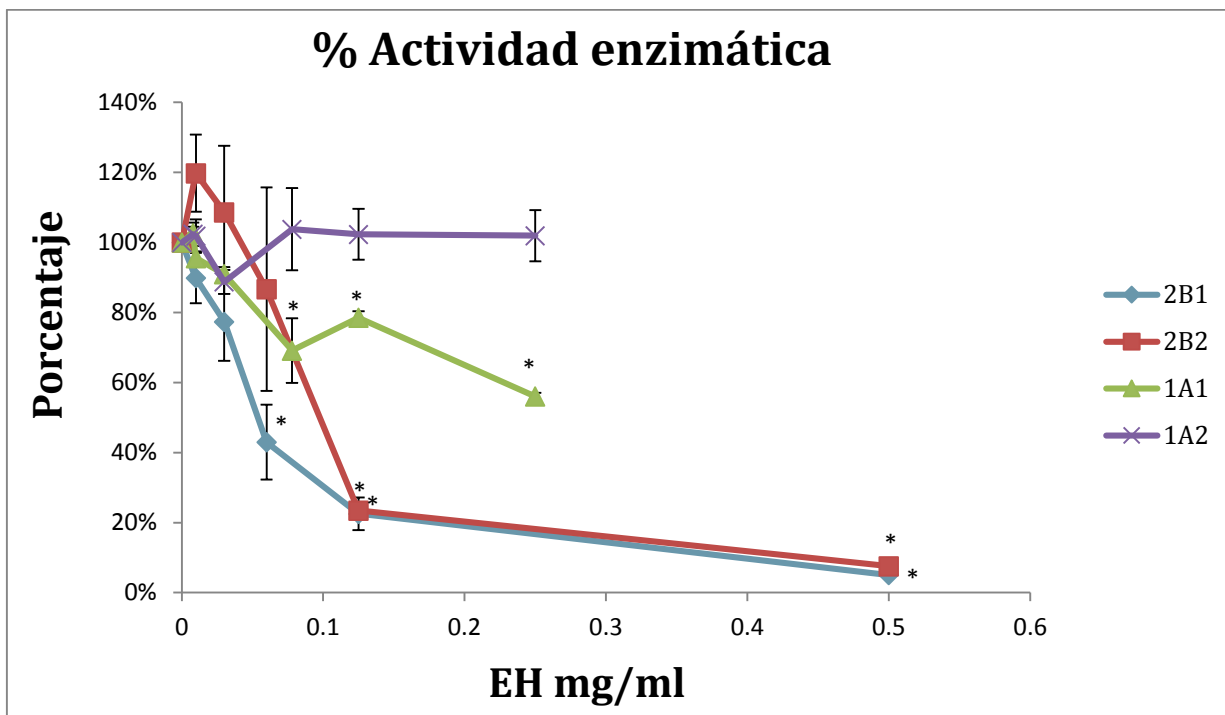


Fig. 5 Efecto del extracto hexánico (EH) de *Amphipterygium adstringens* sobre la actividad enzimática microsomal de las isoformas CYP1A1, 1A2, 2B1 y 2B2. Cada línea expresa el promedio de 3 experimentos independientes realizados para cada concentración de EH \pm D.E. * $P < 0.05$ vs control.

7.2 Efecto de la mezcla de ácidos anacárdicos y compuestos puros de *Amphipterygium adstringens* sobre la actividad de CYP2B1

En la figura 6 se muestra la comparación del efecto de inhibición de la mezcla de ácidos anacárdicos y el extracto hexánico sobre la actividad enzimática de CYP2B1. Revelando que a pesar de que la mezcla de ácidos anacárdicos se encuentre presente en el extracto hexánico, el extracto mostró un efecto más potente en la inhibición de la isoforma CYP2B1.

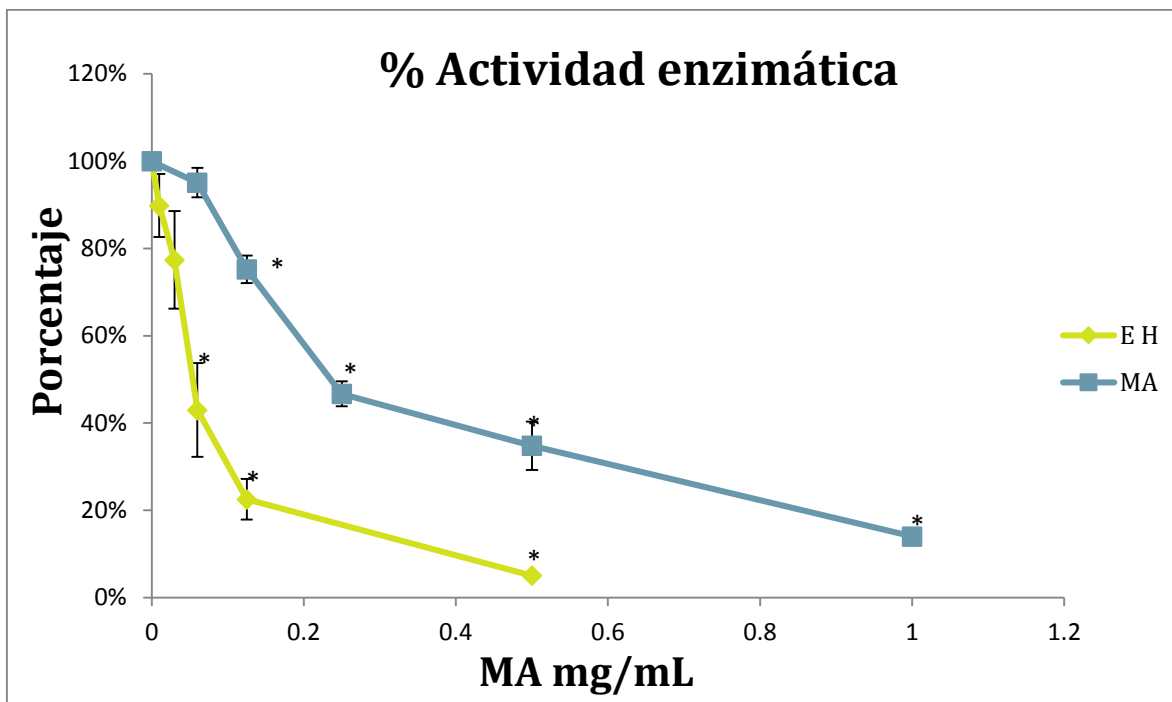


Fig. 6 Efecto de la mezcla de ácidos anacárdicos (MA) presentes en el extracto hexánico de *Amphipterygium adstringens* sobre la actividad enzimática microsomal de CYP2B1., comparado con la inhibición de EH sobre CYP2B1. Cada línea expresa el promedio de 3 experimentos independientes realizados para cada concentración de MA y EH \pm D.E. * $P < 0.05$ vs control.

La figura 7 se muestra el efecto inhibitor del ácido 6-pentadecil salicílico y el ácido 6-[16'Z-nonadecenil]-salicílico dos compuestos puros presentes en el extracto hexánico sobre la actividad enzimática microsomal de CYP2B1. Se puede observar un comportamiento parecido en los dos ácidos anacárdicos, sin embargo en el caso del ácido 6-[16'Z-nonadecenil]-salicílico a una concentración de 1000 μ M empieza a existir un fenómeno de inhibición, mientras que el ácido 6-pentadecil salicílico comienza a inhibir la actividad enzimática de CYP2B1 desde los 500 μ M.

