



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**Biotransformación de cuatro compuestos
derivados de ácido *para*-aminobenzoico a través
de reacciones *in vitro* catalizadas por el citocromo
P-450 de hígado de rata.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA**

P R E S E N T A :

Q.F.B. FELICIANO TAMAY CACH



MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2007



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F siendo las 12:00 horas del día 21 del mes de junio del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E. S. M. para examinar la tesis de grado titulada:

“Biotransformación de cuatro compuestos derivados de ácido para-aminobenzoico a través de reacciones *in vitro* catalizadas por el citocromo P-450 de hígado de rata”

Presentada por el alumno:

TAMAY

Apellido paterno

CACH

materno

FELICIANO

nombre(s)

Con registro:

A	0	5	0	6	0	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

DR. JOSÉ GUADALUPE TRUJILLO FERRERA

Director de tesis

DR. GABRIEL MARCELIN JIMÉNEZ

DR. IGNACIO VALENCIA HERNÁNDEZ

DR. JOSÉ CORREA BASURTO

DRA. ELVIA MERA JIMÉNEZ

DRA. GUADALUPE CLEVA VILLANUEVA LÓPEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

M. EN C. ELEAZAR LARA PADILLA



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I. P. N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F., el día 23 del mes noviembre del año 2007, el que suscribe **FELICIANO TAMAY CACH** alumno del Programa de Maestría en Ciencias con especialidad en Farmacología con número de registro A050609, adscrito a **la Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **D. en C. JOSÉ G. TRUJILLO FERRARA** y del **D. en C. GABRIEL MARCELÍN JIMÉNEZ** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Biotransformación de cuatro compuestos derivados de ácido *para*-aminobenzoico a través de reacciones *in vitro* catalizadas por el citocromo P-450 de hígado de rata”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: felixtacmx@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Q.F.B. FELICIANO TAMAY CACH

Nombre y firma

DEDICATORIAS:

Por sobre todas las cosas a Dios por permitirme seguir con vida y poder llevar a cabo muchas cosas con su ayuda.

Con mucho cariño y amor a mis padres que hoy por hoy son la base para seguir adelante, por la confianza que han depositado en mí al apoyarme para venir de tan lejos y por enseñarme que las cosas que se obtienen con esfuerzo se valoran más.

Mis hermanos Mari, Enrique y Julio, por los momentos tan bonitos que compartimos juntos y por ayudarme a creer en mí. A mis sobrinos que son un aliento para seguir adelante.

A esa persona muy especial que Dios puso en mi camino, en lo cual hemos compartido tanto y seguiremos compartiendo momentos bellos. A ti, J.C. D. L. con mucho amor y cariño.

AGRADECIMIENTOS:

Al Instituto Politécnico Nacional, en especial a la Escuela Superior de Medicina por abrirme las puertas y compartirme sus conocimientos así como a todos los profesores de la Maestría.

Al Dr. José Trujillo Ferrara por permitirme trabajar con su grupo de investigadores y esperando que en un futuro volvamos hacer equipo.

Al Dr. Gabriel Marcelín por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio de Farmacología.

A los sinodales Dr. Ignacio Valencia, Dra. Cleva Villanueva, Dra. Elvia Mera y al Dr. José Correa.

A los integrantes del laboratorio del Servicio de Investigación de Farmacología Clínica del Hospital General de México 2000, por haber compartido sus conocimientos.

A los que conforman el Laboratorio de investigación de Bioquímica Médica, por los momentos amistosos que compartimos juntos (Chambitas 2, Marvin, Jazzmin, Dr. Araujo, Gil, Juan, Arturo, Lety,

Mario, Alberto, a los jóvenes de servicio social, a todos y cada uno de los que de alguna manera me brindaron su apoyo y amistad).

Un gran y profundo agradecimiento a Jessica Mendieta (la Ñoñis) por soportarme y sobretodo por ser una gran compañera y amiga. No pierdas ese don que Dios te dio y hay que seguir adelante no lo olvides. Recuerda que siempre cuentas con un amigo.

A Martha Rosales (Martuchis), gracias por los conocimientos compartidos, por tu gran amistad y apoyo, pero sobretodo agradezco los consejos que me diste, me han servido de mucho.

Al Sr. José Luis Martínez (el Jefe) por el apoyo y la amistad brindada. A la Sra. Josefina Tinajero (la Jefa) por compartirme su amistad y cariño.

Un agradecimiento especial a Aracely Domínguez, que me brindó su amistad, cariño, consejos y apoyo. ¡Gracias!

A Mirthala Flores García (la chiquita) por ser una verdadera y gran amiga, por estar conmigo en las buenas y en las malas. Vales oro y por nada cambiaría tu amistad.

A Alejandra Orozco por compartir momentos agradables y emocionantes. Por saber valorar la amistad.

Al Dr. Francisco Castañeda por enseñarme que todo esfuerzo vale la pena y que al final siempre tienen su recompensa. Gracias por ser un gran amigo y compañero de trabajo.

A Ruth Licea por la amistad que se formó durante mi estancia como alumno. ¡Gracias por ser como eres!

Este agradecimiento es muy especial para el Prof. José Iván Vázquez Alcántara[†], por transmitirme sus conocimientos, consejos y apoyo. Gracias profesor, donde quiera que se encuentre.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Investigación de Bioquímica Médica de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y en el laboratorio del Servicio de Investigación de Farmacología Clínica del Hospital General de México 2000 bajo la asesoría del D. en C. José G. Trujillo Ferrara (ESM-IPN) y del D. en C. Gabriel Marcelín Jiménez (SIFC-HGM).

CONTENIDO GENERAL

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE GRÁFICAS	XI
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVI

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Marco teórico.....	1
1.2. Antecedentes.....	5
1.2.1. CYP450.....	5
1.2.1.1. Biotransformación del ácido benzoico.....	10
1.2.1.2. Biotransformación del ácido acetilsalicílico.....	11
1.3. Compuestos derivados del ácido <i>p</i> -aminobenzoico.....	12
1.3.1. Estudios de los compuestos derivados del ácido <i>p</i> -aminobenzoico	12
1.4. Estudios espectrales de interacción de fármacos con el CYP450.....	13
1.5. Estudios de Docking con el CYP450.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. General.....	17
4.2. Específicos.....	17
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
5.1. Obtención del CYP450.....	18
5.1.1. Obtención de microsomas.....	18
5.1.2. Determinación del contenido de proteínas.....	19
5.1.3. Determinación del contenido de CYP450.....	19
5.2. Evaluación de los derivados del ácido <i>p</i> -aminobenzoico con el CYP450	19
5.2.1. Estudios de Docking de los derivados del ácido <i>p</i> -aminobenzoico con el CYP 2B4.....	19

5.2.2. Estudios espectrales de los derivados del ácido <i>p</i> -aminobenzoico con los microsomas hepáticos.....	20
5.2.3. Biotransformación de los derivados del ácido <i>p</i> -aminobenzoico con los microsomas hepáticos.....	20
5.3. Identificación de metabolitos.....	21
5.4. Cuantificación de metabolitos.....	21
5.5. Análisis estadístico.....	21
6. RESULTADOS.....	22
6.1. Cuantificación de proteínas totales.....	22
6.2. Identificación y cuantificación de CYP450.....	23
6.3. Docking de los derivados del ácido <i>p</i> -aminobenzoico con el CYP 2B4...	26
6.4. Interacción de los derivados del ácido <i>p</i> -aminobenzoico con los microsomas hepáticos.....	28
6.5. Identificación de metabolitos.....	34
6.6. Cuantificación de metabolitos.....	39
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	56
8. CONCLUSIONES.....	62
9. PROPUESTAS.....	64
10. BIBLIOGRAFÍA.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Compuestos sintetizados con polaridad media derivados del <i>p</i> -ABA.....	4
Figura 2.	Representación del CYP450.....	5
Figura 3.	Nomenclatura y clasificación de los principales CYP en humanos.....	8
Figura 4.	Mecanismo de la catálisis del CYP450.....	10
Figura 5.	Biotransformación del ácido acetilsalicílico.....	14
Figura 6.	Comparación estructural del salicilato y el ácido benzoico con los compuestos propuestos.....	16
Figura 7.	Vía de biotransformación propuesta para los cuatro derivados del <i>p</i> -ABA a través del CYP450.....	16
Figura 8.	Pico característico del CYP450, cuando se ha reducido y tratado con CO, en microsomas de hígado de rata tratadas con FB y no tratadas.....	24
Figura 9.	Pico característico del CYP448, cuando se ha reducido y tratado con CO, en microsomas de hígado de rata tratadas con β N y no tratadas.....	24

Figura 10.	Modelo obtenido por <i>docking</i> del compuesto 1a con el CYP2B4.....	27
Figura 11.	Modelo obtenido por <i>docking</i> del compuesto 1b con el CYP2B4.....	27
Figura 12.	Modelo obtenido por <i>docking</i> del compuesto de 2a con el CYP2B4.....	27
Figura 13.	Modelo obtenido por <i>docking</i> del compuesto 2b con el CYP2B4.....	28
Figura 14.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 1a.....	28
Figura 15.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 1b	29
Figura 16.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 2a	29
Figura 17.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 2b	29
Figura 18.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 1a interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	30
Figura 19.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 1b interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	30

Figura 20.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 2a interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	31
Figura 21.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 2b interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	31
Figura 22.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 1a interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	32
Figura 23.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 1b interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	32
Figura 24.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 2a interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	33
Figura 25.	Espectro de absorción <i>UV-vis</i> del compuesto 2b interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	33
Figura 26.	Espectro de masas del compuesto 1a.....	34
Figura 27.	Espectro de masas del compuesto 1b.....	35

Figura 28.	Espectro de masas del compuesto 2a.....	35
Figura 29.	Espectro de masas del compuesto 2b.....	35
Figura 30.	Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 1a con microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	36
Figura 31.	Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 1b con microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	37
Figura 32.	Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 2a con microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	37
Figura 33.	Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 2b con microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	37
Figura 34.	Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 1a con microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	38
Figura 35.	Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 1b con microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	38

Figura 36.	Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 2a con microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	39
Figura 37.	Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 2b con microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	39
Figura 38.	Curva de calibración del compuesto 1a a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mM.....	41
Figura 39.	Curva de calibración del compuesto 1b a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mM.....	42
Figura 40.	Curva de calibración del compuesto 2a a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mM.....	43
Figura 41.	Curva de calibración del compuesto 2b a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mM.....	44
Figura 42.	Cromatogramas de HPLC del compuesto 1a obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	45
Figura 43.	Cromatogramas de HPLC del compuesto 1b obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	46

Figura 44.	Cromatogramas de HPLC del compuesto 2a obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	47
Figura 45.	Cromatogramas de HPLC del compuesto 2b obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con FB.....	48
Figura 46.	Cromatogramas de HPLC del compuesto 1a obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	49
Figura 47.	Cromatogramas de HPLC del compuesto 1b obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	50
Figura 48.	Cromatogramas de HPLC del compuesto 2a obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	51
Figura 49.	Cromatogramas de HPLC del compuesto 2b obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con β N.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Comparación entre la K_d y la energía libre de unión enzima-sustrato de los cuatro compuestos evaluados.....	26
Tabla 2.	Parámetros obtenidos para analizar los compuestos.....	40
Tabla 3.	Datos obtenidos de los derivados del <i>p</i> -ABA.....	40
Tabla 4.	Datos obtenidos de la curva de calibración de cada uno de los derivados del <i>p</i> -ABA.....	40
Tabla 5.	Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 1a con los microsomas de hígado de rata inducidos con FB con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.....	53
Tabla 6.	Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 1b con los microsomas de hígado de rata inducidos con FB con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.....	53
Tabla 7.	Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 2a con los microsomas de hígado de rata inducidos con FB con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.....	53
Tabla 8.	Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 2b con los microsomas de hígado de rata inducidos con FB con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.....	54

Tabla 9.	Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 1a con los microsomas de hígado de rata inducidos con β N con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.....	54
Tabla 10.	Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 1b con los microsomas de hígado de rata inducidos con β N con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.....	54
Tabla 11.	Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 2a con los microsomas de hígado de rata inducidos con β N con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.....	55
Tabla 12.	Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 2b con los microsomas de hígado de rata inducidos con β N con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.....	55

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Efecto del FB en el contenido de proteínas totales en microsomas de hígado de rata.....	22
Gráfica 2.	Efecto de la β N en el contenido de proteínas totales en microsomas de hígado de rata.....	23
Gráfica 3.	Efecto del FB en el contenido del CYP450 en microsomas de hígado de rata.....	25
Gráfica 4.	Efecto de la β N en el contenido del CYP450 en microsomas de hígado de rata.....	26
Gráfica 5.	Efecto de la interacción del CYP450 (FB).....	31
Gráfica 6.	Efecto de la interacción del CYP450 (β N).....	33

ABREVIATURAS

ABC:	Área bajo la curva.
AChE:	Acetilcolinesterasa.
ACN:	Acetonitrilo.
AM:	Aceite de Maíz.
βN:	β-naftoflavona.
r-Cys:	Residuo de cisteína
cm:	Centímetros.
CYP:	Citocromo.
CYP450:	Citocromo P-450.
CYP448:	Citocromo P-448.
CO:	Monóxido de carbono.
CO₂:	Dióxido de carbono.
DH-<i>p</i>-ABA:	Ácido dihidroxi- <i>p</i> -aminobenzoico.
2,3-DH-<i>p</i>-ABA:	Ácido 2,3-dihidroxi- <i>p</i> -aminobenzoico.
2,5-DH-<i>p</i>-ABA:	Ácido 2,5-dihidroxi- <i>p</i> -aminobenzoico.
EM:	Espectrometría de masas.
EA:	Enfermedad de Alzheimer.
±EEM:	Error estándar de la media.
FB:	Fenobarbital.
Fe:	Fierro.
FMN:	Flavinmononucleótido.
FAD:	Flavinadenindinucleótido.
g:	Gramos.
ΔG:	Energía libre de unión.
H⁺:	Ión hidrógeno.
HCl:	Ácido clorhídrico.
HPLC:	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
Kcal:	Kilocalorías

Kd:	Constante de disociación.
kD:	Kilodaltons.
kg:	Kilogramo.
M:	Molar.
MA:	Maleamida.
MAF:	Compuesto MA incubado en microsomas inducido con FB.
MI:	Maleimida.
MIF:	Compuesto MI incubado en microsomas inducido con FB.
min:	Minutos.
MgCl₂:	Cloruro de magnesio.
MeOH 70%:	Metanol al 70%.
mg:	Miligramos.
mL:	Mililitro.
mol:	Moles.
mM:	Milimolar.
m/z:	Relación masa-carga.
N:	Normal.
NBCO-MAF:	Blanco del compuesto MA incubado en microsomas inducido con FB.
NBCO-MIF:	Blanco del compuesto MI incubado en microsomas inducido con FB.
NBCO-SAF:	Blanco del compuesto SA incubado en microsomas inducido con FB.
NBCO-SIF:	Blanco del compuesto SI incubado en microsomas inducido con FB.
NBCO-MAN:	Blanco del compuesto MA incubado en microsomas inducido con β N.
NBCO-MIN:	Blanco del compuesto MI incubado en microsomas inducido con β N.
NBCO-SAN:	Blanco del compuesto SA incubado en microsomas inducido con β N.
NBCO-SIN:	Blanco del compuesto SI incubado en microsomas inducido con β N.
Na⁺:	Ión sodio.
NADPH:	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido.

NADP⁺:	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidado.
nm:	Nanómetros.
N₂:	Nitrógeno.
Na₂S₂O₄:	Hidrosulfito de sodio.
·OH:	Radicales hidroxilo.
O₂:	Oxígeno.
<i>p</i>-ABA:	Ácido <i>para</i> -aminobenzoico.
PDB:	Protein Data Bank (siglas en inglés).
rpm:	Revoluciones por minuto.
r²:	Coefficiente de determinación.
SSI:	Solución salina isotónica.
SA:	Succinamida.
SAF:	Compuesto SA incubado en microsomas inducido con FB.
SI:	Succinimida.
SIF:	Compuesto SI incubado en microsomas inducido con FB.
t:	Tiempo.
tr:	Tiempo de retención.
r-Tyr:	Residuo de tirosina.
μL:	Microlitros.
μM:	Micromolar.
UV-VIS:	Ultravioleta visible.
UA:	Unidades de absorbencia.

RESUMEN

El estudio de la biotransformación de fármacos *in vitro* por el citocromo P-450 (CYP450) tienen gran importancia, debido a que en algunos casos se generan metabolitos tóxicos o más activos. Se sabe que dichas enzimas son capaces de metabolizar xenobióticos lipofílicos. Por lo anterior, en este trabajo se propuso investigar la biotransformación de amidas e imidas derivadas del ácido *para*-aminobenzoico (*p*-ABA) a través del CYP450 de hígado de rata, compuestos sintetizados por nuestro grupo de trabajo. Tales compuestos presentan actividad anticolinesterásica. Esto se llevó a cabo mediante la inducción de las isoformas del CYP2B1 y CYP1A1 empleando fenobarbital (FB) y β -naftoflavona (β N) respectivamente, obteniéndose el sistema microsomal hepático, al cual se le determinó y cuantificó el contenido de CYP450 y proteínas totales. Posteriormente se llevó a cabo el análisis de la interacción de los derivados del *p*-ABA con los microsomas, así como afinidad por *docking* y la biotransformación *in vitro* en microsomas de hígado de rata.

Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo en CYP450 y proteínas totales. Además, mediante estudios de *UV-VIS* se observó que los derivados interaccionan con el sistema microsomal hepático y en las pruebas computacionales resultaron que estos compuestos podrían ser metabolizados por el CYP450, por otro lado en la biotransformación se demostró que los compuestos de maleamida y succinimida, poseen baja toxicidad probablemente porque pasan a través de la vía del CYP450 generándose el producto dihidroxi-*p*-aminobenzoico por la isoforma CYP2B1 y de esta manera ser eliminado fácilmente. Sin embargo cabe destacar que se requieren otros estudios en animal integro con el propósito de identificar si tales metabolitos generados no son tóxicos así como para investigar sus parámetros farmacocinéticos.

ABSTRACT

The study of the *in vitro* biotransformation of drugs by cytochrome P450 (CYP450) isoforms has great importance because in some cases toxic or more active metabolites are generated, producing collateral effects on the organism. It has been demonstrated that substrates that CYP450 recognizes are lipophilic xenobiotics. For this reason, in this work we proposed the use of CYP450 extracted from rat liver in order to investigate the biotransformation of amides and imides derived from *para*-aminobenzoic acid (*p*-ABA). The latter compounds, which were previously synthesized by our work group, have demonstrated anticholinesterase activity. CYP2B1 and CYP1A1 isoforms were induced by using phenobarbital and β -naftoflavone, respectively, thus obtaining a hepatic microsomal system in which the quantity of CYP450 and total hepatic proteins was determined. After that, an analysis of the interaction of the *p*-ABA derivatives with the microsomes was conducted by means of *in vitro* experiments with the hepatic microsomal system and confirmed by docking recognition studies.