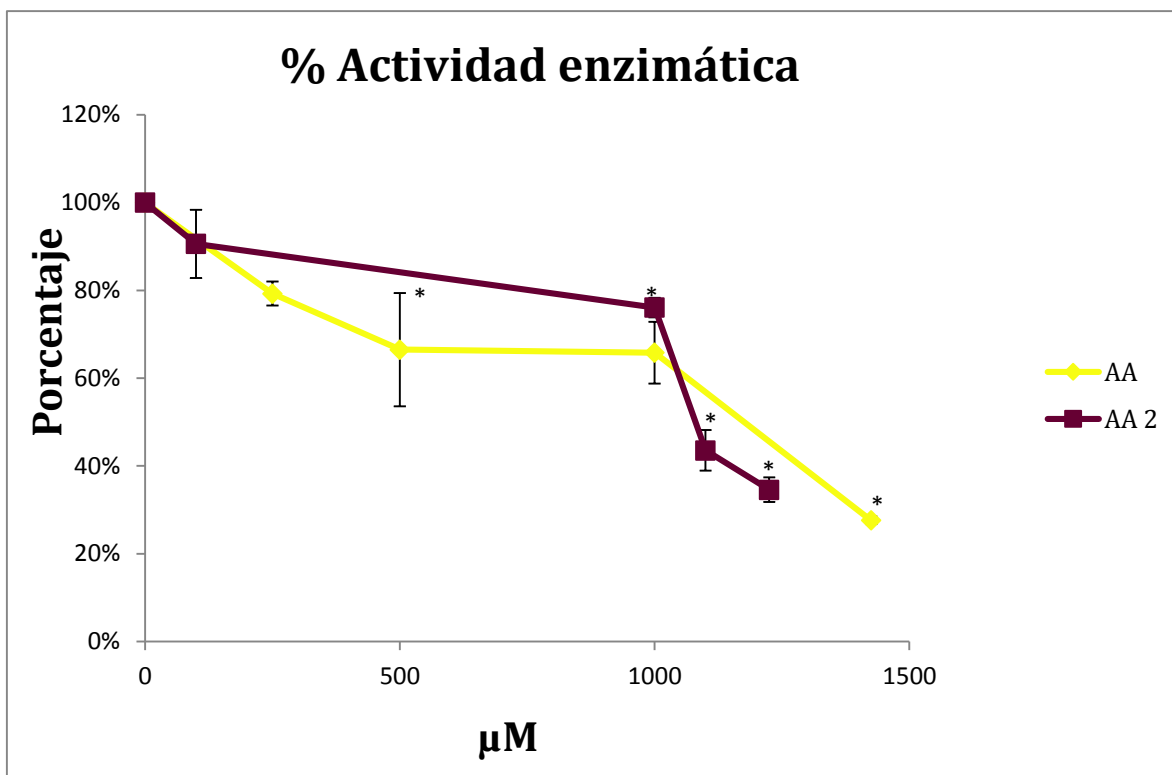


Fig. 7 Efecto del ácido 6-pentadecil salicílico (AA) a concentraciones de 250 μM , 500 μM , 1000 μM y 1425 μM y el ácido 6-[16'Z-nonadecenil]-salicílico (AA 2) a concentraciones de 100 μM , 1000 μM , 1100 μM y 1225 μM sobre la actividad enzimática microsomal de CYP2B1. Cada línea expresa el promedio de 3 experimentos independientes realizados para cada concentración de AA y AA1 \pm D.E. * P < 0.05 vs control.

7.3 Efecto del extracto acuoso sobre la actividad enzimática de CYP1A y CYP2B

En la figura 8 se muestra el efecto inhibitorio del extracto acuoso a concentraciones de 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL sobre las isoformas CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2.

Se puede observar un efecto inhibitorio similar en todas las isoformas, a excepción de CYP1A2 el cual tuvo menor inhibición.

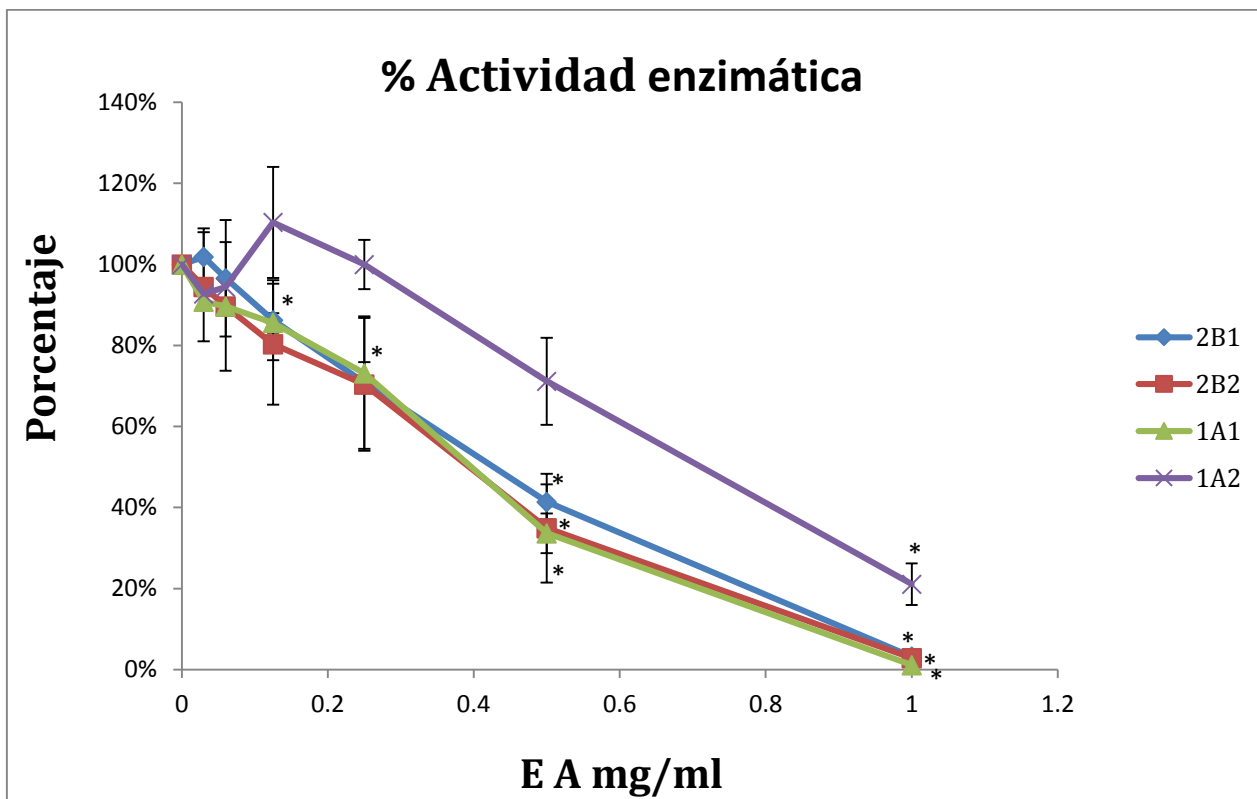


Fig. 8 Efecto del extracto acuoso (EA) de *Amphipterygium adstringens* sobre la actividad enzimática microsomal de las isoformas CYP1A1, 1A2, 2B1 y 2B2. Cada línea expresa el promedio de 3 experimentos independientes realizados para cada concentración de EA \pm D.E. * P < 0.05 vs control.

7.4 CI50 del extracto acuoso, extracto hexánico, mezcla de ácidos anacárdicos y compuestos puros de *Amphipterygium adstringens*

Cuadro 2.

CI₅₀ extracto acuoso, extracto hexánico, mezcla de ácidos anacárdicos y compuestos puros de *Amphipterygium adstringens* sobre CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2.

	CYP1A1	CYP1A2	CYP2B1	CYP2B2
Extracto hexánico	CI ₅₀ :0.268 mg/mL	NI	CI ₅₀ :0.057 mg/mL	CI ₅₀ : 0.100 mg/mL
Extracto acuoso	CI ₅₀ :0.400 mg/mL	CI ₅₀ :0.784 mg/mL	CI ₅₀ :0.433 mg/mL	CI ₅₀ :0.402 mg/mL
Mezcla de ácidos anacárdicos	-	-	CI ₅₀ :0.327 mg/mL	-:
Ácido 6-pentadecil salicílico	-	-	CI ₅₀ :967.03 μM	-
Ácido 6-[16'Z- nonadecenil]-salicílico	-	-	CI ₅₀ : 1137.44 μM	-

CI₅₀ Concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática. NI: No inhibición. - No se realizaron los experimentos.

7.5 Toxicidad de *Amphipterygium adstringens*

Con el fin de determinar si la mezcla de ácidos anacárdicos y el extracto hexánico del cuachalalate mostraban un efecto tóxico sobre las colonias de *Salmonella thypimurium* se llevó a cabo la observación del crecimiento de fondo el cual es un indicador en la prueba de Ames si existe toxicidad. En este estudio no se observó crecimiento de fondo en ninguna de las concentraciones de la mezcla y extracto probado.

7.5.1 Efecto antimutagénico de la mezcla de ácidos anacárdicos

En la figura 9 se observa el efecto antimutagénico del extracto hexánico a distintas concentraciones (0.03, 0.06, 0.1, 0.125 y 0.25 mg) sobre *Salmonella thypimurium* con adición de ciclofosfamida un mutágeno activado principalmente por los citocromos de la subfamilia CYP2B. Se muestran dos ensayos, uno de ellos con ciclofosfamida, las diferentes concentraciones del extracto hexánico y con la fracción microsomal S9 y el control sin S9. Se observa que el número de mutantes el ensayo en donde se adicionó la fracción microsomal S9 va disminuyendo conforme la concentración del extracto hexánico aumenta, mostrando así el efecto antimutagénico.