The results obtained show a significant increase of CYP450 and total proteins. It was observed by UV-VIS studies that the derivatives interact with the hepatic microsomal system. Furthermore, the docking studies demonstrated that these compounds could be metabolized by CYP450. On the other hand, in the biotransformation it was shown that maleamide and succinimide have low toxicity, due to the fact that these compounds pass through the CYP450 route, generating a product of the CYP2B1 isoform, dihydroxy-*para*-aminobenzoic acid (DH-*p*-ABA), which can be easily eliminated. However, it is important to mention that further studies are necessary to provide better options than those offered by the current products on the market. The acetylcholinesterase inhibitory activity and low toxicity of MA and SI has been demonstrated, which made them favorable for their possible therapeutic application.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Marco Teórico

Una capacidad metabólica singular que los animales superiores y el ser humano han adquirido en el transcurso de la evolución, es la de metabolizar compuestos extraños para facilitar su eliminación del organismo. Estos compuestos, denominados xenobióticos, se encuentran presentes en los alimentos, en el ambiente, con lo que inevitablemente entramos en contacto. Estos compuestos suelen ser de naturaleza lipofílica, por lo que tienen una tendencia natural a acumularse en los entornos lipídicos del organismo. A diferencia de los compuestos volátiles (cuya eliminación se facilita mediante intercambio gaseoso en los pulmones) o los hidrosolubles (filtración renal), la eliminación de los compuestos lipófilos es mucho más problemática, por lo que su acumulación en el organismo puede llegar a desencadenar fenómenos de toxicidad¹.

El hígado contribuye de forma mayoritaria en la eliminación de los xenobióticos lipófilos, mediante un conjunto de reacciones, globalmente denominadas de biotransformación, en las que se modifica la estructura química de los xenobióticos para aumentar su hidrosolubilidad y así facilitar su eliminación. Intestino, pulmones, piel y riñón siguen en importancia al hígado, en cuanto a su capacidad para metabolizar xenobióticos¹.

El resultado final de la biotransformación de un xenobiótico es la formación de metabolitos que por su menor lipofilicidad son más solubles en agua, fácilmente eliminables por vía renal o biliar y por lo general, menos tóxicos. Es por ello que a estas reacciones se les denomina también reacciones de destoxificación¹.

Los fármacos son considerados xenobioticos porque una vez que son absorbidos y distribuidos a través de los fluidos corporales hasta alcanzar los tejidos y órganos diana, en donde ejercen su acción farmacodinámica específica, solo una pequeña parte alcanza el tejido/receptor/enzima diana mientras que la mayor parte sufre modificaciones químicas (biotransformación) y finalmente son eliminados. Los fármacos son susceptibles de ser metabolizados mediante las reacciones de biotransformación lo que facilita asimismo su eliminación del organismo¹.

La biotransformación de xenobióticos se realiza básicamente en 2 fases: la fase I, catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependiente del CYP450 y la fase II, en la que participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena como ácido glucorónico, sulfatos, acetato, el tripéptido glutatión o algunos aminoácidos².

El sistema de monooxigenasas es un complejo multienzimático cuya oxidasa final es una hemoproteína denominada CYP450. Este sistema se encuentra presente en diferentes tejidos como el riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y otros, pero es particularmente más activo en el hígado. Además de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, entre muchos otros, el CYP participa en el metabolismo de sustratos endógenos de importancia biológica como colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroideas y ácidos grasos. En los mamíferos, el CYP450 se encuentra presente en la mitocondria y en diversos tipos de membranas celulares, siendo particularmente abundante en el retículo endoplásmico liso².

Las enzimas del CYP en general son capaces de metabolizar compuestos lipofílicos, pero, ¿qué sucede con algunos xenobióticos que tienen polaridad media y tal vez puedan pasar desapercibidos para estas enzimas? Los comentarios siguientes se refieren a la biotransformación de estos xenobióticos y que podrían ser aplicables también al metabolismo de diversos compuestos que poseen las mismas características.

El ácido *o*-acetilsalicílico es un ejemplo de este tipo de fármacos. Cuando se ingiere, rápidamente es hidrolizado a salicilato en el organismo, generándose un conjugado con glicina, en la forma de ácido salicilúrico o con ácido glucurónico, en la forma hidroxilada como ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) o simplemente como salicilato. El ácido *o*-acetilsalicílico y el salicilato son sustancias que contrarrestan los radicales $\cdot\text{OH}$, los cuales contribuyen al daño en tejido en los sitios de inflamación. El ataque por $\cdot\text{OH}$ sobre el salicilato bajo condiciones fisiológicas produce cantidades equimolares de ácido 2,3- y 2,5-dihidroxibenzoico³.

Por otro lado, en investigaciones pasadas se ha empleado la descarboxilación oxidativa con ácido benzoico para evaluar la producción de $\cdot\text{OH}$ en fagocitos y durante la reacción de la xantina oxidasa. Esto llevó a realizar estudios del benzoato como una prueba para la detección de $\cdot\text{OH}$ generados por otros sistemas biológicos. Estas investigaciones condujeron a la caracterización de la capacidad de los microsomas de hígado de rata para descarboxilar el ácido benzoico durante el transporte de electrones dependiente de NADPH. Esta descarboxilación lleva a la producción de CO_2 y parece ser que resulta de una interacción del benzoato con $\cdot\text{OH}$ que es generado durante el transporte de electrones microsomales⁴.

Lo anterior se puede aplicar a ciertos compuestos que han sido sintetizados por nuestro grupo de trabajo. Tales compuestos (Figura 1) tienen polaridad media, y son derivados del *p*-ABA. Una de sus aplicaciones es como inhibidores de la enzima AChE. Por lo tanto podrían ser útiles en el tratamiento paliativo de la Enfermedad de Alzheimer (EA), una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central⁵.

Recientemente la AChE ha captado la atención como blanco de fármacos para el tratamiento de esta enfermedad, campo en el que constantemente se desarrollan nuevos compuestos que sean de alta potencia y baja toxicidad; además estos compuestos podrían ser empleados en el íleo paralítico, miastenia gravis, glaucoma de ángulo abierto, entre otros⁶.

Por esta razón en este trabajo fue importante continuar con los estudios de los cuatro derivados del *p*-ABA que actúan como inhibidores de la AChE, realizándoles un estudio de biotransformación *in vitro* catalizadas por el CYP450 de hígado de rata y poder contribuir al diseño de nuevas moléculas que ofrezcan una alternativa para el tratamiento de las patologías mencionadas anteriormente.

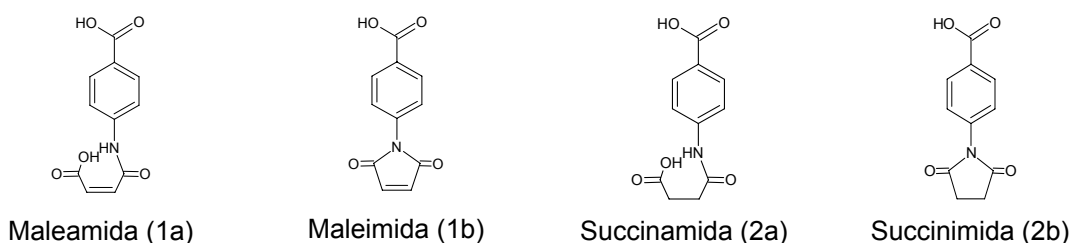


Figura 1. Compuestos sintetizados con polaridad media derivados del *p*-ABA.

Lo anterior con el propósito de identificar si estos compuestos podrían ser sustratos de tales enzimas.

1.2. Antecedentes

1.2.1. CYP450

El citocromo P-450 (CYP450) es una familia de hemoproteínas que tienen como característica un átomo de azufre (amarillo) proveniente de un residuo de cisteína ligado en posición axial a un átomo de hierro (Fe, punto azul) del grupo prostético hemo (Figura 2), éste tiene cuatro anillos pirrólicos unidos al Fe, el cual se encuentra en su estado oxidado (Fe^{+3}) y predomina la configuración de bajo spin^{7,8}.



Figura 2. Estructura del CYP450

El CYP450 lleva a cabo la oxidación o reducción de una amplia variedad de compuestos tanto exógenos como endógenos, la reacción por la cual oxida diversos compuestos es la siguiente:



En dicha reacción sólo uno de los átomos de oxígeno molecular es transferido por la enzima al sustrato, por lo cual a todas estas enzimas se les ha denominado monooxigenasas. Éstas participan en el metabolismo de una gran variedad de compuestos mediante diversas reacciones las cuales hacen que el fármaco sea más polar y con esto eliminarse fácilmente u originar sustancias más activas metabólicamente o generarse metabolitos tóxicos⁹⁻¹¹.

Las reacciones de biotransformación de los fármacos se clasifican en reacciones de funcionalización (fase I) y/o de biosíntesis o conjugación (fase II). Las primeras introducen o exponen un grupo funcional del fármaco original y por lo regular, terminan en la pérdida de la actividad biológica. Si no se excretan con rapidez por la orina, los productos de las reacciones de fase I pueden conjugarse vía enzimática con compuestos endógenos y así formar un complejo más hidrosoluble (fase II)¹².

Las reacciones de conjugación involucran la formación de un enlace covalente entre un grupo funcional de un compuesto original o metabolito de fase I, con sustancias endógenas como: ácido glucurónico, sulfato, glutatión, aminoácidos o acetato¹².

Estos conjugados fuertemente polares suelen ser inactivos y se excretan por orina y heces. Por lo general, la conversión metabólica de los fármacos es llevada a cabo por los sistemas enzimáticos que se encuentran en el hígado. Otros órganos con notable habilidad metabólica son el sistema gastrointestinal, riñones y

pulmones. Gran parte de la actividad farmacometabolizante reside en el retículo endoplásmico y el citosol, aunque también pueden efectuarse biotransformaciones en mitocondrias, cubierta nuclear y membrana plasmática. Con la homogenización y la centrifugación diferencial de tejidos se rompe el retículo endoplásmico liso y los fragmentos de la membrana forman microvesículas, llamadas microsomas¹².

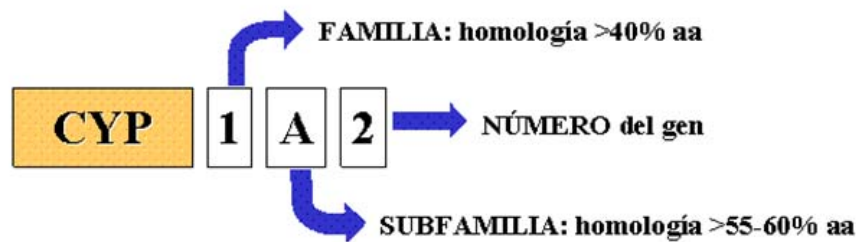
Las enzimas del CYP450 se comenzaron a estudiar desde 1955 cuando se aislaron y caracterizaron del retículo endoplásmico liso de hígado de rata y se demostró que pueden oxidar diversos compuestos^{13,14}. Esto se llevó a cabo mediante la inducción del CYP450 que condujo a un aumento en la concentración de la proteína/enzima en el órgano blanco y en este sentido se refiere específicamente a un aumento en la cantidad de proteína del gen que lo codifica debido a un incremento en la velocidad de transcripción. Esto se fundamenta en la activación de un factor de transcripción nuclear mediado por el inductor. Cabe mencionar que al emplear un inductor no conduce al aumento de la expresión de una sola enzima sino que también se incrementa los niveles de expresión de un conjunto de éstas que pueden actuar simultáneamente en determinado proceso metabólico⁷.

Mediante estos estudios se reportó la existencia de un pigmento localizado en microsomas de hígado de rata y cerdo que unido al CO, originaba un espectro de absorción *UV-vis* en 450 nm, de ahí la denominación CYP450 dado que proviene de la característica de esta hemoproteína en su forma reducida unida al CO^{15,16}.

Dentro de estas investigaciones se reportaron diferentes isoformas de CYP450, al comparar sus propiedades espectrales y funcionales, extraídas de ratas testigo y de ratas tratadas con 3-metilcolantreno. Este inductor enzimático aumentó la capacidad catalítica del CYP450 sobre sustratos específicos, esto generó indicios de la multiplicidad de éste, es decir, de diferentes isoformas¹⁷⁻²¹.

Las diferentes isoformas del CYP450 se han clasificado en diversas familias y subfamilias con base en la secuencia homóloga de estos, para ello se ha creado una nomenclatura internacional que consiste en usar las primeras letras del citocromo CY (por sus siglas en inglés), la P (peak) haciendo referencia al pico característico para estas enzimas y 450 por la longitud de onda en nm a la cual absorben (CYP450)²².

Esta nomenclatura es para todos los miembros de la superfamilia, seguido por un número arábigo para la familia y una letra capital para la subfamilia, después de esta última va un segundo número arábigo que describe la isoforma particular, siendo el gen que la codifica (Figura 3)²³.



Isoenzimas del Citocromo P450

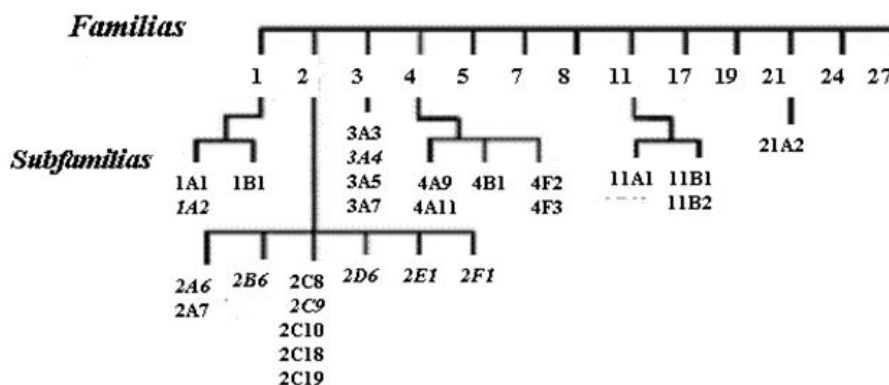


Figura 3. Nomenclatura y clasificación de los principales CYP en humanos.

En el ser humano existen 16 familias y 29 subfamilias, con un total de unos 50 genes CYP identificados. Los genes pertenecientes a las familias 1, 2 y 3, son los que están implicados, de manera más directa, en el metabolismo de los fármacos. En concreto, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4 son responsables del metabolismo de la gran mayoría de los fármacos actualmente en uso clínico (figura 3)²⁴.

El ciclo catalítico de CYP450 implica varias etapas sucesivas. Comienza por la incorporación del xenobiótico al centro catalítico de la enzima que tiene el átomo de Fe del grupo prostético hemo, en estado oxidado (Fe^{+3}) el xenobiótico provoca el desplazamiento de la molécula de agua y el cambio de spin del hierro de un estado de bajo spin a uno de alto spin. Con ello el hierro pasa de un estado hexacoordinado a uno pentacoordinado. La catálisis por el CYP450 tiene requerimiento absoluto del CYP450 reductasa dependiente de NADPH, este último suministra el electrón necesario para la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} . Es en ese momento, cuando el oxígeno molecular entra en el centro catalítico de la enzima asociándose al grupo hemo. El electrón del Fe^{+2} es transferido a la molécula de oxígeno. Un segundo electrón ingresa a través del citocromo b_5 , permitiendo reducir parcialmente a la molécula de oxígeno unida, que junto con un H^+ , libera uno de sus átomos en forma de H_2O . El otro átomo de oxígeno, todavía unido al centro catalítico, oxida al xenobiótico que allí se encuentra. Para posteriormente ser liberado de la enzima. El Fe^{+2} se oxida a Fe^{+3} y la enzima puede iniciar ahora un nuevo ciclo de catálisis (Figura 4)²⁵⁻²⁹.

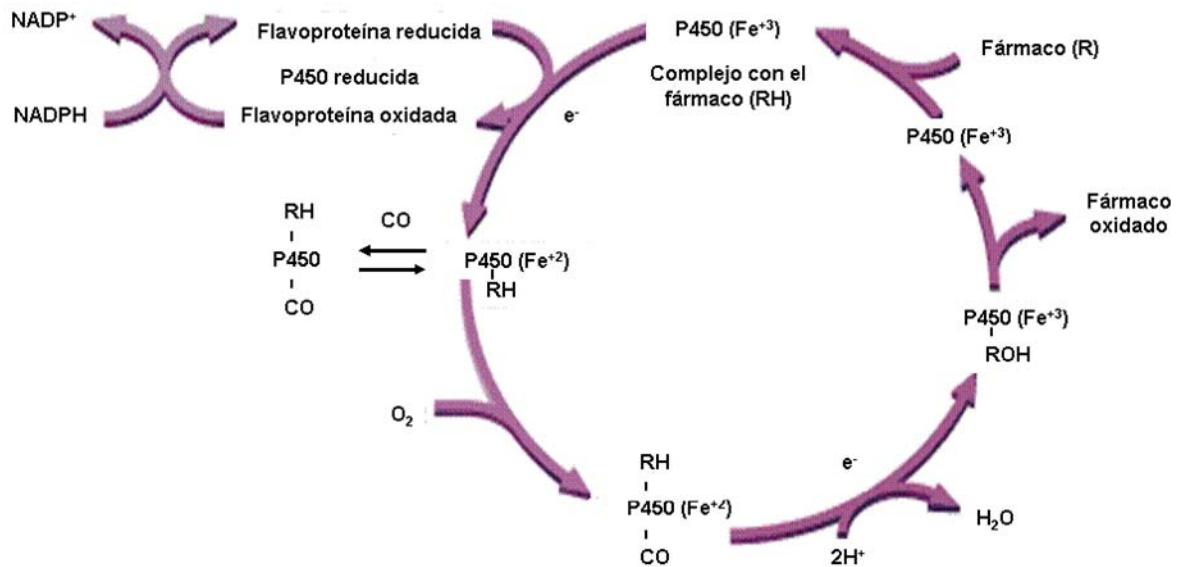


Figura 4. Ciclo catalítico del CYP-450.

1.2.1. Biotransformación del ácido benzoico

Estudios que se han llevado a cabo sobre la descarboxilación oxidativa del ácido benzoico a través de microsomas de hígado de rata, han demostrado que durante el metabolismo se produce CO_2 , el cual es el resultado de la interacción del benzoato con los radicales $\cdot\text{OH}$ o especies reactivas con poder oxidante y que estos se generan durante el transporte de electrones cuando se lleva a cabo el ciclo catalítico del CYP450 dependiente de NADPH³⁷⁻³⁹.

Con estos resultados se generó el mecanismo de cómo el benzoato se descarboxila a través de los microsomas de hígado de rata mediante la producción de radicales $\cdot\text{OH}$, por lo que se llegó a deducir que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es el precursor de los radicales $\cdot\text{OH}$ en los sistemas biológicos. Esta producción de radicales $\cdot\text{OH}$ es generado durante el transporte de electrones cuando se lleva a cabo el ciclo catalítico del CYP450 dependiente de NADPH, el

cual es la vía en donde se produce el H₂O₂ cuando el NADPH es oxidado por el NADPH-citocromo P450 reductasa³⁷⁻³⁹.

Otros estudios, usando el benzoato como prueba para detección de radicales [•]OH generados por los sistemas biológicos dependientes de NADPH cuando se lleva a cabo el ciclo catalítico del CYP450 en microsomas, se observó la descarboxilación por la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno⁴⁰⁻⁴³. Por otro lado, en otras investigaciones se logró demostrar que el benzoato es capaz de inhibir la oxidación de los alcoholes en los microsomas de hígado de rata, esto se llevó a cabo en un sistema en el cual los alcoholes dependían directamente de la interacción con los radicales [•]OH generados metabólicamente, logrando encontrar que los microsomas de hígado de rata son capaces de catalizar la descarboxilación del benzoato⁴⁴⁻⁴⁶.

1.2.1.2. Biotransformación del ácido acetilsalicílico

El ácido O-acetilsalicílico es ampliamente empleado como analgésico y a grandes dosis para el tratamiento de la artritis reumatoide. También es considerado como agente profiláctico contra la trombosis vascular. Sin embargo, se tiene conocimiento que cuando se ingiere el ácido O-acetilsalicílico es rápidamente hidrolizado a salicilato en el organismo, éste es excretado como conjugado de glicina en forma de ácido salicilúrico o con ácido glucurónico, en forma hidroxilada como ácido gentísico (ácido 2, 5-dihidroxibenzoico) o simplemente como salicilato (Figura 5)^{47,48}.

Estos productos son formados por la producción de los radicales anión superóxido (O₂^{• -}) y del H₂O₂, el cual da como resultado el radical [•]OH generado por los sistemas biológicos dependientes de NADPH cuando se lleva a cabo el ciclo catalítico del CYP450 en microsomas de hígado de rata. De esta manera, se demostró que el ácido O-acetilsalicílico en presencia de microsomas de hígado se

convierte en 2,3 ó 2,5-dihidroxibenzoato. Siendo los microsomas capaces de metabolizarlo, a pesar de ser un fármaco relativamente polar ^{49,50}.

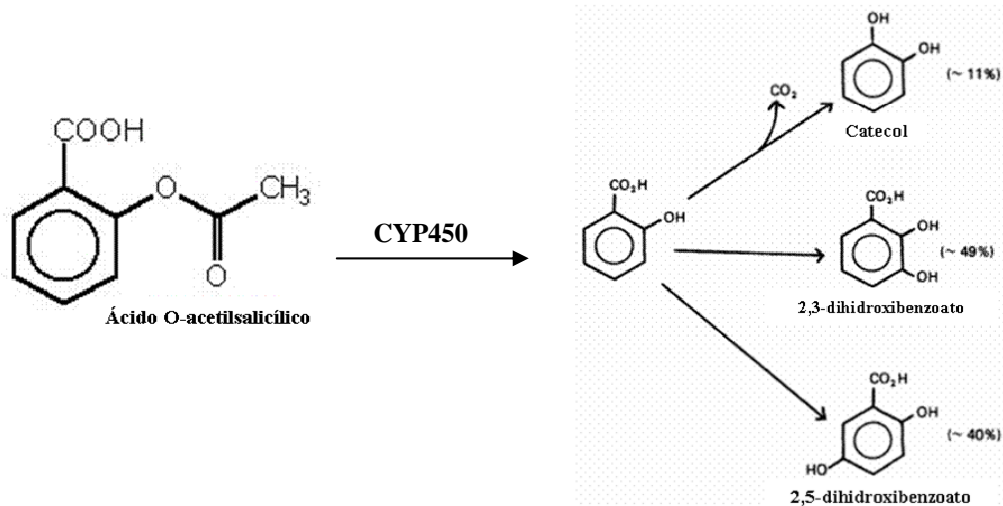


Figura 5. Biotransformación del ácido acetilsalicílico.

1.3. Compuestos derivados del ácido *p*-aminobenzoico

1.3.1. Estudios de los compuestos derivados del ácido *p*-aminobenzoico

El descubrimiento de nuevas moléculas farmacológicamente activas y su desarrollo farmacéutico, son los dos procesos importantes para el surgimiento de nuevos medicamentos⁵¹.

En la actualidad, los métodos tradicionales de obtención de nuevos fármacos se complementan con la comprensión de las bases moleculares e interacciones que están detrás de una enfermedad, permitiendo la elección de una molécula blanco sobre la que actuará el fármaco⁵¹.

Es así como la búsqueda de nuevos fármacos, se ha dirigido, en parte a la síntesis. Tomando como prototipo las estructuras químicas de los sustratos

naturales, tal es el caso de los cuatro compuestos derivados del *p*-ABA que actúan como inhibidores de la AChE^{5,51}.

Esta enzima ha sido blanco de muchos fármacos debido a la importancia que tiene, ya que participa en diferentes funciones. Entre las más importantes destaca en la EA, en la cual la AChE termina una señalización colinérgica por una rápida hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, otras enfermedades en la que participa es en la enfermedad del ilio paralítico, miastenia gravis, glaucoma de ángulo abierto, etc⁵. Es por ello que nuestro grupo de trabajo del Laboratorio de Investigación de Bioquímica Médica, de la ESM se ha enfocado al diseño de nuevas moléculas que ofrezcan una alternativa en el tratamiento paliativo de estas enfermedades.

Dentro de los estudios realizados para estas nuevas moléculas se encuentran los estudios de *docking* e *in vitro* e *in vivo*, que han demostrado buenos resultados en potencia inhibitoria y baja toxicidad⁵. Es por ello que se pretende seguir con el estudio y poder contribuir al diseño de nuevas moléculas que ofrezcan una alternativa en algún tratamiento paliativo.

1.4. Estudios espectrales de interacción de fármacos con el CYP450

Desde 1966 se ha conocido que varios xenobióticos producen cambios en la absorbencia en microsomas de hígado, así como diferencia en los espectros de UV-VIS. También se han reportado cambios espectrales en mitocondria adrenal y en muchos tejidos^{30,31}.

La pregunta que se ha formulado desde hace mucho tiempo es, ¿cómo un sustrato puede interactuar con el CYP450 con un alto grado de especificidad?. La respuesta es, que estudios previos han demostrado la presencia de cambios

espectrales con el CYP450 el cual es influenciado por diferentes tipos de agentes inductores (FB, benzopirenos, 3-metilcolantreno)^{32,33}.

En base a estos estudios se formuló la hipótesis de que un sólo CYP de microsomas de hígado es capaz de interactuar con dos diferentes tipos de sustratos causando una modificación en las propiedades espectrales de la hemoproteína oxidada o reducida, así como también lo produce el CO al unirse con la hemoproteína. Estos cambios espectrales indican la interacción del sustrato con la enzima, representando la unión primaria. Esto llevó a realizar innumerables experimentos para examinar la influencia de los sustratos sobre el CYP, modificando los patrones del metabolismo de fármacos en microsomas de hígado^{32,33}.

Estas diferencias en los espectros han llevado a encontrar una variedad de características, que finalmente son clasificados en tres grupos. Un cambio espectral de tipo I se caracteriza por un pico en 385 y 420 nm. Otro cambio espectral de tipo I reversa, el cual es una imagen en el espejo del cambio espectral de tipo I, tiene la característica de un pico con un $\lambda_{\text{máx}}$ en 420 nm y un λ_{min} en 385 nm y la última clasificación de cambio espectral es la de tipo II que se caracteriza por tener una longitud de onda entre 390 y 410 nm y un pico que varía entre 425 y 435 nm³²⁻³⁴.

1.5. Estudios de Docking con el CYP450

En el diseño de fármacos, es basado en métodos computacionales ha permitido que el valor predictivo de las técnicas de modelado molecular tuviera grandes cambios en los últimos años identificándose el progreso en tres etapas. En la primera etapa los cálculos se limitaban a investigaciones en las que las estructuras químicas eran consideradas como cuerpos rígidos y cuya finalidad era establecer una posible interacción entre moléculas. A finales de los años setenta

las disponibilidades de herramientas computacionales habían crecido de tal forma que ya era posible hacer cálculos sobre aproximaciones más avanzadas, esto a través de la dinámica molecular. En la búsqueda por obtener cada vez mejores resultados, se inició a mediados de los ochenta la tercera etapa del modelado molecular, caracterizada por la aplicación detallada de los cálculos de energías libres³⁵.

El conocimiento de la topografía de una molécula y sus interacciones en el medio biológico marcaron el inicio de la bioquímica y biofísica estructural. El reconocimiento molecular por computadora o “*docking*” es un método de simulación teórico que permite la interacción entre un fármaco potencial y la molécula blanco en este caso la enzima CYP2B4 cristalizada, donde las estructuras tridimensionales tanto del fármaco como de la enzima, entran en contacto con el propósito de identificar los sitios de unión y la estereoquímica, necesarios para el diseño de nuevos fármacos³⁶. Por lo que es importante conocer de qué manera estos compuestos 1a, 1b, 2a y 2b pueden unirse a la enzima del CYP450 y con esto inferir hipotéticamente si es posible que sean o no metabolizados por dicha enzima o bien inhibirla.

2. JUSTIFICACIÓN

Existen antecedentes que los compuestos 1a, 1b, 2a y 2b derivados del *p*-ABA han demostrado que actúan como inhibidores de la enzima AChE mediante estudios de Docking e *in vitro*, por lo que para poder contribuir al diseño de nuevas moléculas que ofrezcan una alternativa en el tratamiento de alguna enfermedad, es importante investigar si se biotransforman a través de reacciones *in vitro* catalizadas por el CYP450 de hígado de rata, con lo cual se podrá determinar si se generan metabolitos activos o inactivos.

3. HIPÓTESIS

Dado que los compuestos 1a, 1b, 2a y 2b a estudiar presentan semejanza estructural con el salicilato y el ácido benzoico (Figura 6); y conociendo que estos ácidos son biotransformados por el sistema microsomal de hígado de rata, principalmente por las isoformas 2B1 y 1A1 mediante reacciones de hidroxilación y descarboxilación, se propone que los compuestos estudiados presentarán una biotransformación microsomal hepática semejante, generándose 4 metabolitos por dos posibles vías (Figura 7).

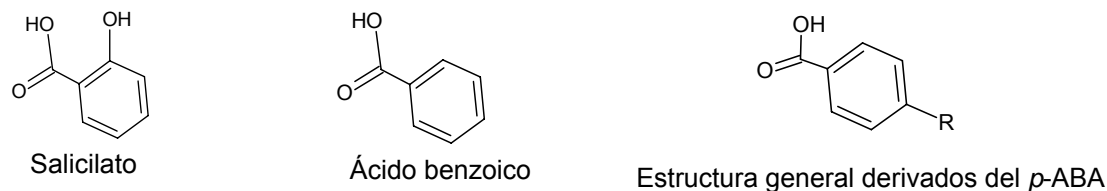


Figura 6. Comparación estructural del salicilato y el ácido benzoico con los compuestos propuestos.

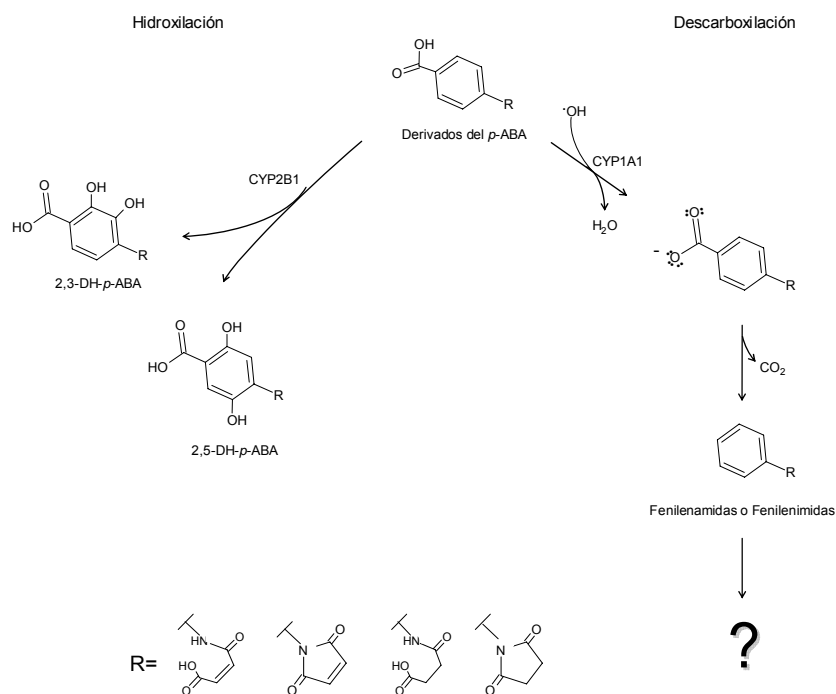


Figura 7. Vía de biotransformación propuesta para los cuatro derivados del *p*-ABA a través del CYP450.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Determinar si los compuestos derivados del *p*-ABA son biotransformados a través del CYP450 e identificar y cuantificar los metabolitos.

4.2. Específicos

- Inducir isoformas del CYP450 con FB y β N en ratas macho de la cepa Wistar.
- Obtener el sistema microsomal hepático.
- Cuantificar el contenido de proteínas totales.
- Cuantificar el contenido de CYP450.
- Determinar mediante pruebas espectrales la interacción de los compuestos derivados del ácido *p*-aminobenzoico con los microsomas hepáticos.
- Determinar mediante *docking* la interacción de los derivados del ácido *p*-aminobenzoico con el CYP450.
- Determinar la biotransformación de los cuatro compuestos en el sistema microsomal.
- Cuantificar los metabolitos obtenidos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Identificar los metabolitos obtenidos mediante espectrometría de masas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Obtención del CYP450

5.1.1. Obtención de microsomas

Para inducir las isoformas del CYP450, se emplearon ocho grupos de diez ratas de la cepa Wistar con un peso de 180-220 g. A dos grupos se les administró FB (80 mg/kg) usando como vehículo SSI, vía intraperitoneal durante 4 días, a otros dos grupos se les administró β N (80 mg/kg) usando como vehículo AM, vía intraperitoneal durante 4 días y los cuatro grupos restantes fueron empleados como testigos a los cuales se le administró 2 mL/kg de SSI o AM. Los animales se sacrificaron al quinto día de tratamiento realizando la extracción y disección del hígado^{9,19,52,53}.

Para la obtención de los microsomas, se extrajo el hígado, se mantuvo en hielo y se homogeneizó con 20 mL de sacarosa 0.25 M. A partir de este homogeneizado la fracción microsomal se obtuvo por una modificación del método de Manno y Rezzadore (1991). El homogeneizado se centrifugó a 8500 rpm durante 16 min a 4°C utilizando una centrifuga Hettich Zentrifugen Universal 32R. Al sobrenadante se le adicionó cloruro de calcio hasta alcanzar una concentración final de 8 mM, se agitó y se centrifugó a 13500 rpm durante 23 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y los microsomas contenidos en el precipitado se resuspendieron en una solución de KCl 0.15 M, se agitó y centrifugó nuevamente a 13500 rpm por 23 min a 4 °C. Finalmente, los microsomas se resuspendieron en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 con 20% de glicerol y se almacenaron a -80 °C⁵⁴.

5.1.2. Determinación del contenido de proteínas

Se empleó el método de Lowry, utilizando albúmina sérica de bovino para la curva estándar empleando un factor de dilución de 6⁵⁵.

5.1.3. Determinación del contenido de CYP450

Una vez obtenidos los microsomas se realizó la determinación del contenido de CYP450 por el método descrito por Omura y Sato (1964)^{56,57}. Se hizo una dilución 1:10 de cada preparación microsomal en buffer de fosfatos 0.1 M y pH 7.4. Se adicionaron 90 mg de Na₂S₂O₄ y se agitó vigorosamente, se tomó una alícuota de 3 mL la cual sirvió de testigo y el resto se burbujeó con CO. Se realizó la lectura correspondiente en un espectrofotómetro *UV-vis* Perkin Elmer, la presencia de CYP450 se demostró por el pico de absorbencia característico a una longitud de onda de 450 nm para el caso de los microsomas de hígado de rata tratadas con FB y 448 nm para las tratadas con βN. Para calcular la cantidad de CYP450 se empleó un coeficiente de extinción de 91 mM⁻¹ cm⁻¹^{56,57}.

5.2. Evaluación de los derivados del ácido *p*-aminobenzoico con el CYP450

5.2.1. Estudios de *docking* de los derivados del ácido *p*-amino benzoico con el CYP2B4

La simulación de *docking* se realizó con la estructura tridimensional del CYP2B4 de conejo (código del PDB: 2bdm), para identificar el mecanismo de reconocimiento y afinidades entre la proteína CYP2B4 y sus ligandos, en donde la estructura de los compuestos fueron dibujados en el programa ChemDraw Ultra 10.0. Estos fueron realizados en computadora mediante el programa

AutoDockTools versión 1.4.3. Estos experimentos computacionales fueron realizados con la colaboración del Dr. José Correa Basurto, Profesor-Investigador adscrito en el departamento de Farmacología de esta misma escuela.

5.2.2. Estudios espectrales de los derivados del ácido *p*-aminobenzoico con el CYP450.

Para determinar la interacción de los compuestos con las isoformas correspondientes se hizo una preparación de los microsomas de hígado de rata tratadas con FB o con β N llevándolo a una concentración de 2 mg/mL de proteína en buffer de fosfatos 0.1 M y pH 7.4 con 20% de glicerol. A 6 mL se adicionaron 90 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ y se agitó vigorosamente, se tomó una alícuota de 3 mL la cual sirvió de testigo y el resto se burbujeó con CO y se le adicionó los compuestos 1a, 1b, 2a o 2b a una concentración de 0.033mM. Se realizó la lectura correspondiente en un espectrofotómetro *UV-VIS* Perkin Elmer, la interacción se demostró por la disminución del pico de absorbencia característico a una longitud de onda de 450 nm para el caso de los microsomas de hígado de rata tratadas con FB y 448 nm para las tratadas con β N⁵⁸.

5.2.3. Biotransformación de los derivados del ácido *p*-amino benzoico con los microsomas hepáticos

Para llevar a cabo la biotransformación de los compuestos, se mezclaron 1a, 1b, 2a o 2b con 3 mM de MgCl_2 y 2 mM de NADPH con microsomas de hígado de rata tratadas con FB o con β N en un volumen final de 1 mL de buffer de fosfatos 0.1M y pH 7.4. La mezcla de reacción fue incubada a 37°C con agitación constante a diferentes tiempos y se finalizó con la adición de 500 μ L de HCl 0.01N, terminada la reacción se centrifugó a 10500 rpm a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se extrajo con acetato de etilo y se recuperó la fase orgánica, la cual se secó con

N₂. Finalmente, las muestras se concentraron con MeOH 70% hasta un volumen de 1.5 mL y se almacenaron a -80°C hasta su análisis^{3,4}.