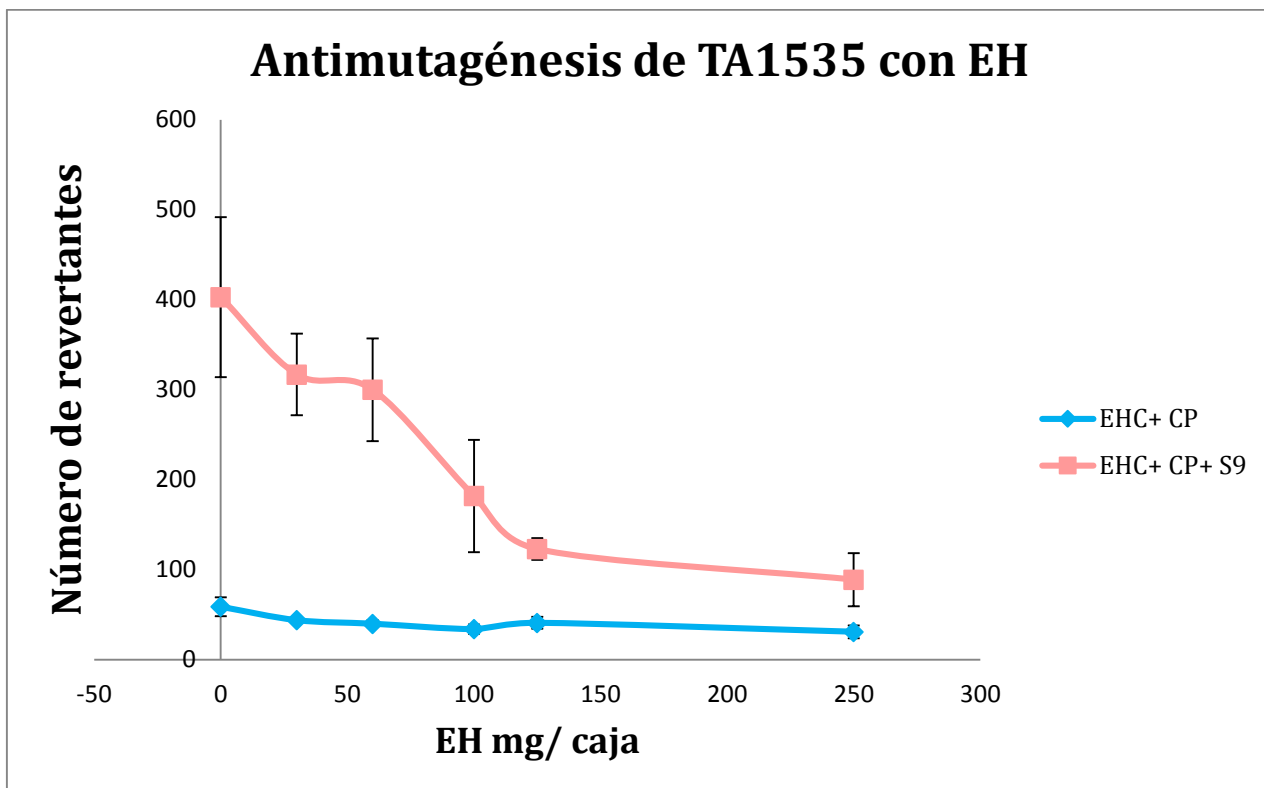


Fig. 9 Efecto del extracto hexánico de *Amphipterygium adstringens* a concentraciones de 0.03, 0.06, 0.1, 0.125 y 0.25 mg/caja sobre la mutagenicidad de ciclofosfamida. Pendiente diferente de cero de (EHC+ CP+ S9) $p < 0.0001$.

En la figura 10 muestra el efecto antimutagénico de la mezcla de ácidos anacárdicos en distintas concentraciones (0.06, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg) sobre *Salmonella thypimurium* con adición de ciclofosfamida un mutágeno activado principalmente por los citocromos de la subfamilia CYP 2B. En esta figura solo se muestra el ensayo con la adición de la fracción microsomal S9. Mostrando el efecto protector de la mezcla de ácidos anacárdicos ocasionado por el mutágeno ciclofosfamida.

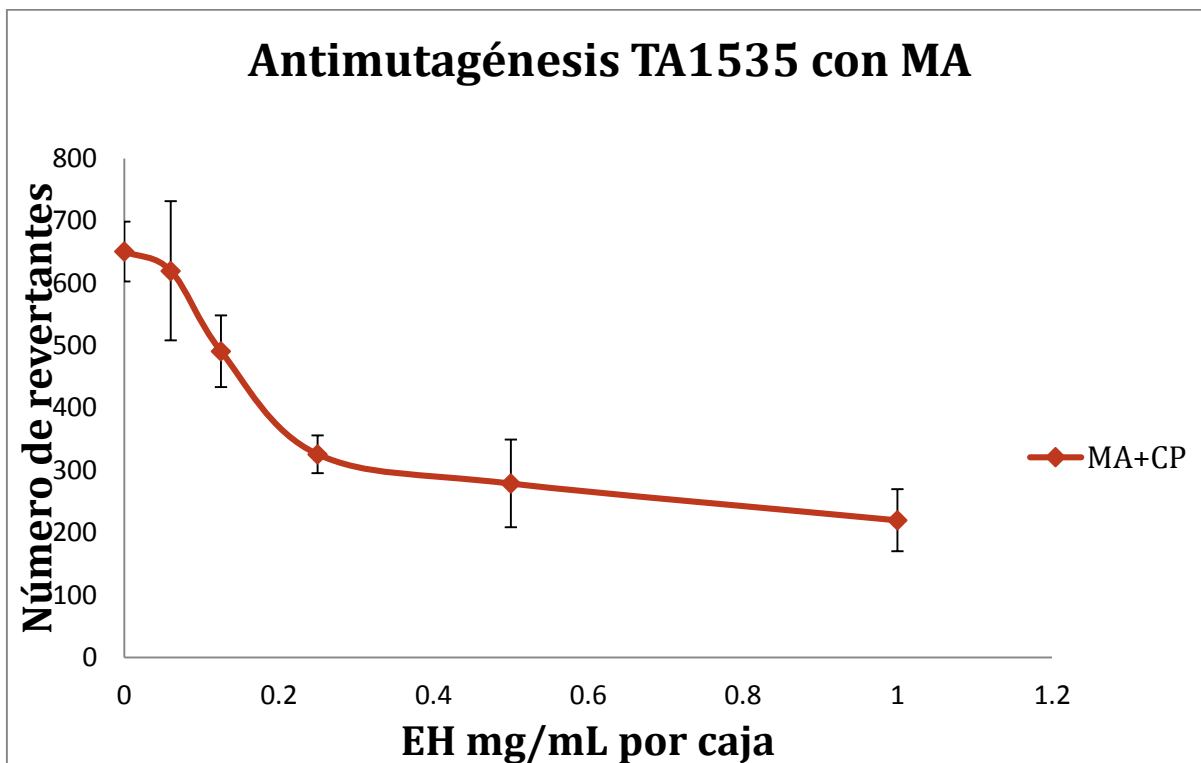


Fig.10 Efecto de la mezcla de ácidos anacárdicos de *Amphipterygium adstringens* a concentraciones de 0.006, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/caja sobre la mutagenicidad de ciclofosfamida. Pendiente diferente de cero $p < 0.0001$.

En la figura 11 se observa el efecto antimutagénico del extracto hexánico a distintas concentraciones (0.03, 0.06, 0.1, 0.125 y 0.25 mg) sobre *Salmonella thypimurium* con adición de 3-metilcolantreno un mutágeno activado principalmente por los citocromos de la subfamilia CYP1A. Se muestran dos ensayos, uno de ellos con el mutágeno, las diferentes concentraciones del extracto hexánico y con la fracción microsomal S9 y el control sin S9. Se observa que el número de mutantes resultantes, por la adición de 3-metilcolantreno, en el ensayo donde se adicionó la fracción microsomal S9 van disminuyendo conforme la concentración del extracto hexánico aumenta, mostrando así un efecto protector.

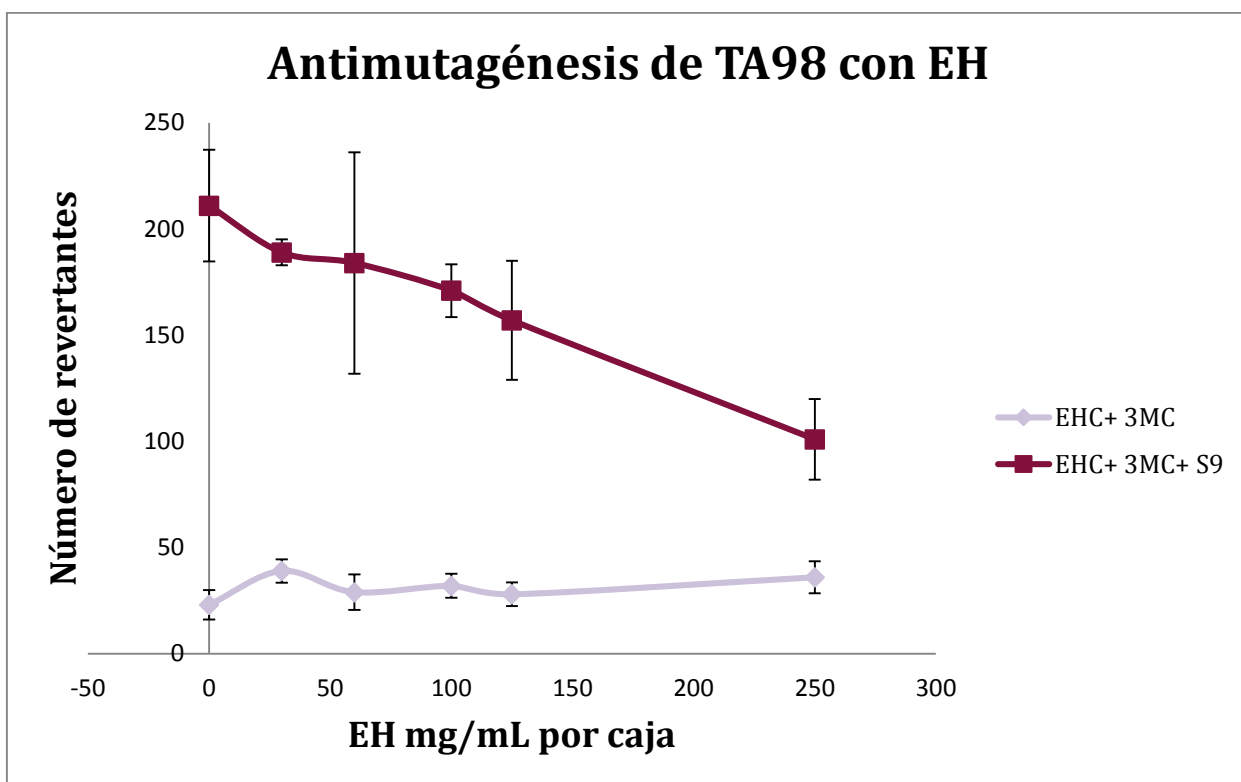


Fig. 11 Efecto del extracto hexánico de *Amphipterygium adstringens* a concentraciones de 0.03, 0.06, 0.1, 0.125 y 0.25 mg/caja sobre la mutagenicidad de 3-metilcolantreno. Pendiente diferente de cero de (EHC+ 3MC + S9) $p < 0.0001$.