5.3. Identificación de metabolitos

Para la identificación de los metabolitos las muestras se analizaron por EM. Las muestras se inyectaron en un espectrómetro de masas marca Waters. La técnica empleada fue ionización por electrospray positivo, obteniéndose los patrones de fragmentación de cada compuesto y sus respectivos productos. En cada espectro de masas se graficó el porcentaje de abundancia relativa (%) con respecto a la relación m/z de cada uno de los fragmentos correspondientes a los distintos compuestos estudiados^{3,4,58}.

5.4. Cuantificación de metabolitos

La cantidad de los compuestos biotransformados, se cuantificó mediante HPLC marca Waters con una columna de separación Symmetry C₁₈ y detector de UV-VIS, el cual se fijó a una longitud de onda de 281 nm para la MA, 246 nm para la MI, 259 nm para la SA y 228 nm para la SI. La velocidad de flujo fue de 0.5 mL/min. Después de probar varios tipos de fase móvil, se determinó que la más adecuada era de 90% de buffer de fosfatos a una concentración de 0.1M y pH 7.4 y 10% de ACN, debido al grado de polaridad de los compuestos. En cada cromatograma de HPLC se graficó el valor de absorbencia dado en UA con respecto tr de cada compuesto, el cual está dado en minutos^{3,4,58}.

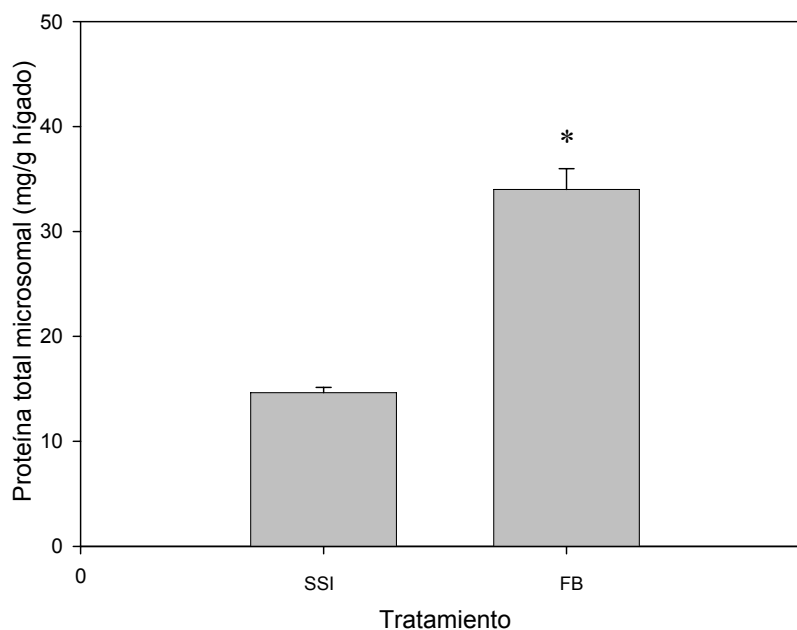
5.4. Análisis estadístico

Los resultados del contenido de proteínas y de CYP450 se realizó por el método de t de student. En todos los casos un valor de P<0.05 se considero para establecer diferencias estadísticamente significativas con una n=10 y N=20, en ambos casos.

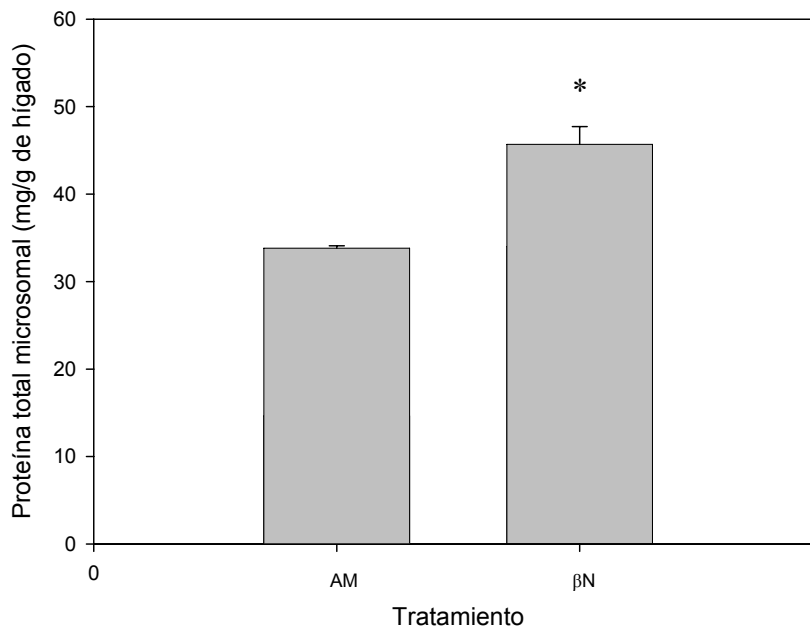
6. RESULTADOS

6.1. Cuantificación de proteínas totales

El efecto de inducción del FB y la β N en el hígado de rata se muestra en las gráficas 1 y 2 respectivamente, en donde se observa el incremento del contenido de proteínas en los microsomas de hígado de rata. Se demostró que hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) al comparar los valores de la media de los grupos de ratas tratadas con los inductores con sus correspondientes testigos.



Gráfica 1. Efecto del FB en el contenido de proteínas totales en microsomas de hígado de rata. Cada barra representa el promedio de \pm EEM de una $n=10$ y una de $N=20$ de experimentos. * $P < 0.05$. SSI=14.641 mg de proteína/g de hígado \pm 1.121 vs FB=34.005 mg de proteína /g de hígado \pm 4.406



Gráfica 2. Efecto del β N en el contenido de proteínas totales en microsomas de hígado de rata. Cada barra representa el promedio de \pm EEM de una $n=10$ y una de $N=20$ de experimentos. * $P<0.05$. AM=33.808 mg de proteína /g de hígado \pm 0.586 vs β N=45.686 mg de proteína /g de hígado \pm 4.729

6.2. Identificación y cuantificación de CYP450

En la figura 8 se muestra el espectro de *UV-VIS* de los microsomas obtenidos de hígado de rata tratada con FB y con el vehículo de SSI, los cuales representan la presencia de CYP450 y la diferente cantidad de esta enzima. Observándose el pico de absorción en 450 nm.

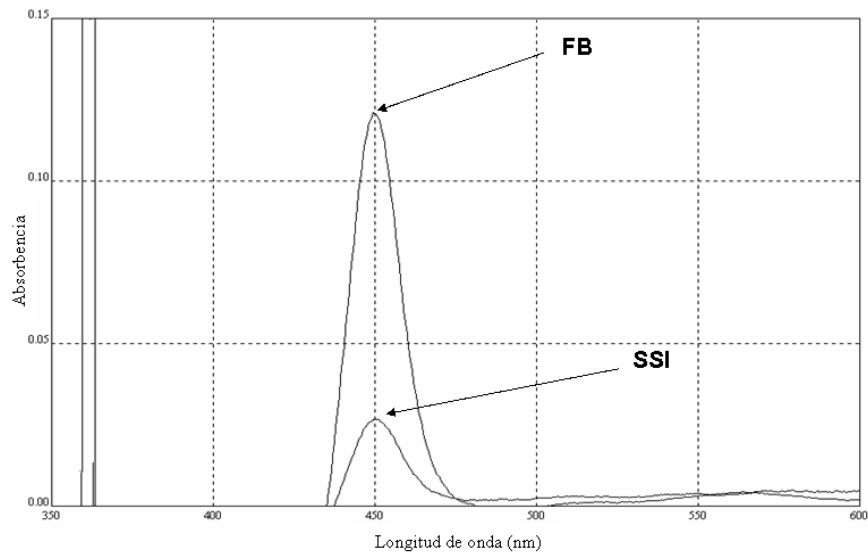


Figura 8. Pico característico del CYP450, cuando se ha reducido y tratado con CO, en microsomas de hígado de rata tratadas con FB y no tratadas.

En la figura 9 se muestra el espectro de *UV-VIS* de los microsomas obtenidos de hígado de rata tratada con β N y con el vehículo de AM, los cuales representan la presencia de CYP450 y la diferente cantidad de esta enzima. Observándose el pico de absorción en 448 nm para los microsomas inducidos, mientras que para los microsomas testigos es en 450 nm.

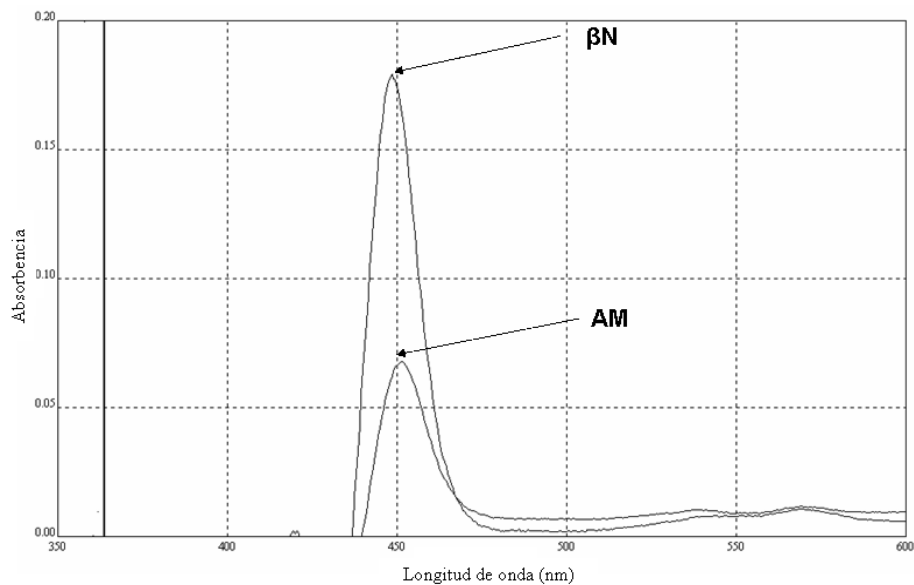
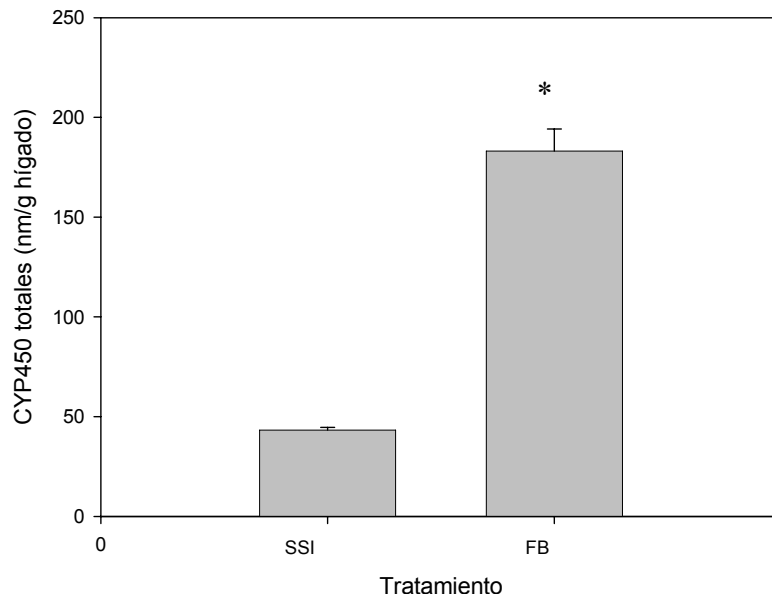
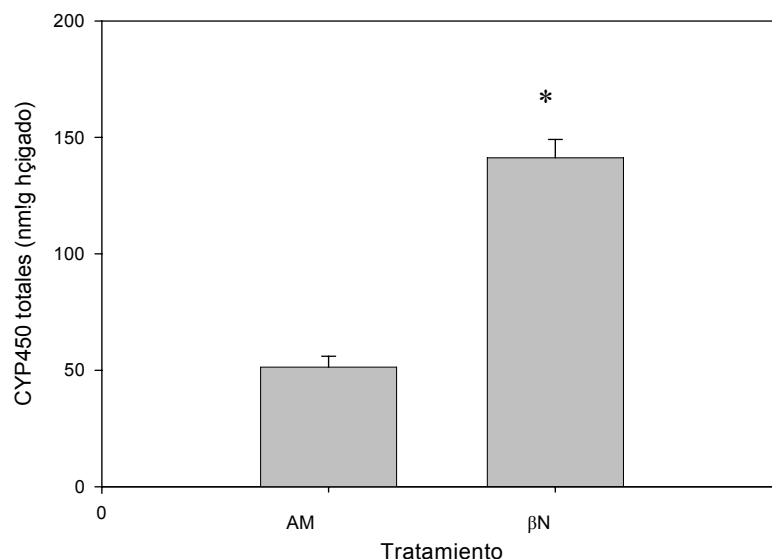


Figura 9. Pico característico del CYP448, cuando se ha reducido y tratado con CO, en microsomas de hígado de rata tratadas con β N y no tratadas.

El efecto de inducción del FB y la β N en el hígado de rata se muestra en las gráficas 3 y 4 respectivamente, en donde se observa el incremento del contenido de CYP450 en los microsomas de hígado de rata. Se demostró que hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) al comparar los valores de la media de los grupos de ratas tratadas con los inductores con sus correspondientes testigos. En ambas gráficas se presentan los valores de \pm EEM de cada grupo.



Gráfica 3. Efecto del FB en el contenido del CYP450 en microsomas de hígado de rata. Cada barra representa el promedio de \pm EEM de una $n=10$ y una de $N=20$ de experimentos. * $P < 0.05$. SSI=43.251 nmol/g de hígado \pm 3.075 vs FB=183.112 nmol/g de hígado \pm 24.662.



Gráfica 4. Efecto de la β N en el contenido del P450 en microsomas de hígado de rata. Cada barra representa el promedio de \pm EEM de una $n=10$ y una de $N=20$ de experimentos. * $P<0.05$. AM=51.338 nmol/g de hígado \pm 10.504 vs β N=141.254 nmol/g de hígado \pm 17.677.

6.3. Docking de los derivados del ácido *p*-aminobenzoico con el CYP 2B4

La tabla 1 resume los resultados de *docking*, en donde aparecen las energías libres de unión enzima-sustrato obtenidas de los cálculos teóricos realizados entre la enzima 2B4 y sus ligandos, es decir, se evaluó la actividad de dicha enzima sobre sus ligandos. En donde se obtuvo una buena relación de afinidad con los ligandos (K_D) y los ΔG calculados. En las figuras 10, 11, 12 y 13 se muestran los modelos de interacción predichos por el programa VMD.

Tabla 1. Comparación entre la K_D y la energía libre de unión enzima-sustrato de los cuatro compuestos evaluados.

Compuesto	K_D (μ M)	ΔG (kcal/mol)
1a	2.77×10^{-7}	- 8.94
1b	5.37×10^{-6}	- 7.19
2a	1.23×10^{-7}	- 9.42
2b	6.15×10^{-6}	- 7.11

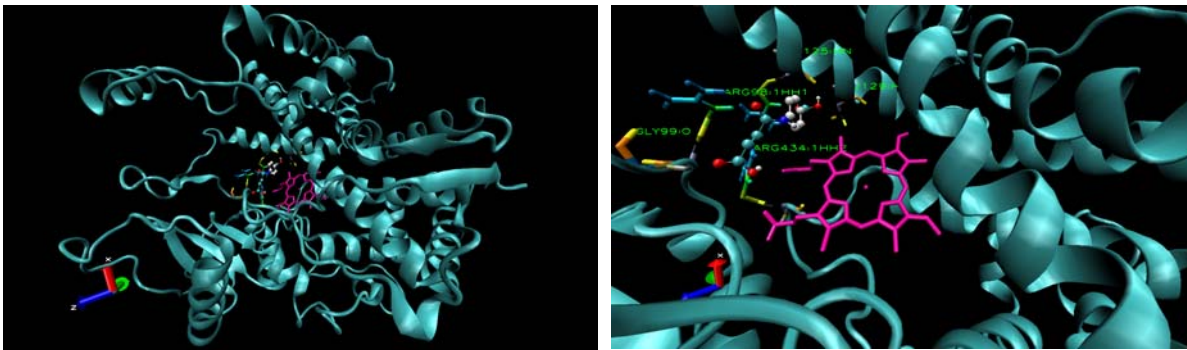


Figura 10. Modelo obtenido por *docking* del compuesto 1a con el CYP2B4. En la imagen de la izquierda se muestra la interacción de la enzima con el ligando y en la derecha con los residuos más representativos.

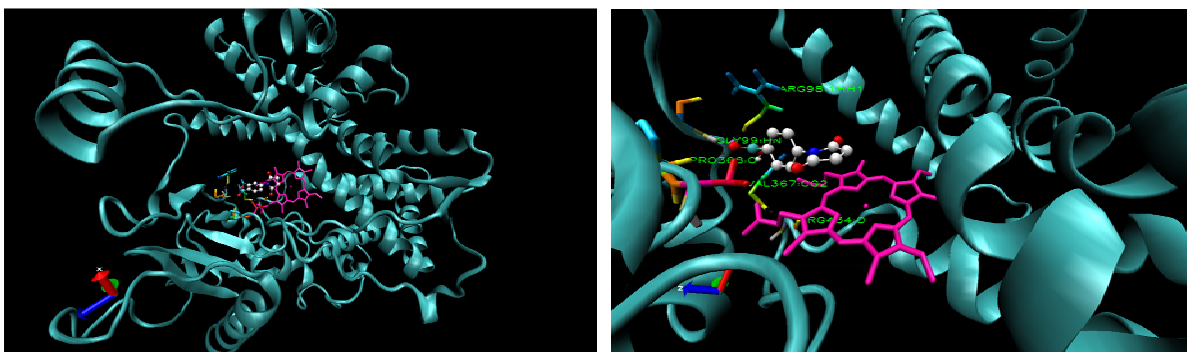


Figura 11. Modelo obtenido por *docking* del compuesto 1b con el CYP2B4. En la imagen de la izquierda se muestra la interacción de la enzima con el ligando y en la derecha con los residuos más representativos.