8. DISCUSIÓN

En México la medicina tradicional es ampliamente utilizada, sin embargo no se sabe cuál es el efecto de muchas de las plantas empleadas en interacción con enzimas de fase I. Tal es el caso de la corteza del árbol *Amphipterigium adstringens*, mejor conocido como cuachalalate; que a pesar de tener diversos estudios, no ha sido explorado el efecto que puede llegar a tener en interacción con enzimas de importancia en el metabolismo de fármacos como los citocromos P450. Dado que no existen informes del efecto de la interacción de los citocromos P450 con algún extracto o compuesto puro aislado de la corteza de cuachalalate, se llevó a cabo este estudio *in vitro*, como una primera aproximación de los fenómenos que pueden llegar a ocurrir en un organismo; observando el potencial inhibitorio de dos extractos de diferente polaridad y compuestos puros sobre la actividad enzimática microsomal de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2. En el país las formas más habituales de consumo de la corteza de cuachalalate son en infusión y decocción. Este trabajo pretendió aproximarse lo más posible al efecto que puede ocurrir sobre la actividad de las subfamilias CYP1A y CYP2B por lo cual se realizaron estudios con un extracto acuoso.

Los resultados de los ensayos *in vitro* de la actividad enzimática con el extracto acuoso mostraron un efecto inhibitorio muy parecido en todas las isoformas excepción de CYP1A2 en donde el porcentaje de inhibición fue menor (Fig. 4). De acuerdo a los resultados, el potencial de inhibición microsomal de este extracto de mayor a menor es CYP1A1 (CI₅₀: **0.400 mg/mL**) > CYP2B2 (CI₅₀: **0.402 mg/mL**) > CYP2B1 (CI₅₀: **0.433 mg/mL**) > CYP1A2 (CI₅₀: **0.784 mg/mL**).

Además de que el valor de CI₅₀ es muy parecido entre las isoformas, en la figura 4 se puede apreciar que la inhibición de las cuatro isoformas tiene el mismo tipo de pendiente, lo cual podría significar que el extracto acuoso posee el mismo tipo de inhibición sobre la actividad enzimática de las subfamilias CYP1A y 2B, pero en diferente potencia.

A pesar de que aún no existen informes acerca de la totalidad de compuestos presentes en el extracto acuoso, se sabe que se encuentran presentes triterpenos (Oviedo-Chávez et al., 2004, Navarrete et al 2005), taninos y saponinas (González & Delgado, 1962). Por lo cual se puede dilucidar que la inhibición de estas subfamilias podría deberse en parte a la acción de dichos compuestos, como los triterpenos ya que en un estudio previo *in vivo* de (Jeong, 1998) ha sido informado que α -hederina, el mayor componente presente en algunas plantas usadas en la medicina tradicional oriental, tiene efectos en la actividad microsomal de ratas; mostrando una disminución significativa de ésta en las isoformas CYP1A y CYP1A2 a una dosis de 8-80 mg/kg de peso del animal, además de una disminución de la actividad enzimática de CYP2B1 y CYP2B2 pero en un grado menor que en las isoformas antes mencionadas. Otro estudio realizado por (Kim et al. 2004) presenta el efecto inhibidor sobre CYP's de microsomas de hígado humano utilizando ácido oleanólico y ácido ursólico, dos triterpenos comúnmente presentes en plantas. El ácido oleanólico inhibió a CYP3A4 CI_{50} 78.9 μ M y a CYP1A2 CI_{50} 143.5 μ M en los dos casos en tipo de inhibición que se presentó fue competitiva. El ácido ursólico también mostró un tipo de inhibición competitiva sobre CYP2C19 CI_{50} 199.7 μ M.

Son pocos los estudios que revelen algún tipo de efecto inhibidor con taninos sobre la actividad de los citocromos p450, sin embargo en un estudio de (Yao *et al*, 2008) el ácido tánico mostró mayor inhibición sobre las isoformas CYP1A1 y CYP1A2 en microsomas de hígados de rata y humano que en otros CYP's también evaluados como el CYP2C, CYP2E1 y CYP3A.

Si bien los compuestos de los estudios antes mencionados no son los mismos que en la corteza del cuachalalate o bien no ha sido documentada su presencia en el extracto acuoso de la corteza de esta planta, el efecto inhibitorio sobre la isoforma CYP1A1 al igual que en el presente estudio es más potente que en otras isoformas probadas; esto nos puede dar una aproximación de que estos compuestos podrían estar involucrados en la inhibición observada en este estudio. Por otra parte los resultados de la inhibición de las isoformas de la subfamilia

CYP2B no están muy claros, ya que en los estudios previos no se ha informado una inhibición de la misma magnitud con taninos y triterpenos, lo cual podría sugerir que en la inhibición sobre CYP2B1 y CYP2B2 con el extracto acuoso podrían estar involucrados otros compuestos aun no descritos en la composición química o bien que la mezcla de los compuestos presentes en este extracto tenga un efecto sinérgico sobre estas isoformas.

Además de haber utilizado el extracto acuoso, también se recurrió a trabajar con un extracto hexánico con la finalidad de observar el efecto sobre la actividad enzimática con un extracto con diferente polaridad. Además de que existen estudios científicos con el extracto hexánico que validan el uso de la corteza de cuachalalate en los principales padecimientos en la que es empleada (en problemas gástricos e inflamación). Por ejemplo este extracto ha mostrado tener una actividad anti *Helicobacter pylori* (Castillo- Juárez et al, 2007), una bacteria que se sabe que causa problemas gástricos. También el extracto hexánico ha mostrado un efecto antiinflamatorio (Oviedo-Chávez et al., 2004).

Conociendo la importancia que representa este extracto en el uso de la corteza de cuachalalate en la medicina tradicional debido a que previos estudios confirman los efectos esperados por los consumidores; el objetivo de este estudio fue conocer si existe un tipo de interacción con los citocromos p450. Los resultados sobre la actividad enzimática mostraron un efecto inhibitorio en CYP2B1, CYP2B2 y en la isoforma CYP1A1 pero en menor grado. El potencial de inhibición de la actividad enzimática microsomal con el extracto hexánico de mayor a menor es CYP2B1 (CI₅₀: **0.057 mg/mL**) >CYP2B1 (CI₅₀:**0.100 mg/mL**)> CYP1A1 (CI₅₀: **0.268 mg/mL**) y en el caso de CYP1A2 no se observó inhibición (Fig. 1).

Los estudios antes mencionados expusieron que la actividad antimicrobiana contra *Helicobacter* y la actividad antiinflamatoria, está relacionada a los compuestos presentes en el extracto hexánico, fenoles de cadena larga en donde se encuentran los ácidos fenólicos y aldehídos.

Por lo tanto en este estudio se evaluó una mezcla de ácidos anacárdicos, los principales compuestos dentro de los ácidos fenólicos, y dos ácidos anacárdicos puros: el ácido 6-[16'Z-nonadecenil]-salicílico y el ácido 6-pentadecil salicílico

sobre la actividad enzimática microsomal de la isoforma que resulto ser la más sensible al extracto hexánico: CYP2B1. Para saber si estos compuestos eran los responsables en la inhibición observada en presencia del extracto hexánico, En el caso de la mezcla de ácidos anacárdicos, el comportamiento de inhibición fue parecido al del extracto hexánico (Fig. 2) sin embargo el extracto hexánico resulto ser casi seis veces más potente que la mezcla sobre la inhibición de la actividad de CYP2B1 (CI₅₀ de mezcla de ácidos anacárdicos: 0.327 mg/mL vs CI₅₀ de extracto hexánico: 0.057 mg/mL). Por otro lado, la inhibición de los dos compuestos puros resultó ser significativa solo a concentraciones altas (Fig. 3). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos tanto, con la mezcla de ácidos como con los dos compuestos puros, se puede descartar la idea de que los ácidos anacárdicos sean los únicos implicados en el efecto inhibitorio observado con el extracto hexánico. Si bien la mezcla de ácidos anacárdicos mostró mayor inhibición que los compuestos puros, el extracto hexánico mostró mayor capacidad de inhibir las isoformas probadas. Pero es importante destacar que tanto el extracto como la mezcla de ácidos anacárdicos presentaron un comportamiento parecido y esto podría deberse en parte a la acción de los compuestos presentes en la mezcla. Sin embargo, es probable que la inhibición mostrada con el extracto hexánico se deba a la acción de otros compuestos presentes como los aldehídos fenólicos u otros compuestos aún no descritos.

A pesar de que en la literatura no existen estudios que demuestren el efecto de los ácidos anacárdicos sobre los citocromos p450, un estudio *in vitro* demostró que ácidos fenólicos como el ácido clorogénico, el ácido protocatecuico y silibina inhiben la actividad enzimática de CYP2B1 (Baer et al. 1998), por otro lado, un estudio *in vivo* con el ácido protocatecuico no se observó inhibición en CYP2B1 y en otras isoformas probadas (Krajka et al., 2005).

Por lo que otra de las posibles explicaciones de la inhibición del extracto hexánico podría deberse no solo a determinados tipos compuestos, sino más bien a un efecto sinérgico de la totalidad de los compuestos presentes en el extracto hexánico, al igual que en la inhibición que se observó con el extracto acuoso.

Existen estudios con la corteza del árbol *Amphipterygium adstringens* que han reportado que las mezclas de compuestos tienen mayor efecto que los compuestos purificados. Por ejemplo el estudio de (Castillo-Juárez et al. 2007), el cual evaluaron la capacidad anti-*Helicobacter pylori*, una mezcla de ácidos anacárdicos mostró una mayor actividad dosis dependiente contra la bacteria que tres compuestos puros. En otro estudio de (Oviedo et al. 2004), se documentó que dos extractos de la corteza de cuachalalate, acuoso y hexánico, mostraron mayor actividad antiinflamatoria en edemas de ratas que dos compuestos puros.

Algo importante de mencionar es el efecto antiinflamatorio y anticancerígeno de la corteza de cuachalalate que han sido atribuidos por la población mexicana generación tras generación y también por previos estudios podrían estar relacionados en parte a la acción de los compuestos presentes en la corteza, los cuales interfieren con la actividad de la actividad enzimática de los citocromos p450. Se ha reportado por ejemplo en el estudio de Kim, et al. 2004, que la inhibición de CYP1A2 por el ácido oleanólico está relacionada con efectos antiinflamatorios y anticancerígenos que anteriores estudios había presentado este compuesto.

Con la finalidad de observar si el fenómeno mostrado en el ensayo *in vitro* de la actividad enzimática microsomal, era similar en un organismo completo, se decidió realizar un ensayo de mutagenicidad solo en las isoformas que presentaron mayor inhibición (CYP1A1 y CYP2B1) con la mezcla de ácidos anacárdicos y con el extracto hexánico,

En el ensayo de Ames o de mutagenicidad se utilizan cepas de *Salmonella thypimurium* como modelo estudio, ya que tienen la capacidad de detectar una gran variedad de compuestos. Las cepas con las cuales se trabajaron fueron TA1535 la cual tiene la mutación *his G46*, por una sustitución de bases en el operón histidina, una mutación *uvrB* por lo cual tiene deficiencias en el mecanismo de reparación y también porta la mutación *rfa* la cual hace que sea más permeable a las macromoléculas (Maron & Ames, 1983). El mutágeno utilizado en la cepa TA1535 fue la ciclofosfamida la cual es principalmente metabolizada por CYP2B.

La otra cepa utilizada fue TA98 la cual es mutante de *his D3052*, resultado de la deleción de un par de bases en el operón de la histidina, además también presenta las mutaciones *uvrB* y *rfa* y la presencia del plásmido *PKM 101* teniendo mayor susceptibilidad para la reparación del DNA (Maron & Ames, 1983). Como agente mutagénico para esta cepa fue 3-metilcolantreno (3-MC) el cual es principalmente metabolizado por la subfamilia CYP1A.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta prueba, las cepas a las se les añadió una mezcla S9 y la mezcla de ácidos anacárdicos o extracto hexánico, presentaron un comportamiento de antimutagénesis dosis dependiente.

El ensayo con la cepa TA1535 y el extracto hexánico, el cual resultó tener mayor inhibición sobre CYP2B1, se puede observar un efecto antimutagénico más evidente a concentraciones más bajas en comparación con la mezcla de ácidos anacárdicos, utilizando la misma cepa y el agente mutagénico. (Fig. 5 y 6). Estos resultados respaldan a los ensayos de actividad enzimática, ya que es muy probable que el efecto antimutagénico esté relacionado con la inhibición de los citocromos p450 involucrados en el metabolismo de ciclofosfamida, debido a la acción del extracto hexánico o a la mezcla de ácidos anacárdicos.

En el caso del ensayo en donde se utilizó la cepa TA98 y el extracto hexánico, solo se observó una protección contra 3-MC a concentraciones altas (Fig. 7); lo cual coincide con las pruebas *in vitro* de la actividad enzimática en donde se observa menor inhibición de CYP1A en comparación con los miembros de la subfamilia CYP2B.

Los datos en conjunto de la prueba de actividad enzimática y del ensayo de Ames mostraron que el extracto hexánico tiene un efecto inhibitorio más potente sobre la isoforma CYP2B1, esto podría deberse a un efecto sinérgico de los compuestos presentes en el extracto hexánico.

A pesar de que la forma más habitual de consumo del cuachalalate es en decocción o infusión, los compuestos que se han reportado en el extracto hexánico también podrían estar presentes en el acuoso, ya que en previos estudios se ha observado que algunos compuestos presentes en el extracto hexánico tienen efectos anti-

Helicobacter y gastroprotectores, padecimientos para los cuales se utiliza principalmente la corteza de *Amphiterygium adstringens*.

Por lo tanto el consumo de la corteza del cuachalalate podría tener implicaciones negativas, ya que la isoforma CYP2B1 juega un papel importante en el metabolismo de fármacos y pesticidas.

A pesar de que la inhibición de CYP1A1 por el extracto acuoso sea significativa a concentraciones altas, esto no significa que no pueda existir riesgo ya que en muchas ocasiones las personas tienden a tomar una gran cantidad de producto, como excusa de obtener mejores resultados. Además que en la actualidad existen en el mercado comprimidos de la corteza de cuachalalate los cuales podrían tener la concentración necesaria para inhibir a los citocromos p450.

9. CONCLUSIÓN

La importancia del presente estudio residió en conocer el efecto de la interacción de enzimas de fase I de importancia en el metabolismo, citocromos p450, con extractos provenientes de la corteza de cuachalalate la cual es una planta de importancia en la medicina tradicional mexicana.

Este estudio demostró que los dos extractos probados de diferente polaridad tuvieron un efecto inhibitor en las isoformas evaluadas, a excepción de CYP1A2 en interacción con el extracto hexánico.

Las isoformas CYP2B1 y CYP2B2 tuvieron una fuerte inhibición a concentraciones bajas en presencia del extracto hexánico. A pesar de probar dos compuestos puros y una mezcla de ácidos anacárdicos presentes en el extracto hexánico para buscar a un responsable de la inhibición observada, el extracto presentó mayor inhibición, seguramente debido a un efecto sinérgico de la totalidad de compuestos presentes.

El extracto acuoso, la forma más habitual de consumo de la población mexicana, inhibió a todas las isoformas evaluadas; sin embargo sólo se observó una inhibición significativa a concentraciones altas.

10. PERSPECTIVAS

Para conocer el tipo de inhibición observada en este trabajo y poder realizar estudios de cinética enzimática, sería necesario hacer una caracterización química de los dos extractos utilizados, con el objetivo de conocer la totalidad de compuestos presentes en cada uno.

Si bien los estudios *in vitro* realizados en el presente estudio nos dieron a conocer el efecto de los extractos de cuachalalate sobre la actividad enzimática de los citocromos p450, sería muy enriquecedor realizar un estudio *in vitro* con los dos

extractos, con el objetivo de conocer el efecto en un organismo completo y poder tener una mejor aproximación de lo que sucede en los consumidores de la corteza de *Amphipterygium adstringens*.

11. REFERENCIAS

- Abass K., Reponen P., Mattila S, Pelkonen O., 2010, Metabolism of carbosulfan II. Human interindividual variability in its in vitro hepatic biotransformation and the identification of the cytochrome P450 isoforms involved. *Chem. Biol. Interact.*, 185: 163-173.
- Abass K., Reponen P., Turpeinen M., Jalonen J., Pelkonen O., 2007, Characterization of diuron N-demethylation by mammalian hepatic microsomes and cDNAexpressed human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab. Dispos.*, 35: 1634-1641.
- Anwar Anwar-Mohameda, Reem H Elbekaia & Ayman OS El-Kadi, 2009, Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism, *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 5:501-2.
- Anzenbacher P., Anzenbacherová E., 2001, Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cell Mol Life Sci.* 58: 737-47.
- Argueta-Villamar A., (Coord), 1994, Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México. 1:542-3.
- Arrieta J., Banitez J., Flores E., Castillo C., Navarrete A., 2003, Purification of gastroprotective triterpenoid from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Medical* 69:905-909.
- Attoub S., Karam S.M., Nemmar A., Arafat K., John A., Al-Dhaheri W., Al Sultan M.A., Raza H., 2014, Short-Term Effects of Oral Administration of Pistacia Lentiscus Oil on Tissue-Specific Toxicity and Drug Metabolizing Enzymes in Mice, *Cell Physiol Biochem* 33:1400-1410.
- Baer-Dubowska W., Szaefer H., Krajka-Kuzniak V., 1998, Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds, *Xenobiotica.* 28:735-43.
- Bauer J., Wekerle H., Lassmann H., 1995, Apoptosis in brain-specific autoimmune disease. *Curr Opin Immunol.*7: 839-843.