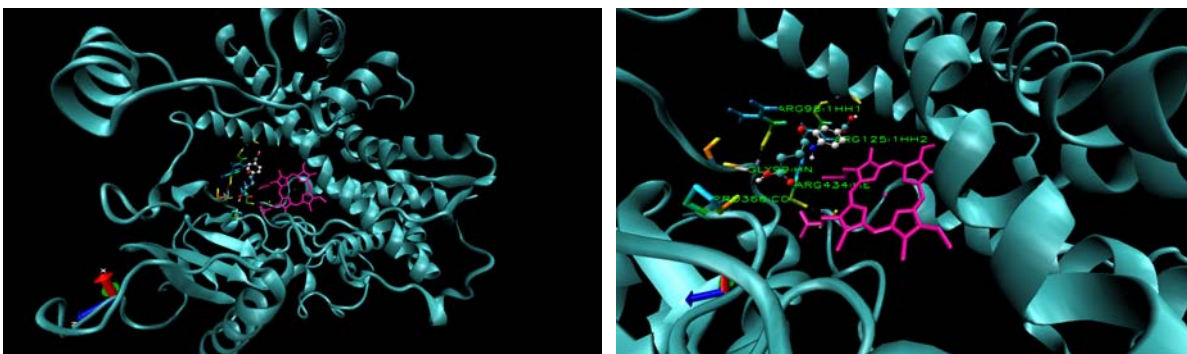


Figura 12. Modelo obtenido por *docking* del compuesto 2a con el CYP2B4. En la imagen de la izquierda se muestra la interacción de la enzima con el ligando y en la derecha con los residuos más representativos.

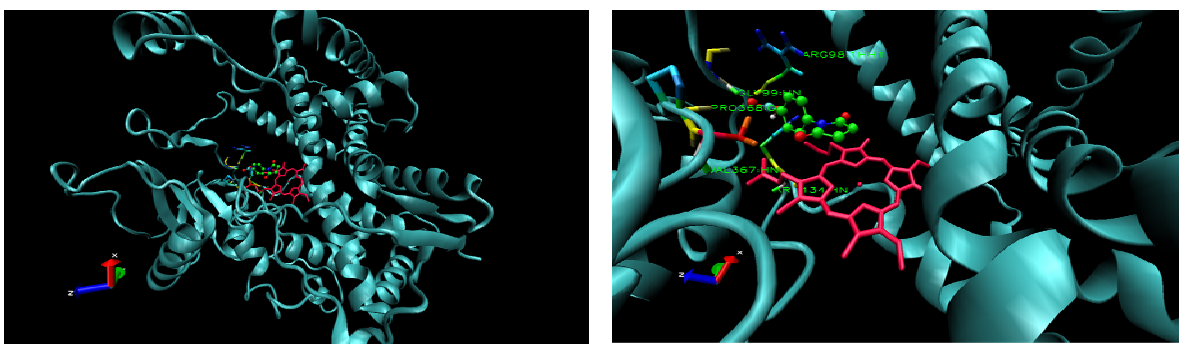


Figura 13. Modelo obtenido por *docking* del compuesto 2b con el CYP2B4. En la imagen de la izquierda se muestra la interacción de la enzima con el ligando y en la derecha con los residuos más representativos.

6.4. Interacción de los derivados del ácido *p*-aminobenzoico con los microsomas hepáticos

En las figuras 14, 15, 16 y 17 se muestran los espectros de absorción *UV-vis* de cada uno de los derivados del *p*-ABA, en los cuales se observan las longitudes de onda a la cual absorben, esto se realizó con la finalidad de descartar alguna posibilidad de que el compuesto esté dando los espectros de absorción del CYP.

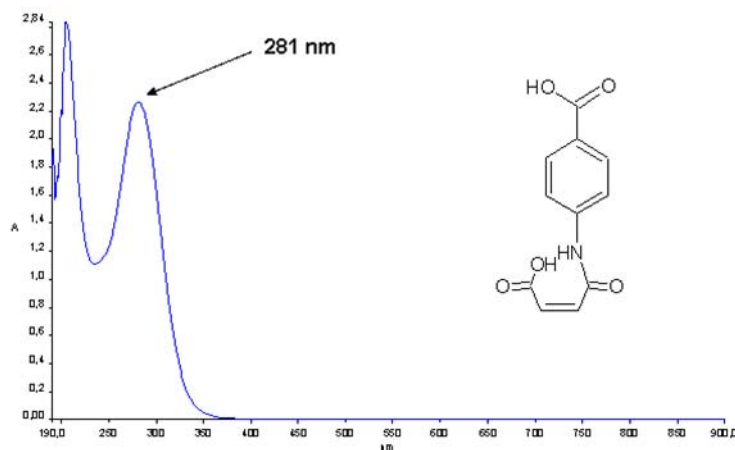


Figura 14. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 1a.

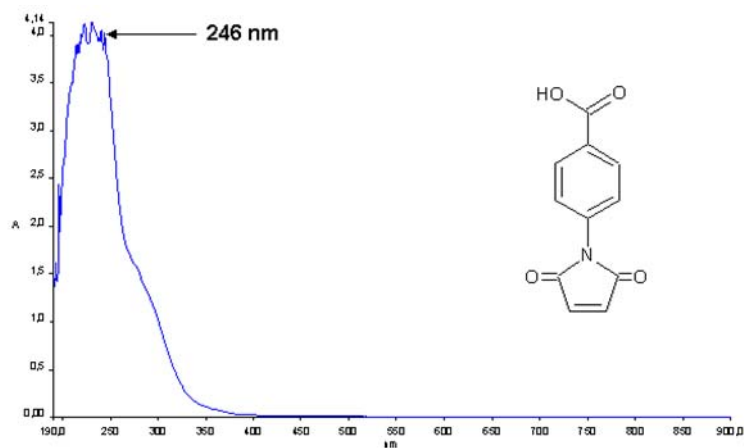


Figura 15. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 1b.

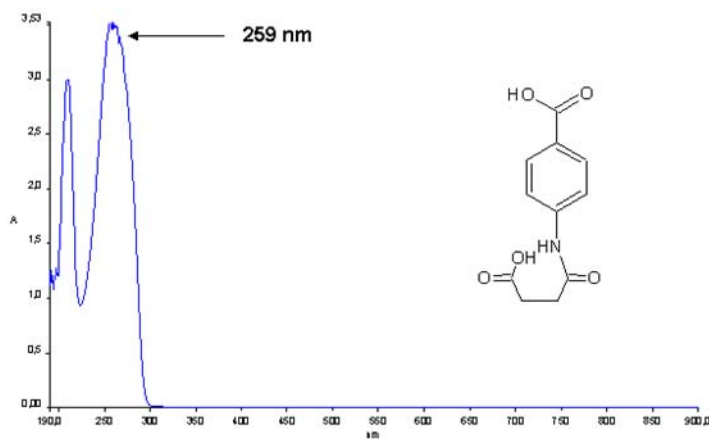


Figura 16. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 2a.

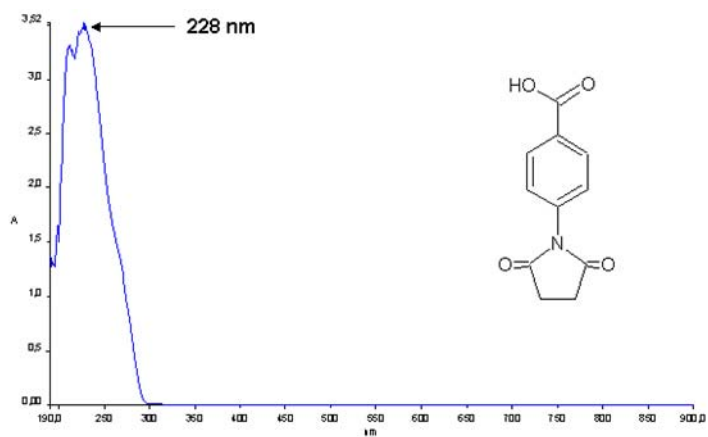


Figura 17. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 2b.

En las figuras 18, 19, 20 y 21 se muestran los espectros de *UV-vis* de los microsomas obtenidos de hígado de rata tratada con FB interaccionando con los compuestos 1a, 1b, 2a y 2b, observándose los picos de absorción en 450 nm, los cuales representan la presencia de CYP450 y la unión enzima-ligando con la disminución del pico de absorción.

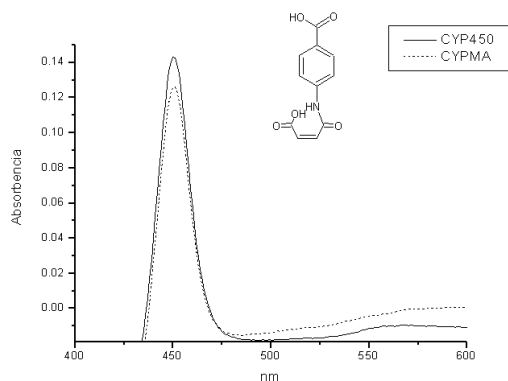


Figura 18. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 1a interaccionando con los microsomas de hígado de rata pretratada con FB

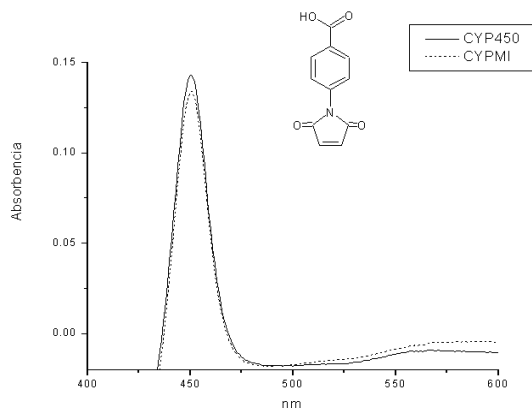


Figura 19. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 1b interaccionando con los microsomas de hígado de rata pretratada con FB

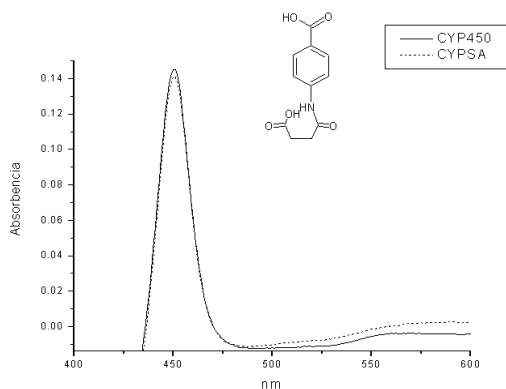


Figura 20. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 1b interaccionando con los microsomas de hígado de rata pretratada con FB

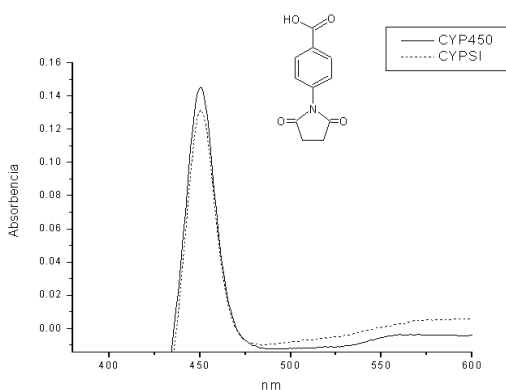
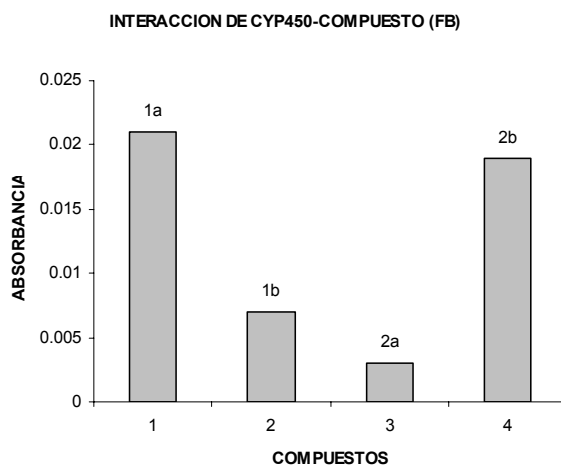


Figura 21. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 2b interaccionando con los microsomas de hígado de rata pretratada con FB



Gráfica 5. Efecto de la interacción del CYP450 con los compuestos en microsomas de hígado de rata. Cada barra representa el promedio de \pm EEM de una $n=10$ y una de $N=20$ de experimentos. * $P>0.05$.

En las figuras 22, 23, 24 y 25 se muestran los espectro de *UV-vis* de los microsomas obtenidos de hígado de rata tratada con β N interaccionando con los compuestos 1a, 1b, 2a y 2b, observándose los picos de absorción en 448 nm, los cuales representan la presencia de CYP450 y la unión enzima-ligando con la disminución del pico de absorción.

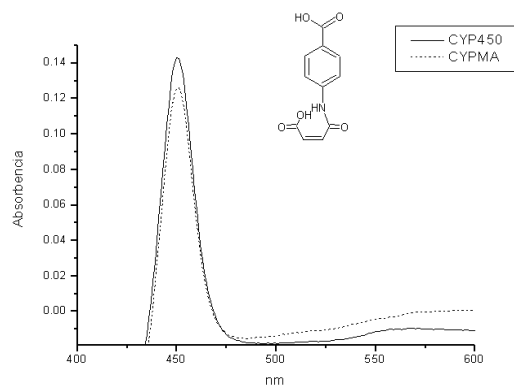


Figura 22. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 1a interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con β N.

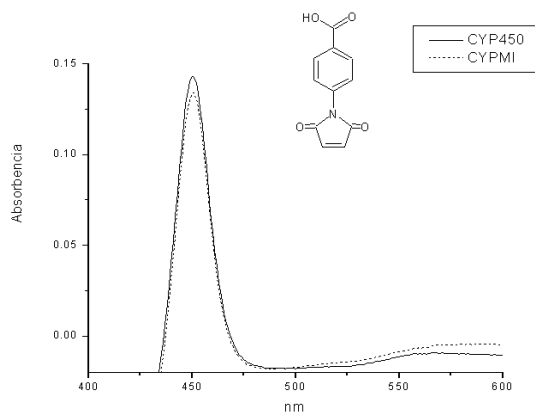


Figura 23. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 1b interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con β N.

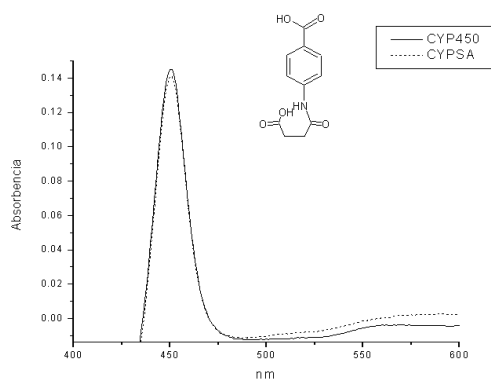


Figura 24. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 2a interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con β N.

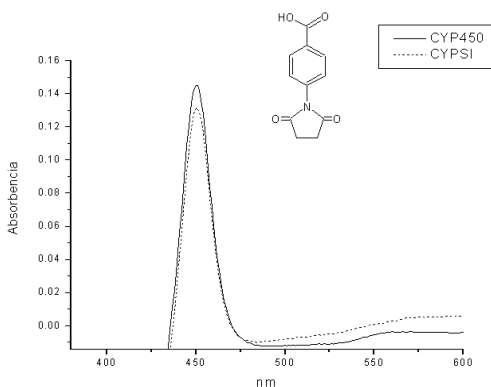
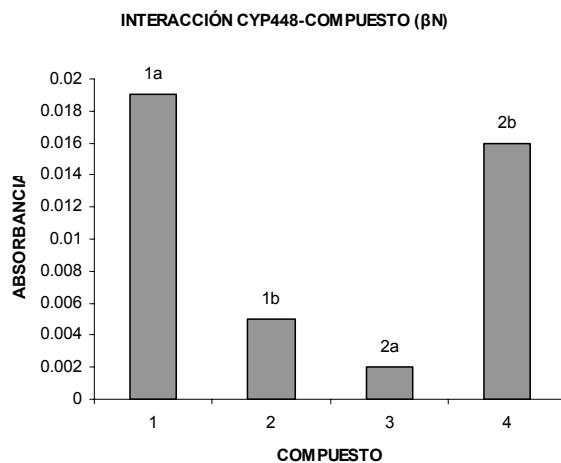


Figura 25. Espectro de absorción *UV-vis* del compuesto 2b interaccionando con los microsomas de hígado de rata tratada con β N.



Gráfica 6. Efecto de la interacción del CYP450 con los compuestos en microsomas de hígado de rata. Cada barra representa el promedio de \pm EEM de una $n=10$ y una de $N=20$ de experimentos. * $P>0.05$.

Como se puede apreciar en cada una de las figuras anteriores los compuestos derivados del *p*-ABA lograron interactuar con los microsomas al observarse la disminución del pico de absorción, según la concentración de 33 μ M, por lo que es evidente que los compuestos tienen cierta afinidad con los microsomas de hígado de rata tratadas con FB. Asimismo se observó la misma respuesta con los microsomas de hígado de rata tratadas con β N.

6.5. Identificación de metabolitos

Para realizar la identificación de metabolitos primero se realizó el espectro de masas de los compuestos de referencia. En las figuras 26, 27 28 y 29 se muestran los espectros de masas que representan el patrón de fragmentación de los compuestos 1a, 1b, 2a y 2b, cuyos pesos moleculares son: 235.2, 217.2, 237.2 y 219.2, en donde el fragmento de los compuestos aparecen con una *m/z* de 236.194, 218.146, 238.078 y 220.166 respectivamente.

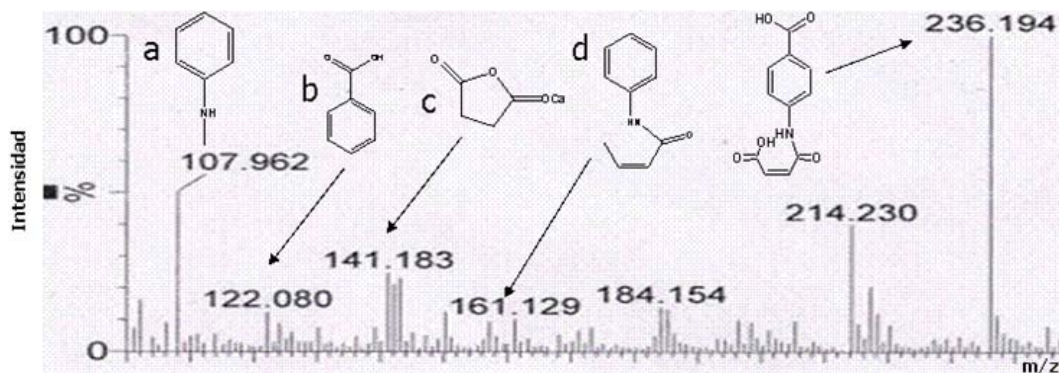


Figura 26. Espectro de masas del compuesto 1a.

Los fragmentos obtenidos a partir del compuesto 1a se muestran en la figura 26 en donde a, b, c y d corresponden a N-metilánilina, ácido benzoico, aducto de anhídrido succínico, (Z)-N-fenilbuten-2-amida respectivamente.