- Bradford M., 1976, A rapid and sensitive method of quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Cabrera L. 1980, *Diccionario de Aztequismos*, Ed. Oasis. P. 57
- Carrasco A.L., Rivera E., 2009, Tesis: Actividad antibacteriana de compuestos aislados de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre bacterias patógenas de la cavidad oral. U.N.A.M.
- Castillo-Juárez I., 2011, Tesis: Estudio de la actividad anti-*Helicobacter pylori* de la corteza *Amphipterygium adstringens*, U.N.A.M.
- Castillo-Juárez I., Garcia-Contreras R., Velásquez N., Martinez-Vazquez M., 2013, *Amphipterygium adstringens* Anacardic Acid Mixture Inhibits Quorum Sensing-controlled Virulence Factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Archives of Medical Research* 44:488-94.
- Castillo-Juárez I., Rivero-Cruz F., Celis H., Romero I., 2007, Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*, *Ethnopharmacology* 114: 72-77.
- Clarke, S. E., 1998, In vitro assessment of human cytochrome P450. *Xenobiotica*, 28: 1167-1202.
- Coleman S., Linderman R., Hodgson E., Rose R.L., 2000, Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. *Environ. Health Perspect.* 108,1151.
- Costas Ioannides, Ed. 1996. *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Dalla L., Braga A., Garcia A., Martinez M., Toninello A., 2012, 3 α -hydroxymasticadienonic acid as an antiproliferative agent that impairs mitochondrial functions, *Nat. Prod.* 75: 557-562.
- Ekins S., Wrighton SA., 1999, The role of CYP2B6 in human xenobiotic metabolism, *Drug Metab Rev.* 31: 719-754.
- Gonzalez E.E., Delgado J.N., 1962, Phytochemical investigation of *Amphipterygium adstringens*, *Pharm Sci* 51: 786-790.
- Gonzalez FJ., 1998, The molecular biology of cytochrome P450s, *Pharmacol Rev.* 40: 243-88.
- Guizar, N.E., Sánchez V. A., 1991, *Guía para el reconocimiento de los principales árboles del Alto Balsas*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Haas D.W., Ribaud H.J., Kim R.B., Tierney C., Wilkinson G.R., Gulick R.M., Clifford D.B., Hulgand T., Marzolini C., Acosta E.P., 2004, Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an adult AIDS clinical trials group study. *AIDS*, 18:2391-2400.

- Jeong H.G., 1998, Suppression of constitutive and inducible cytochrome P450 gene expression by alpha-hederin in mice, *Biochem Mol Biol Int.* 46:1019-26.
- Jinno H., Tanaka-Kagawa T., Ohno A., Makino Y, Matsushima E., Hanioka N., Ando M., 2003, Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants. *Drug Metab Dispos* 31:398–403.
- Jung H., Lee S., 2014, Inhibition of Human Cytochrome P450 Enzymes by Allergen Removed *Rhus verniciflua* Stoke Standardized Extract and Constituents, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014:1-5.
- Kim K.A., Lee J.S., Park H.J., Kim J.W., Kim C.J., Shim I.S., Kim N.J., Han S.M., Lim S., 2004, Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes, *Life Sciences* 74 : 2769–2779.
- Krajka-Kuzniak V., Szaefer H., Baer-Dubowska W., 2005, Modulation of 3-methylcholanthrene-induced rat hepatic and renal cytochrome P450 and phase II enzymes by plant phenols: protocatechuic and tannic acids, *Toxicology Letters* 152:117-126.
- Lang D.H., Rettie A.E., Bocker, R.H., 1997. Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbuthylazine, ametryne, and terbutryne in human liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.*, 10: 1037-1044.
- Lang T., Klein K., Fischer J., Nussler A.K., Neuhaus P., Hofmann U., Eichelbaum M., Schwab M., Zanger U.M., 2001, Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics*, 11: 399-415.
- Madan A., Usuki E., Burton L.A., Ogilvie B.W., Parkinson A., 2002, In vitro approaches for studying the inhibition of drug-metabolizing enzymes and identifying the drug-metabolizing enzymes responsible for the metabolism of drugs, .D. Rodrigues (Ed.), *Drug-drug interactions*, 212–294.
- Magdaleno R., 1987, *La farmacia del campo*. De Balsas editores S.A., Morelia Michoacán. 125 pp.
- Makino M., Motegi T., Fujimoto Y., 2004, Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens*, *Photochemistry*, 65:891-896.
- Maron D.M., Ames B.N., 1983, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Research*, 113: 173-215.
- Mata, R., F. Calzada, A., Navarrete, F. Del Río, y G. Delgado. 1991, Long Chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*, *Journal of Ethnopharmacology* 34: 147-154.

- Monro A.W., Girvan H.M., McLean K., 2007, Variations on a (t)heme-novel mechanisms redox partners and catalytic functions in Cytochrome P450 superfamily. *Nat Prod Rep*, 24: 585-609.
- Navarrete A., Martínez M., Reyes W., 1998, Gastroprotective Activity of the Stem Bark of *Amphipterygium adstringens* in Rats, *Phytotherapy Research*, 12:1-4.
- Navarrete A., (Coord), 2009, Plantas Medicinales de México. Monografía científica. Cuachalalate *Amphipterygium adstringens*, Ed. Sentido Giratorio Ediciones.
- Navarrete A., Oliva I., Sánchez-Mendoza M.E., Arrieta J., Cruz-Antonio L., Castañeda-Hernández G., 2005, Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats, *Pharmacy and Pharmacology* 57:1629-1636.
- Ocegueda S. Moreno E., Koleff P., 2005, Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas* 62: 12-15.
- Olivera A.G., Soto M., Martinez M., Terrazas T., Solares F., 1999, Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht), *Journal of Ethnopharmacology*, 68:109-113.
- Ortiz de Montellano P.R., 1995b, Cytochrome P450, Structure, Mechanism, and Biochemistry. Plenum, New York and London.
- Oviedo-Chávez I., Ramirez M.T., Soto-Hernández M., Martinez-Vázquez M., 2004, Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity, *Phytomedicine* 11:436-45.
- Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J. & Raunio, H., 2008. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol.*, 82: 667-715.
- Pelkonen O., Mäenpää J., Taavitsainen P., Rautio A., Raunio H., 1998, Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica*, 28: 1203-1253.
- Pennington, T.D., Sarukhán, J. 1998, Árboles tropicales de México. Instituto de Ecología, UNAM, 2da. edición, México; 322 -323
- Premalatha B, Sachdanandam P. 2000, Potency of *Semecarpus anacardium* Linn. Nut milk extract against aflatoxin B(1)-induced hepatocarcinogenesis: Reflection on microsomal biotransformation. *Pharmacol Res.* 42:161-6.
- Rodeiro I, Gómez-Lechón M.J., Perez G., Hernández I., Herrera J.A., Delgado R., Castell J.V., Donato M.T., 2013, *Mangifera indica* L. Extract and Mangiferin

Modulate Cytochrome P450 and UDPGlucuronosyltransferase Enzymes in Primary Cultures of Human Hepatocytes, *Phytotherapy Research* 27:745-752.

- Seliskar M., Damjana Rozman, 2007, Mammalian cytochromes P450. Importance of tissue specificity, *Biochimica et Biophysica Acta* 1770: 458-466.
- Solares-Arenas F., Gálvez C., 2002, Manual para una producción sustentable de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht), Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro. Campo Experimental "Zacatepec" Zacatepec, Morelos, México.
- Solares-Arenas F., Mata J.J., Vargas J., 2006, Capacidad de regeneración en grosor y lateral de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht.) en el estado de Morelos, *Ra Xihai*.2:481-495.
- Sueyoshi T., Yokomori, N., Korach, K.S., Negishi, M. 1999. Developmental action of estrogen receptor- α feminizes the growth hormone-Stat5b pathway and expression of CYP2A4 and Cyp2d9 genes in mouse liver. *Mol. Pharmacol.* 56:473-477.
- Sung B., Pandey M.K., Ahn K.S., Yi T., Chaturvedi M.M., Lui M., Aggarwal B.B., 2008, Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaBalpha kinase, leading to potentiation of apoptosis, *Blood*, 111:4880-91.
- Suo M., Isao H., Ishida Y., Shimano Y., Bi C., Kato H., Takano F., Ohta T., 2012, Phenolic lipid ingredients from cashew nuts, *Nat Med.* 66:133-9.
- Tang J., Cao Y., Rose R.L., Brimfield A.A., Dai D., Goldstein J.A., Hodgson E., 2001, Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 29:1201-1204.
- Tang J., Cao Y., Rose R.L., Hodgson E., 2002, In vitro metabolism of carbaryl by human cytochrome P450 and its inhibition by chlorpyrifos. *Chem. Biol. Interact.*, 141: 229-241.
- Usmani K.A., Rose R.L., Goldstein J.A., Taylor W.G., Brimfield A.A., Hodgson E., 2002, In vitro human metabolism and interactions of repellent N,N-diethyl-mtoluamide. *Drug Metab. Dispos.* 30:289-294.
- Wu Y., He L., Zhang L., Chen J., Yi Z., Zhang J., Liu M. y Pang X., 2011, Anacardic Acid (6-Pentadecylsalicylic Acid) Inhibits Tumor Angiogenesis by Targeting

Src/FAK/Rho GTPases Signaling Pathway, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 339:403-411.

- Yao H.T., Chang Y.W., Lan S.J., Yeh T.K., 2008, The inhibitory effect of tannic acid on cytochrome P450 enzymes and NADPH-CYP reductase in rat and human liver microsomes, *Food and Chemical Toxicology* 46:645-653.
- Zanger U. M., Schwab M., 2013, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* 138: 103–14.

12. APÉNDICE

En la figura 12 se puede observar que las distintas concentraciones del extracto hexánico utilizadas en los ensayos de actividad enzimática microsomal, no afectan con la fluorescencia de la resorufina lo cual acredita que los resultados de inhibición no se deben a la interferencia con la resorufina.