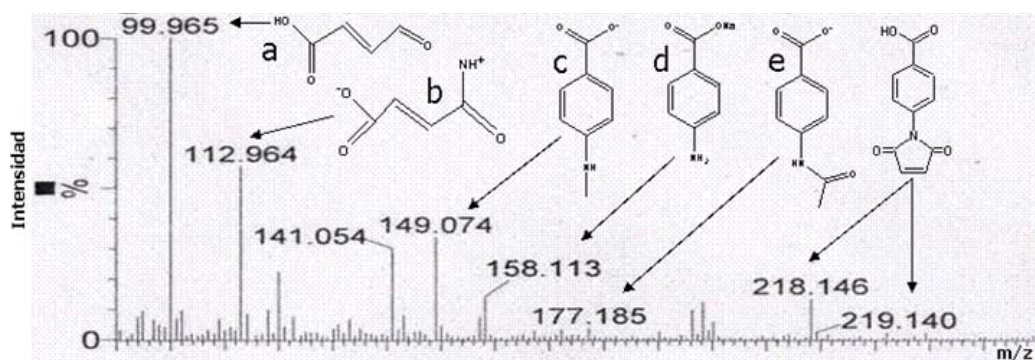


Figura 27. Espectro de masas del compuesto 1b.

La figura 27 muestra los fragmentos obtenidos del compuesto 1b en donde a, b, c, d y e corresponden a furan-2,5-diona, (E)-4-amino-4-oxobuten-2-ato, 4-(metilamino)benzoato, 4-aminobenzoato de sodio y 4-acetamidobenzoato, respectivamente.

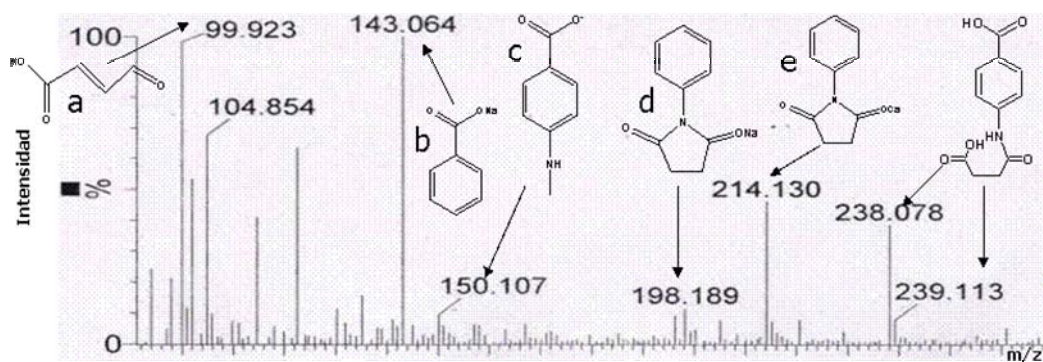


Figura 28. Espectro de masas del compuesto de 2a.

La figura 28 muestra los fragmentos obtenidos del compuesto 2a en donde a, b, c, d y e corresponden a furan-2,5-diona, benzoato de sodio, 4-(metilamino) benzoato, 1-fenilpirrolidina-2,5-diona- sal de sodio, furan-2,5-diona- sal de calcio, respectivamente.

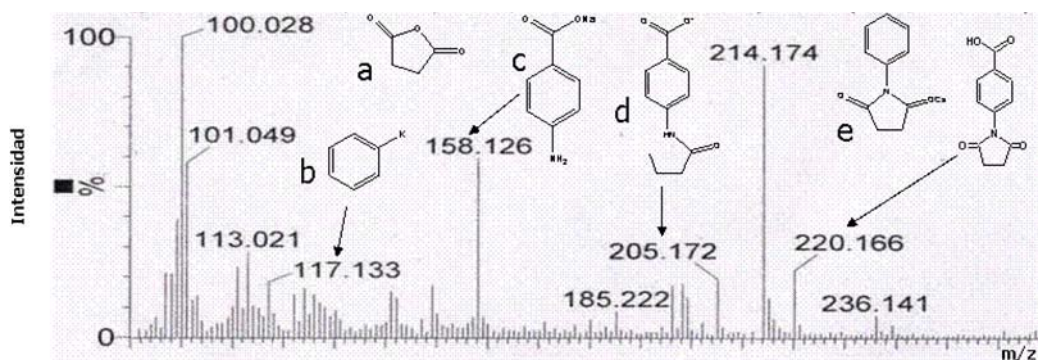


Figura 29. Espectro de masas del compuesto de 2b.

La figura 29 muestra los fragmentos obtenidos del compuesto 2b en donde a, b, c, d y e corresponden al anhídrido succínico, fenilpotasio, 4-aminobenzoato de sodio, 4-butiramidobenzoato, 1-fenilpirrolidina-2,5-diona- sal de calcio, respectivamente. Posteriormente se procedió a identificar los metabolitos, producto de la incubación de los compuestos 1a, 1b, 2a y 2b con los microsomas de hígado de rata tratada con FB. En las figuras 30, 31, 32 y 33 se muestran los espectros de masas que representan la fragmentación de los metabolitos que se obtuvieron de la biotransformación de CYP450 inducidos con FB.

Con respecto al compuesto 1a, (Figura 30) se observa el patrón de fragmentación del metabolito 4-(3-carboxy-2-(1-mercapto-3-oxopropan-2-ylamino)acrylamido)benzoato con una relación m/z de 337.156, así como también observamos otro fragmento que corresponde al DH-*p*-ABA formando aducción con el Na⁺, cuyo peso molecular es de 288 y el fragmento que aparece con una relación m/z de 288.264 y los otros fragmentos corresponden a residuos del sistema microsomal empleado.

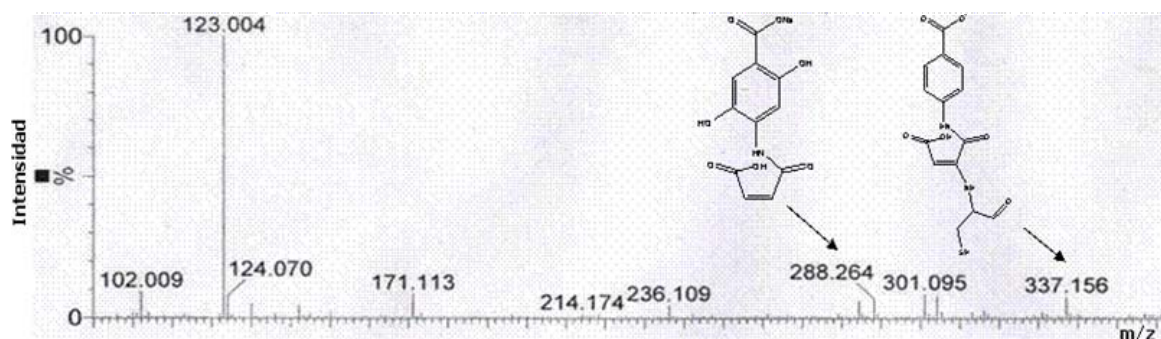


Figura 30. Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 1a con microsomas de hígado de rata tratada con FB.

En las figuras 31 y 32, se observan los patrones de fragmentación partiendo de los compuestos 1b y 2a, en donde se aprecia que no corresponden a ningún metabolito en particular, lo que indica la presencia de residuos de microsomas, cofactores (NADPH y MgCl₂) e impurezas provenientes de los compuestos estudiados.

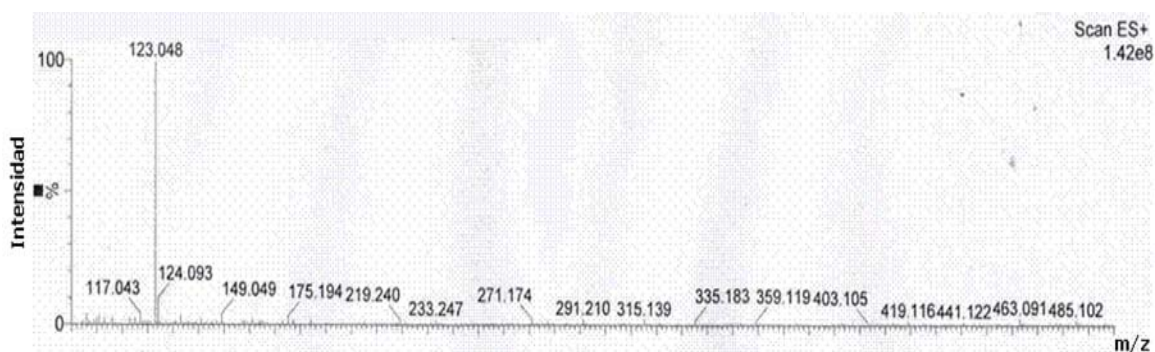


Figura 31. Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 1b con microsomas de hígado de rata tratada con FB.

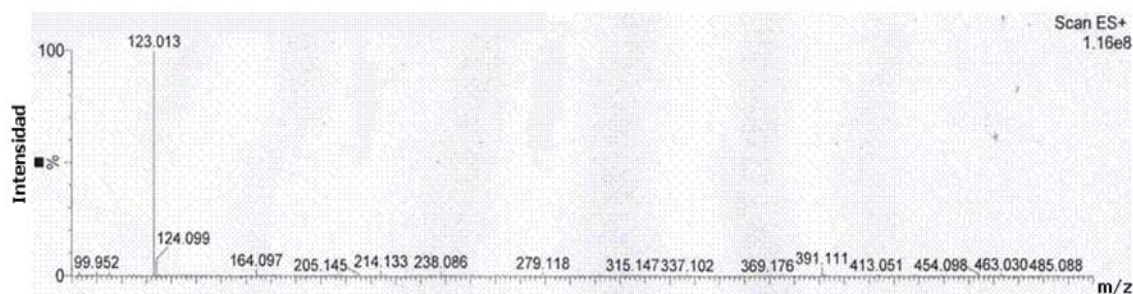


Figura 32. Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 2a con microsomas de hígado de rata tratada con FB.

Respecto al compuesto 2b, se puede observar (Figura 33) el patrón de fragmentación del metabolito de glucosa, cuyo peso molecular es de 180.164 así como también observamos otro fragmento con una m/z de 93 y el fragmento que aparece es con una relación m/z de 93.003, que corresponde a la anilina y los otros fragmentos son residuos del sistema microsomal empleado.

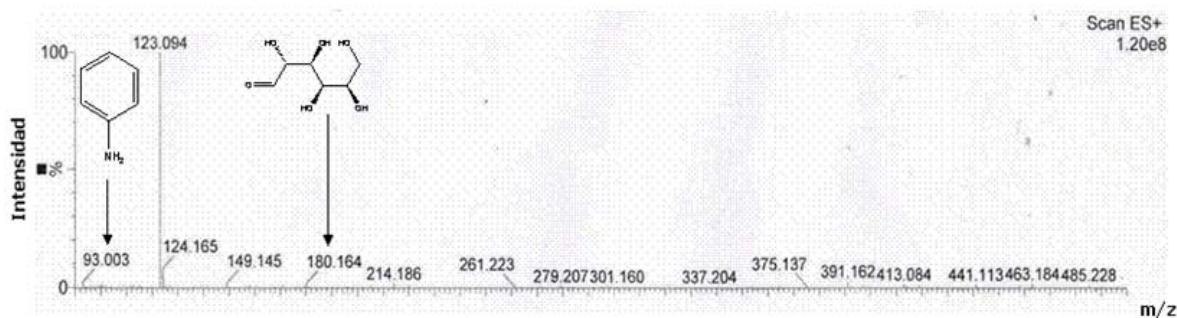


Figura 33. Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto de 2b con microsomas de hígado de rata tratada con FB.

Luego se procedió a la identificación de los otros metabolitos, producto de la incubación de los compuestos 1a, 1b, 2a y 2b con los microsomas de hígado de rata tratada con β N. En las figuras 34, 35, 36 y 37 se muestran los espectros de masas que representan la fragmentación que se obtuvo de la biotransformación. En la figura 34 se observa que a partir del compuesto 1a se obtuvo el patrón de fragmentación del metabolito ácido 4-(3-carboxi-2-(1-mercapto-3-oxopropan-2-ilamino)acrilamido)benzoico con una relación m/z de 338.185, así como también observamos otro fragmento que corresponde al DH-*p*-ABA formando aducción con el Na^+ , cuyo peso molecular es de 288 y el fragmento que aparece es con una relación m/z de 288.292 y los otros fragmentos corresponden a residuos del sistema microsomal empleado.

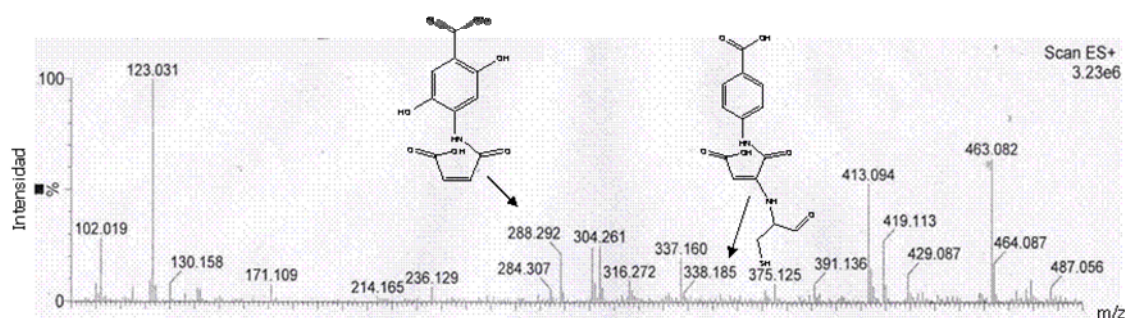


Figura 34. Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 1a con microsomas de hígado de rata tratada con β N.

Con respecto al compuesto 1b, se observa (Figura 35) el patrón de fragmentación del metabolito 4-(3-(1-(4-hidroxifenil)-3-oxopropan-2-ylamino)-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-yl) benzoato con una relación m/z de 379.161 y los otros fragmentos son residuos del sistema microsomal empleado.

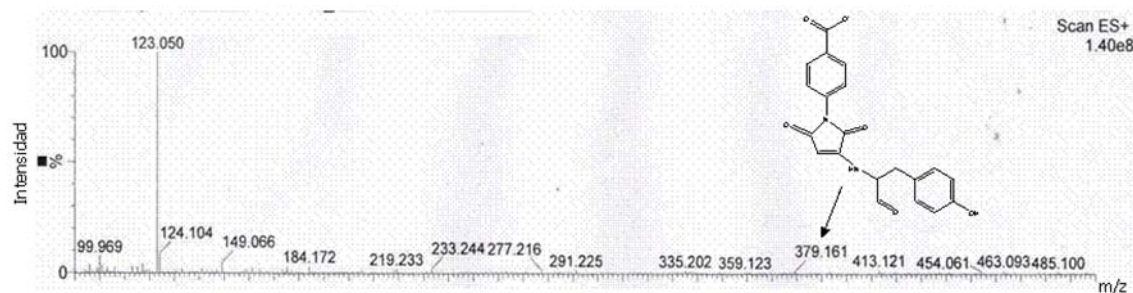


Figura 35. Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 1b con microsomas de hígado de rata tratada con β N.

En la figura 36 partiendo del compuesto 2a, se muestra el patrón de fragmentación del metabolito de fenilenamida, cuyo peso molecular es de 173 y el fragmento que aparece tiene una *m/z* de 173.586 y los otros fragmentos corresponden a residuos del sistema microsomal empleado.

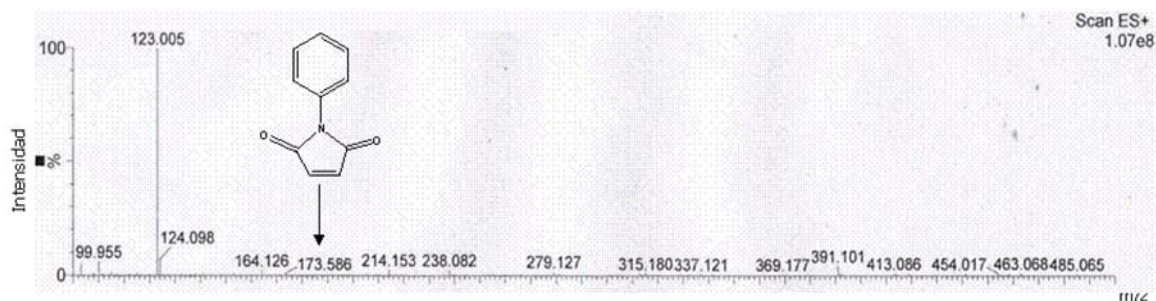


Figura 36. Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 2a con microsomas de hígado de rata tratada con β N.

Y finalmente, respecto al compuesto 2b se observa (Figura 37) una relación *m/z* de 221.178 que corresponde al compuesto de SI derivado del *p*-ABA y los otros fragmentos son residuos del sistema microsomal empleado.

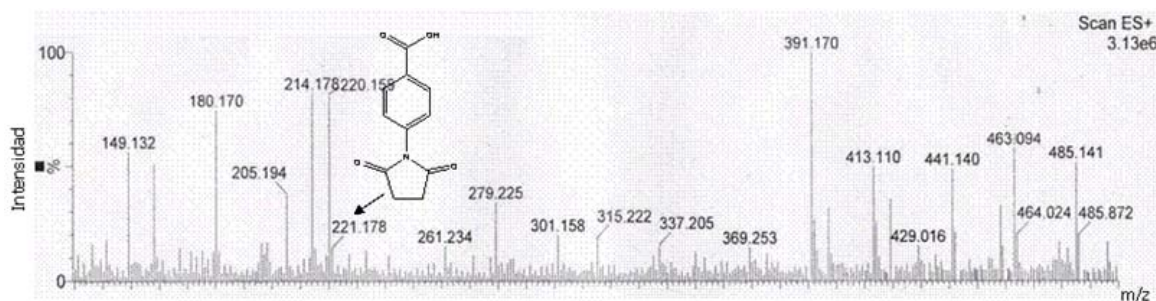


Figura 37. Espectrograma de los metabolitos obtenidos a partir de la incubación del compuesto 2b con microsomas de hígado de rata tratada con β N.

6.6. Cuantificación de metabolitos

La cuantificación de los metabolitos se realizó en HPLC, el cual se fijó a la longitud de onda de cada compuesto. La velocidad de flujo fue de 0.5 mL/min. Después de probar varios tipos de fase móvil se determinó que la más adecuada era de 95% de buffer de fosfatos y 5% de acetonitrilo, debido al grado de polaridad de los compuestos 1a, 1b, 2a y 2b y a que hubo mayor separación con los picos de absorbencia, los cuales se identificaron al tener tiempo de retención diferentes con respecto a los sustratos. Primero se determinaron las condiciones para conocer el

tiempo al cual eluyen los compuestos, obteniéndose el tiempo de retención para cada uno de ellos. Las condiciones que se manejaron se muestran en la tabla 2 y los tiempos de retención se muestran en la tabla 3. En cada cromatograma de HPLC se graficó el valor de absorbencia con respecto al tr de cada compuesto, el cual está dado en minutos.

Tabla 2. Parámetros obtenidos para analizar los compuestos

Condiciones para el análisis	
Fase móvil:	Buffer de fosfatos : Acetonitrilo 95:5
Flujo:	0.5 mL/min
Vol. de inyección:	10 µL

Tabla 3. Datos obtenidos de los derivados del *p*-ABA

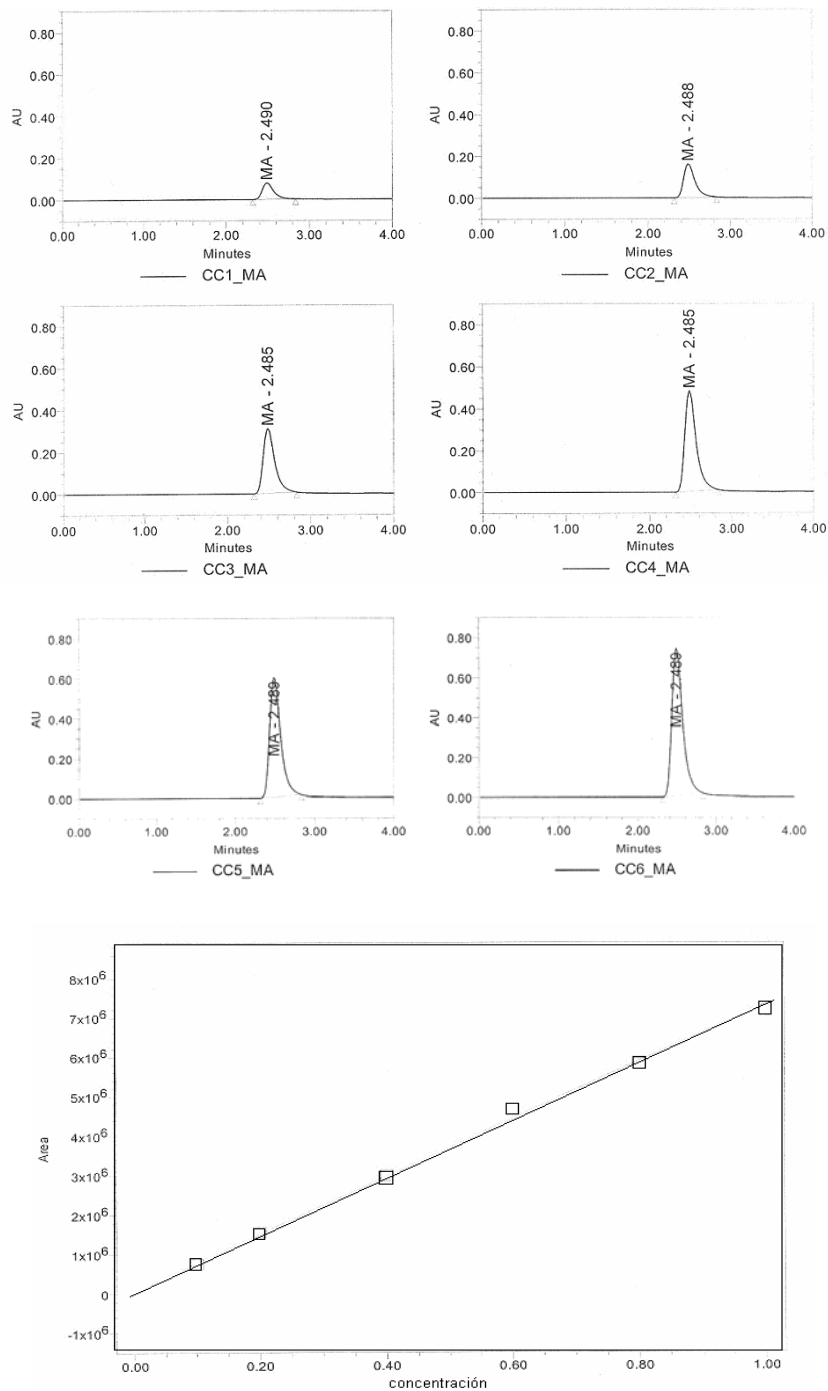
Derivados del <i>p</i>-ABA	tr (min)
1a	2.488
1b	2.484
2a	2.776
2b	3.793

Una vez obtenidos los tr se realizó la curva de calibración para cada uno de los compuestos con concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mM, calculándose la r^2 , como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Datos obtenidos de la curva de calibración de cada uno de los derivados del *p*-ABA

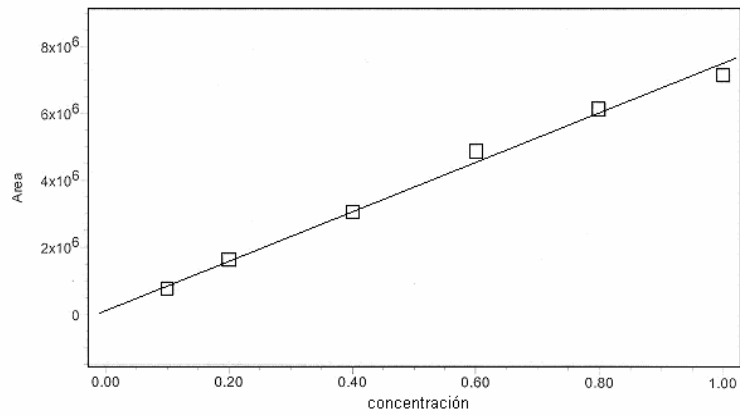
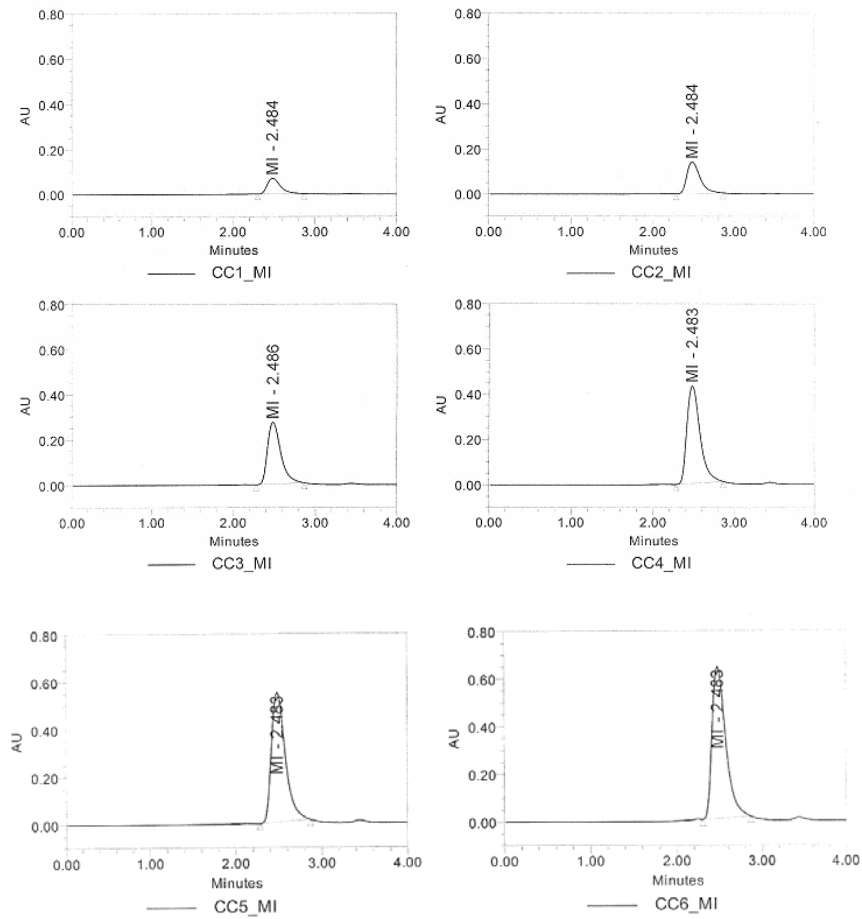
Derivados del <i>p</i>-ABA	r^2
1a	0.998178
1b	0.995513
2a	0.997284
2b	0.996295

En las figuras 38, 39, 40 y 41 se muestran los cromatogramas de HPLC que representa la curva de calibración de los compuestos 1a, 1b, 2a y 2b.



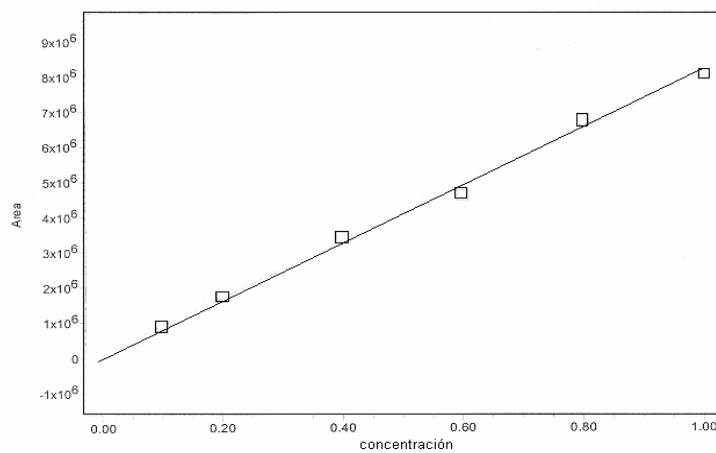
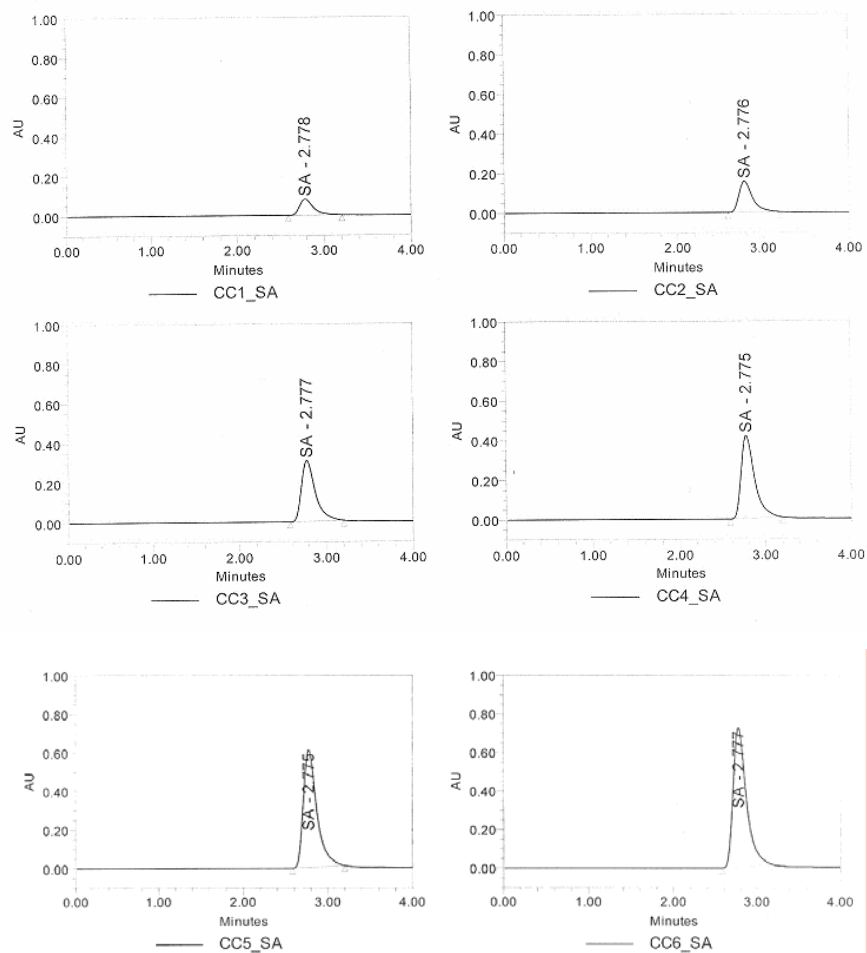
Nombre: MA; Método procesado MA; Tipo de curva: Lineal (1er Orden);
A:6.571642e+004; B: 7.271966e+006; R 0.999089; R²: 0.998178

Figura 38. Curva de calibración del compuesto 1a, a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mM



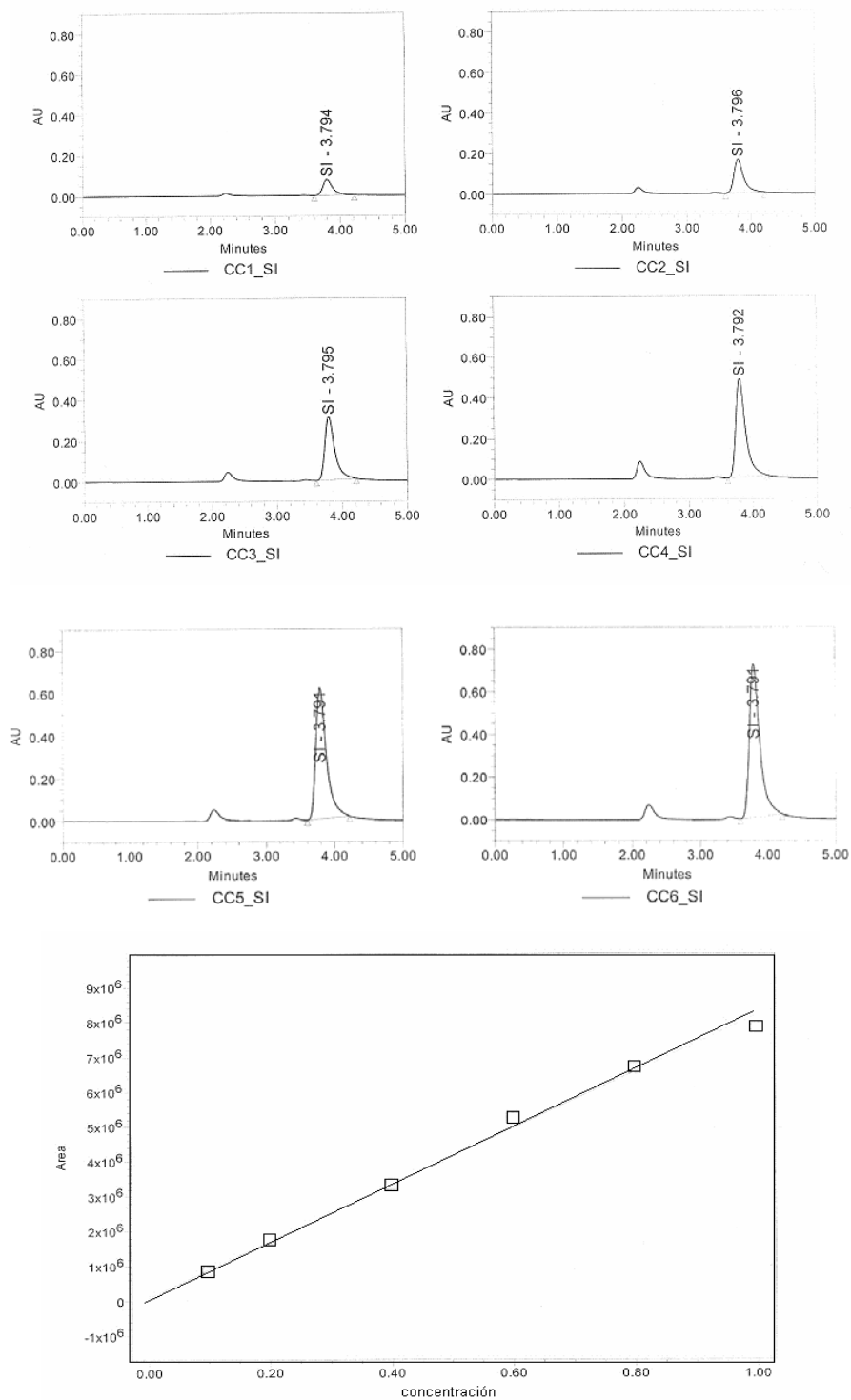
Nombre: MI; Método procesado MI; Tipo de curva: Lineal (1er Orden);
A:7.872868e+004; B: 7.433073e+006; R 0.997754; R²: 0.995513

Figura 39. Curva de calibración del compuesto 1b a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mM



Nombre: SA; Método procesado SA; Tipo de curva: Lineal (1er Orden);
A:1.030762e+005; B: 7.989437e+006; R 0.998641; R²: 0.997284

Figura 40. Curva de calibración del compuesto 2a, a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mM



Nombre: SI; Método procesado SI; Tipo de curva: Lineal (1er Orden);
A: 8.078164e+004; B: 8.111040e+006; R 0.998146; R²: 0.996295

Figura 41. Curva de calibración del compuesto 2b a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mM

En las figuras 42, 43, 44 y 45 se muestran los cromatogramas de HPLC que representan la separación de los “productos” de los derivados del *p*-ABA obtenidos a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con FB. Asimismo podemos observar cómo la concentración de cada uno de los compuestos con respecto al tiempo no disminuyó en ninguno de los casos. En las figuras se aprecia los diferentes picos de absorción, asimismo los tiempos de retención, según la fase polar empleada. Esto hace suponer que no se llevó cabo la biotransformación de los compuestos.

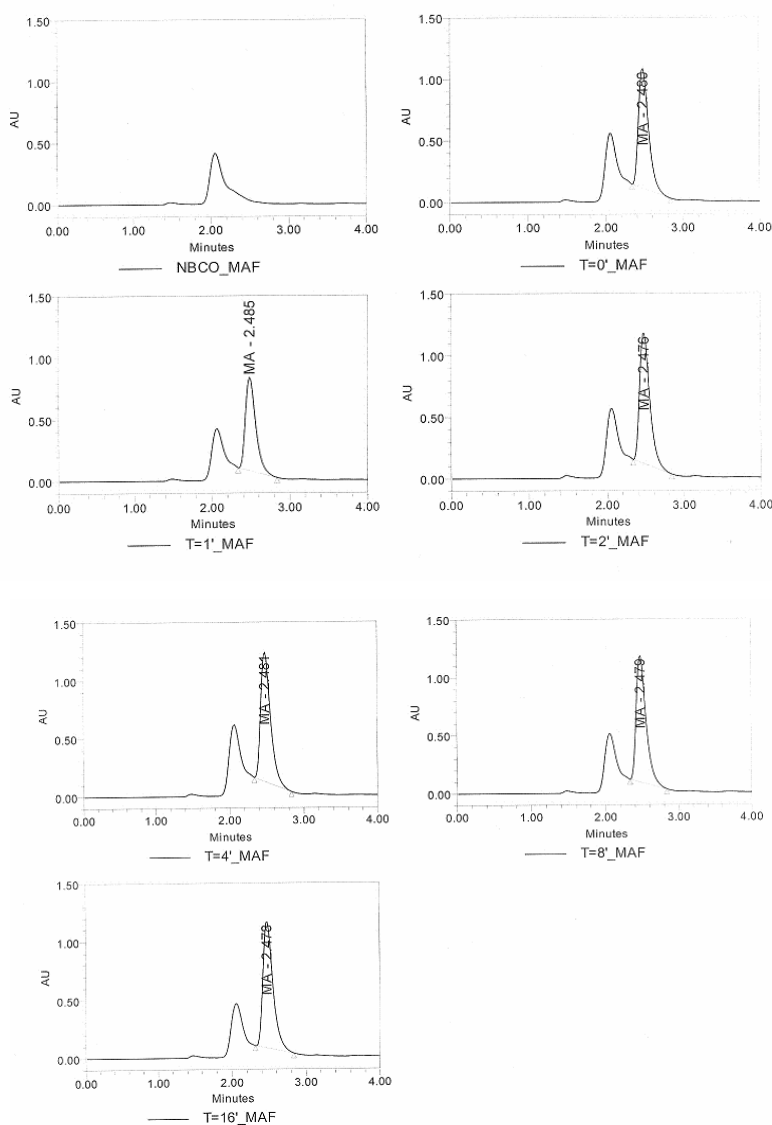


Figura 42. Cromatogramas de HPLC del compuesto 1a obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con FB.