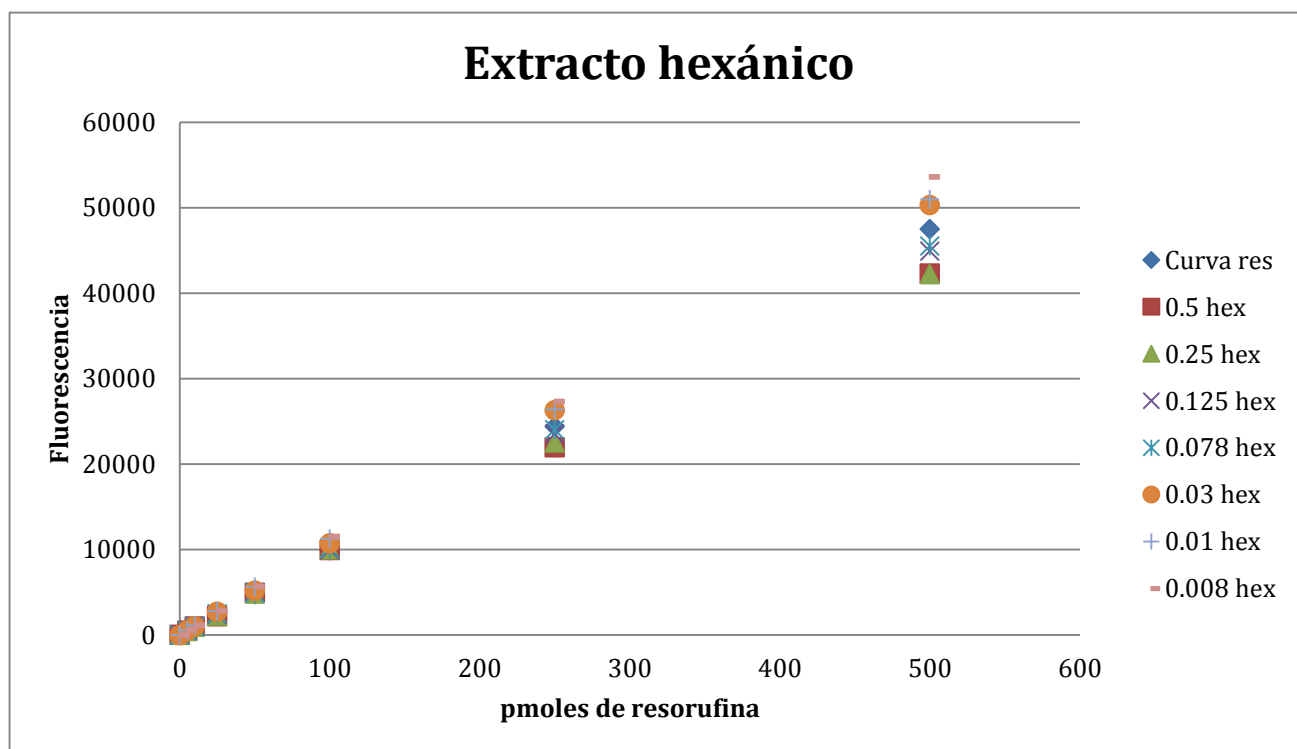


Fig. 12 Efecto del extracto hexánico de *Amphipterygium adstringens* a concentraciones de 0.008, 0.01, 0.03, 0.078, 0.125, 0.25 y 0.5 mg/mL por triplicado sobre la fluorescencia de la resorufina.

En la figura 13 se puede observar que las distintas concentraciones del extracto acuoso utilizadas en los ensayos de actividad enzimática microsomal, no afectan con la fluorescencia de la resorufina lo cual acredita que los resultados de inhibición no se deben a la interferencia con la resorufina.

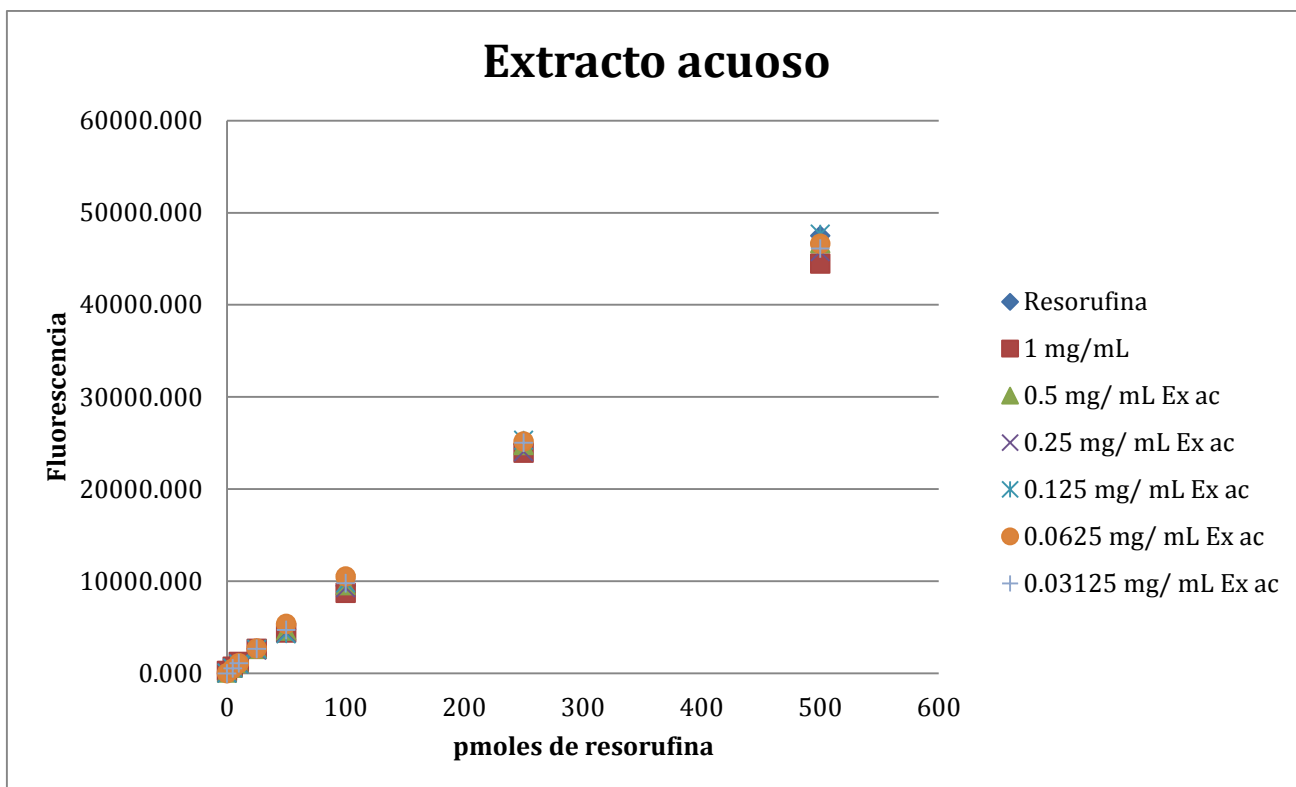


Fig. 13 Efecto del extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* a concentraciones de 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL por triplicado sobre la fluorescencia de la resorufina.

En la figura 14 se puede observar que la mayor concentración (0.5 mg/mL) de la mezcla de ácidos anacárdicos utilizada en los ensayos de actividad enzimática microsomal, no afecta con la fluorescencia de la resorufina lo cual acredita que los resultados de inhibición no se deben a la interferencia con la resorufina. En este caso el experimento solo se realizó por duplicado debido a que no se contaba con la cantidad suficiente de mezcla de ácidos anacárdicos.

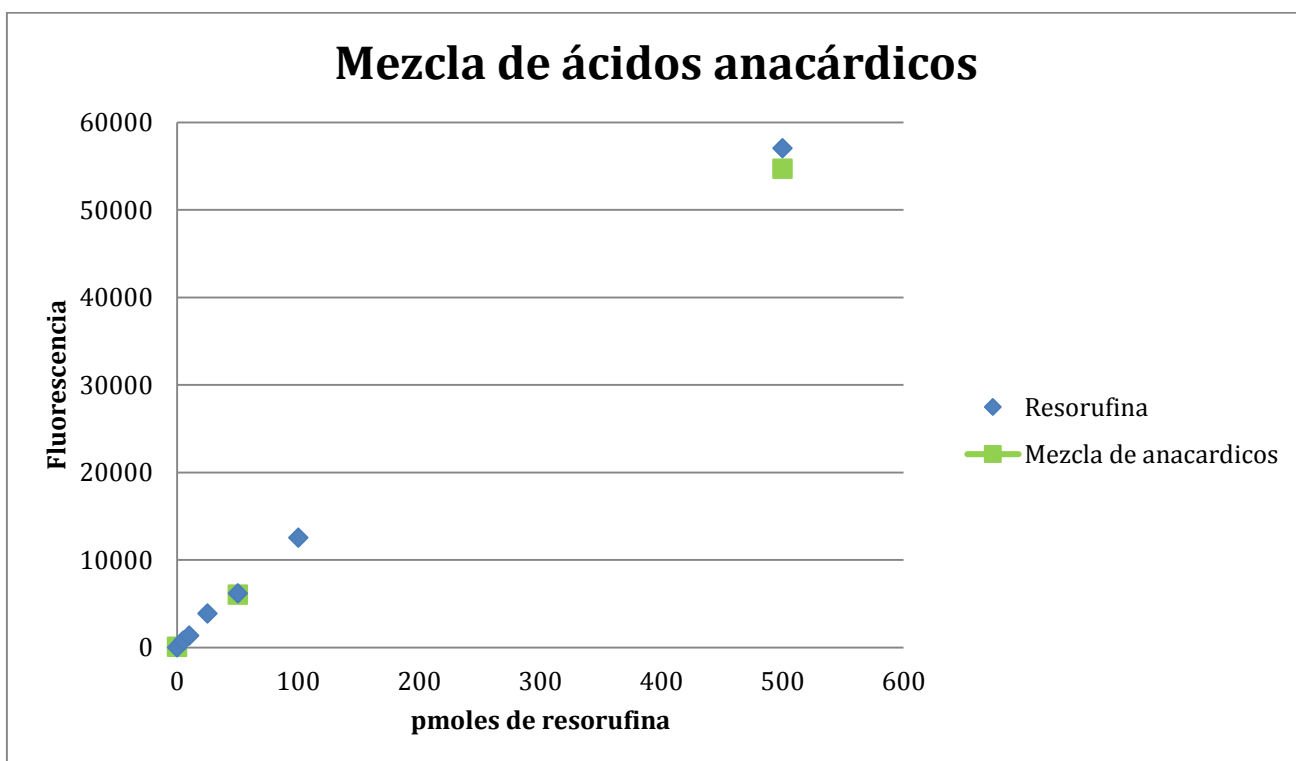


Fig.14 Efecto de la mezcla de ácidos anacárdicos presente en el extracto hexánico de *Amphipterygium adstringens* a la concentración de 0.5 mg/mL por duplicado sobre la fluorescencia de la resorufina.

En la figura 15 se puede observar que la mayor concentración (1425 μM) del ácido 6-pentadecil salicílico utilizada en los ensayos de actividad enzimática microsomal, no afecta con la fluorescencia de la resorufina lo cual acredita que los resultados de inhibición no se deben a la interferencia con la resorufina. En este caso el experimento solo se realizó por duplicado debido a que no se contaba con la cantidad suficiente de este compuesto puro.

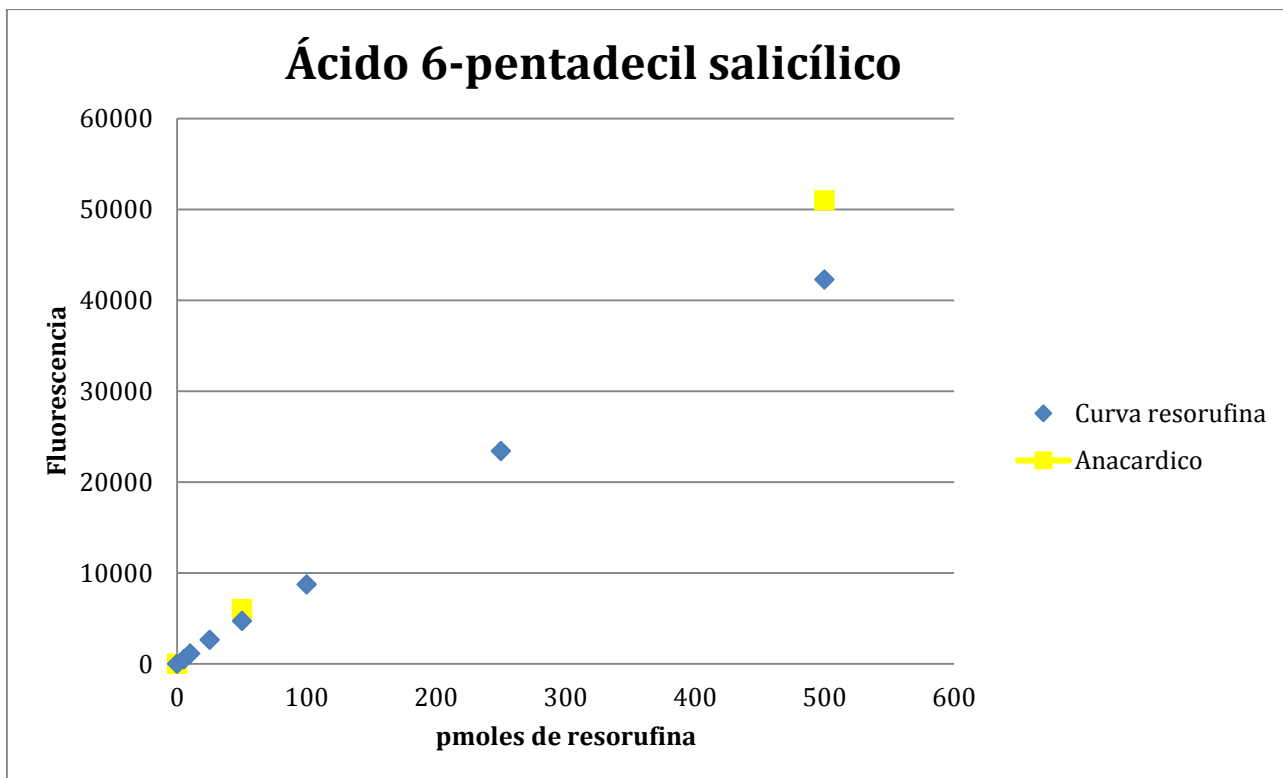


Fig. 15 Efecto del ácido 6-pentadecil salicílico presente en el extracto hexánico de *Amphipterygium adstringens* a la concentración de 1425 μM por duplicado sobre la fluorescencia de la resorufina.

En la figura 16 se puede observar que la mayor concentración (1225 μM) del ácido 6-[16'Z-nonadecenil]-salicílico utilizada en los ensayos de actividad enzimática microsomal, no afecta con la fluorescencia de la resorufina lo cual acredita que los resultados de inhibición no se deben a la interferencia con la resorufina. En este caso el experimento solo se realizó por duplicado debido a que no se contaba con la cantidad suficiente de este compuesto puro.

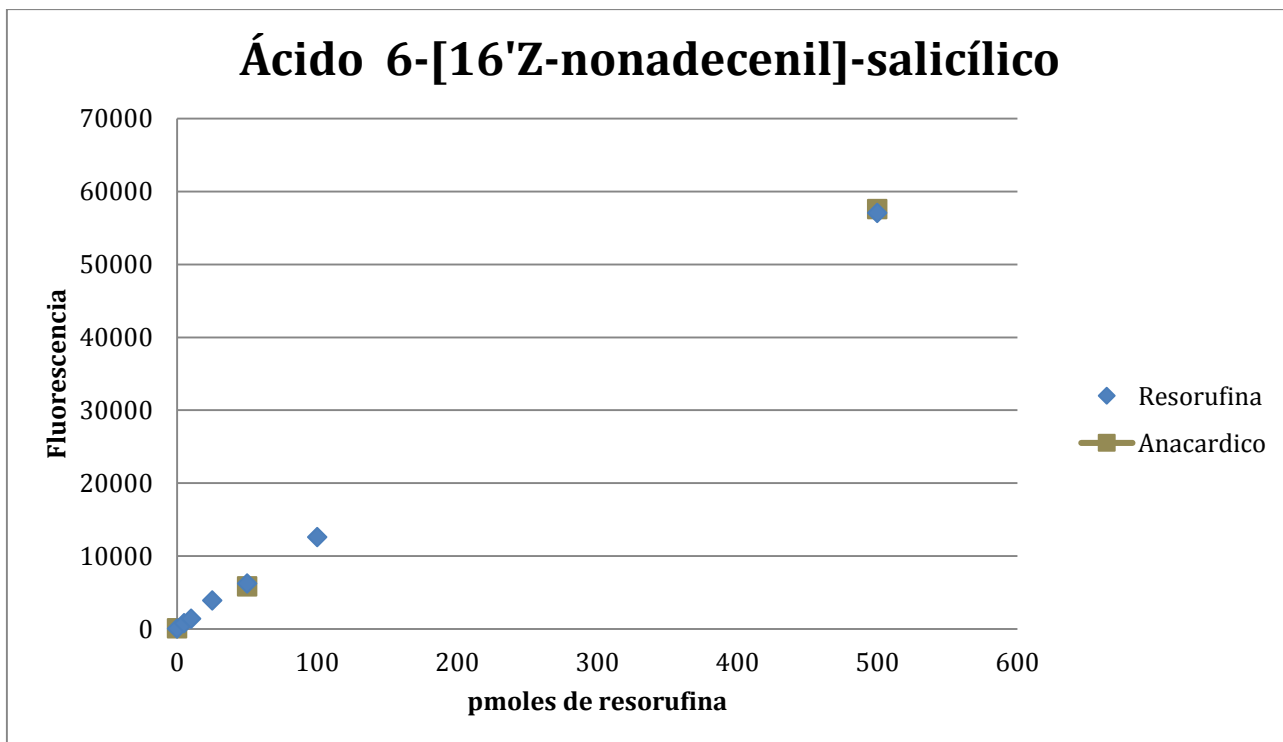


Fig. 16 Efecto del ácido 6-[16'Z-nonadecenil]-salicílico presente en el extracto hexánico de *Amphipterygium adstringens* a la concentración de 1225 μM por duplicado sobre la fluorescencia de la resorufina.