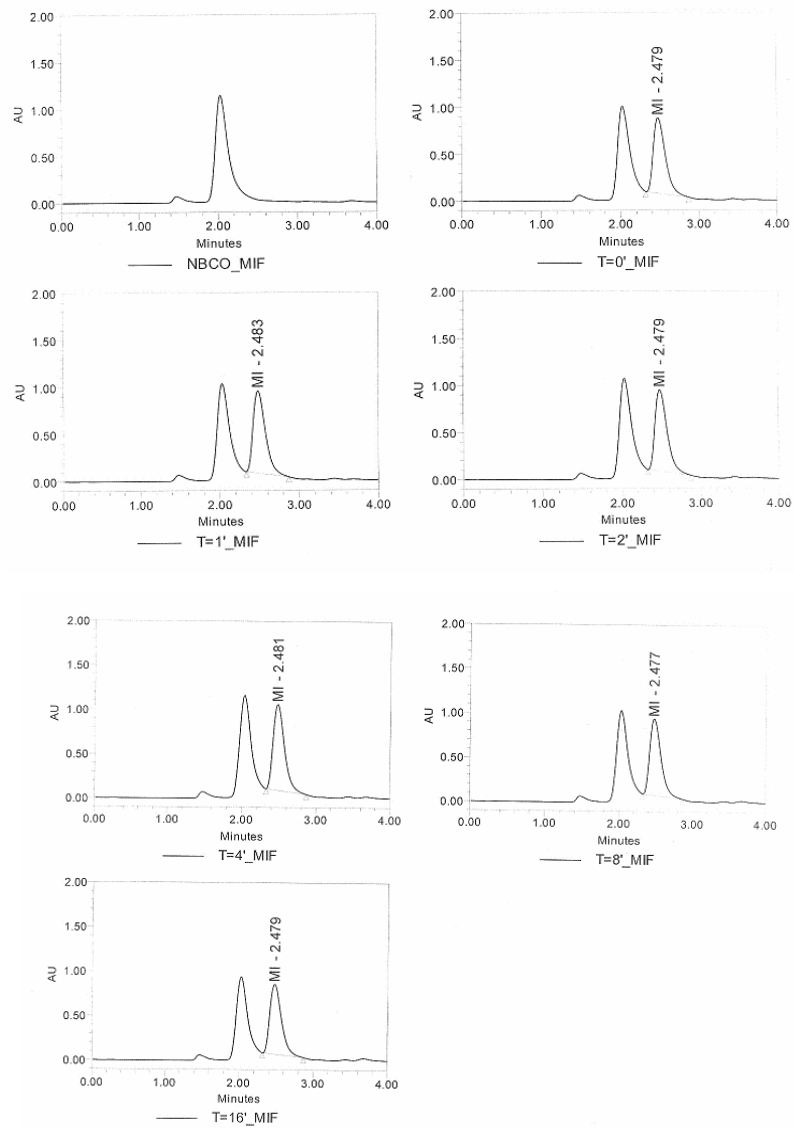


Figura 43. Cromatogramas de HPLC del compuesto 1b obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con FB.

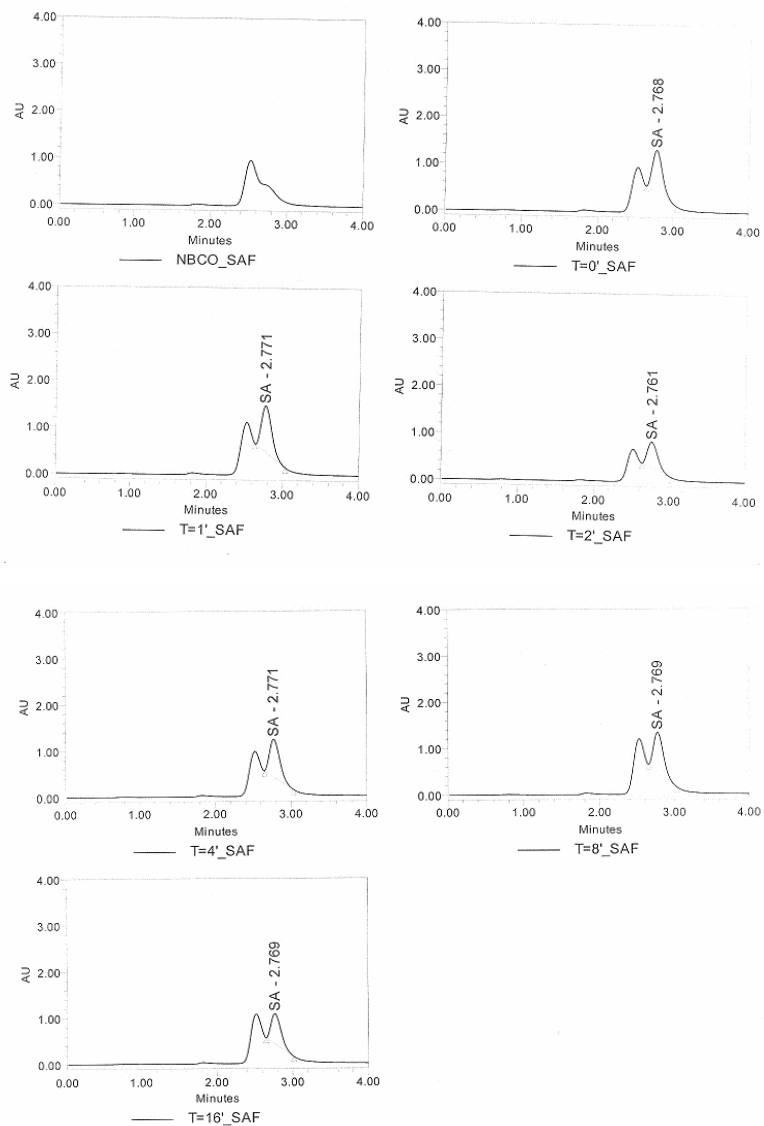


Figura 44. Cromatogramas de HPLC del compuesto 2a obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con FB.

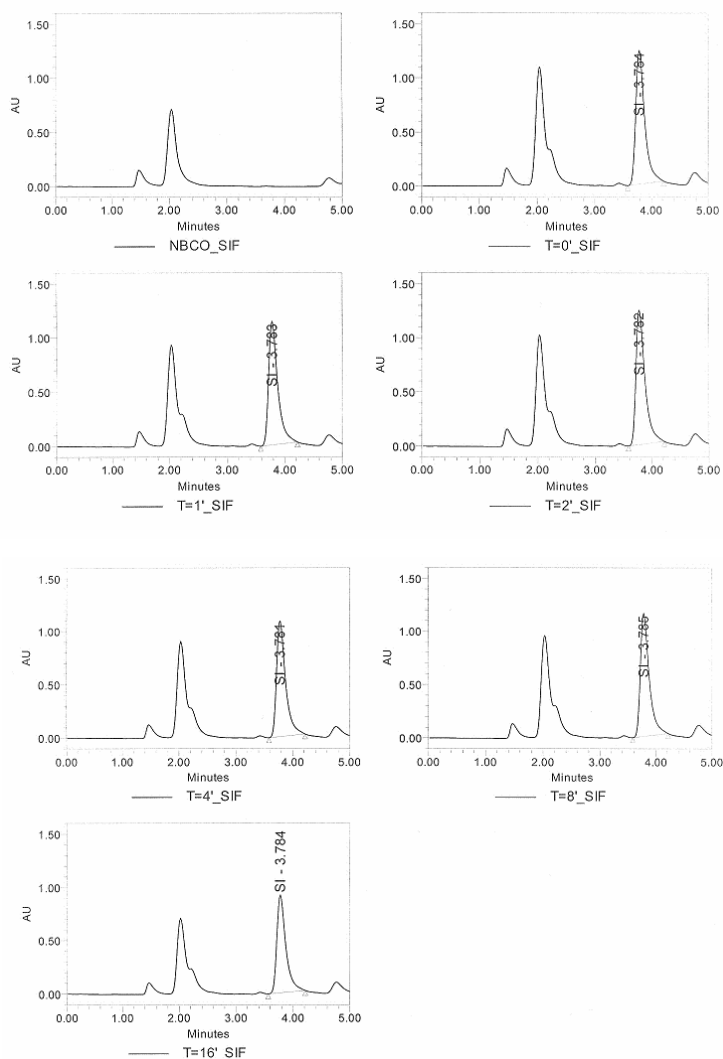


Figura 45. Cromatogramas de HPLC del compuesto 2b obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con FB.

De la misma forma que el resultado anterior, los derivados del *p*-ABA mostraron un comportamiento similar al incubarlos con los microsomas de hígado de rata tratada con β N obtenidos a diferentes tiempos, como puede apreciarse en los cromatogramas de HPLC de las figuras 46, 47, 48 y 49, ya que podemos observar que la concentración empleada de compuesto no disminuyó. Sin embargo se puede observar en cada una de las figuras los diferentes picos de absorción, así como los tiempos de retención.

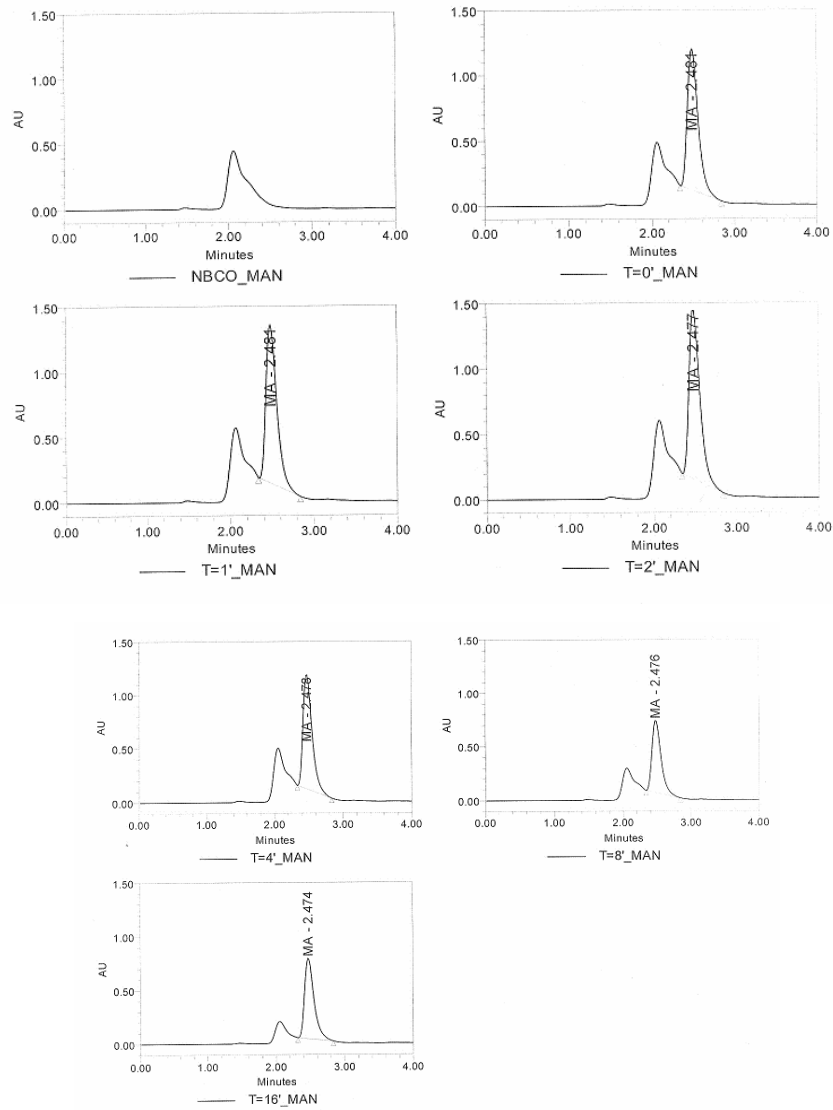


Figura 46. Cromatogramas de HPLC del compuesto 1a obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con β N.

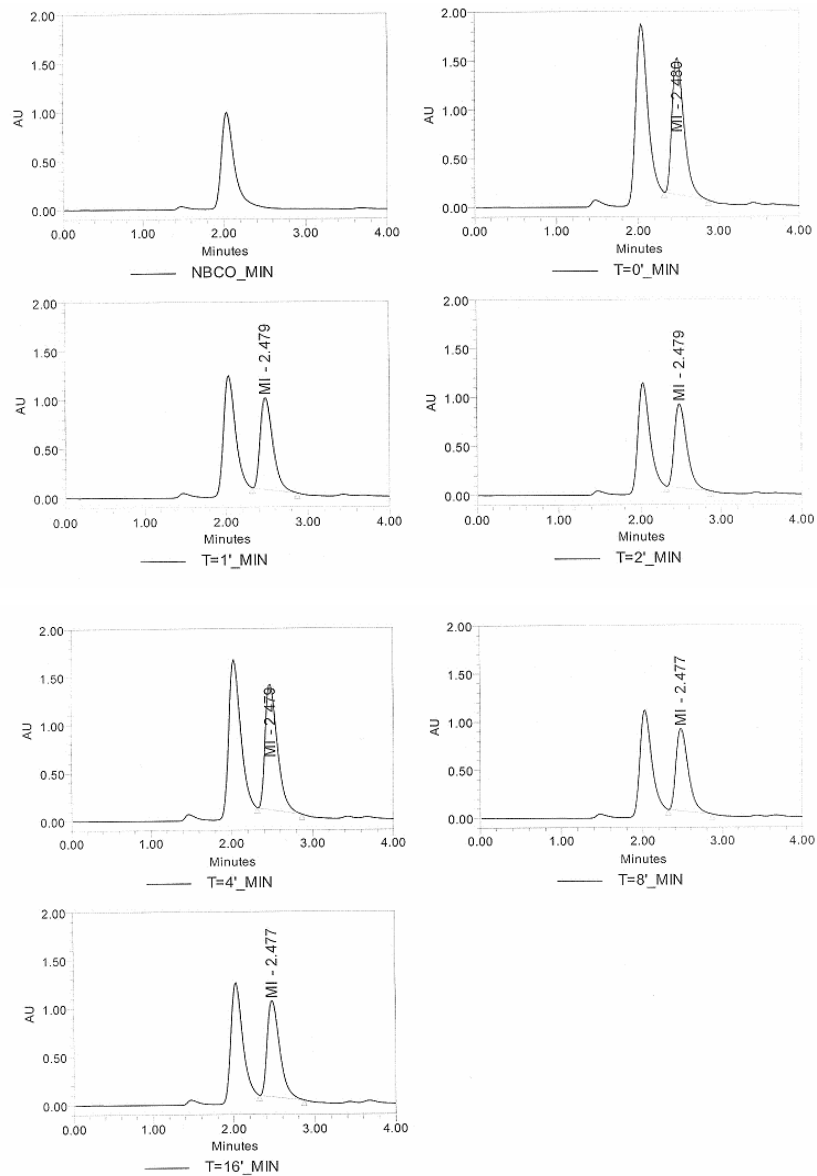


Figura 47. Cromatogramas de HPLC del compuesto 1b obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con β N.

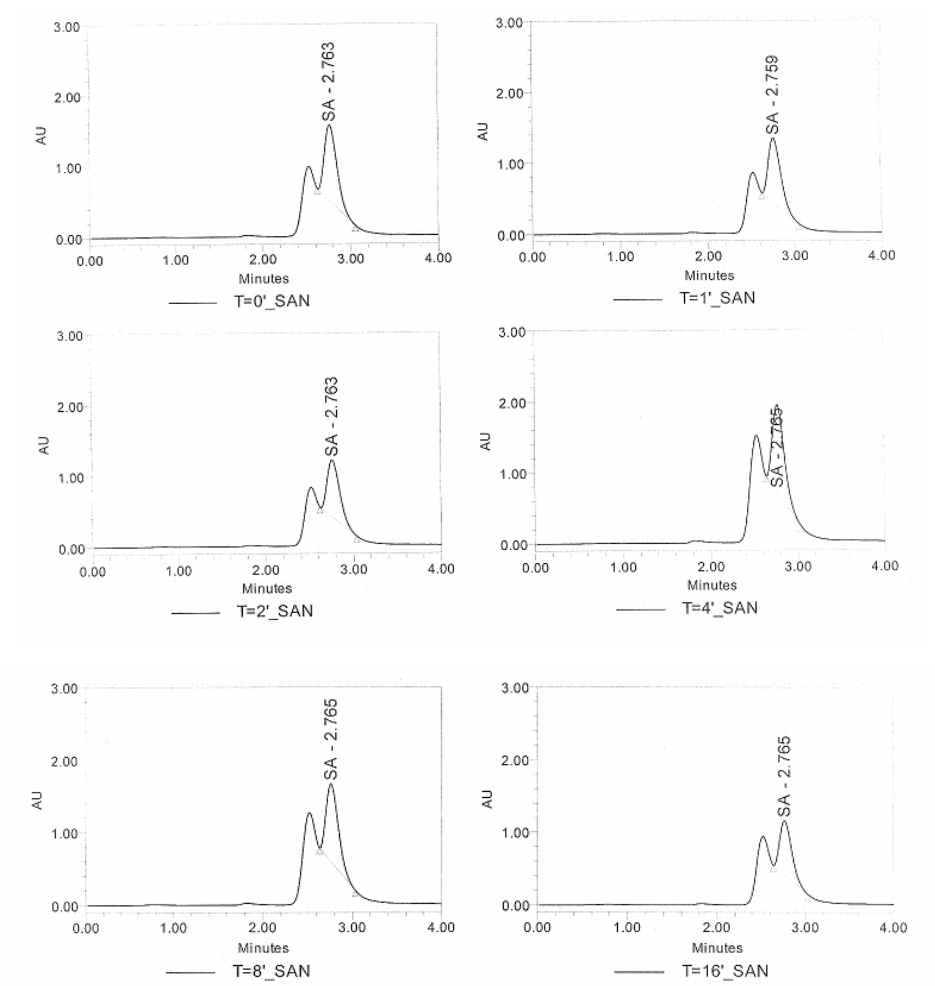


Figura 48. Cromatogramas de HPLC del compuesto 2a obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con β N.

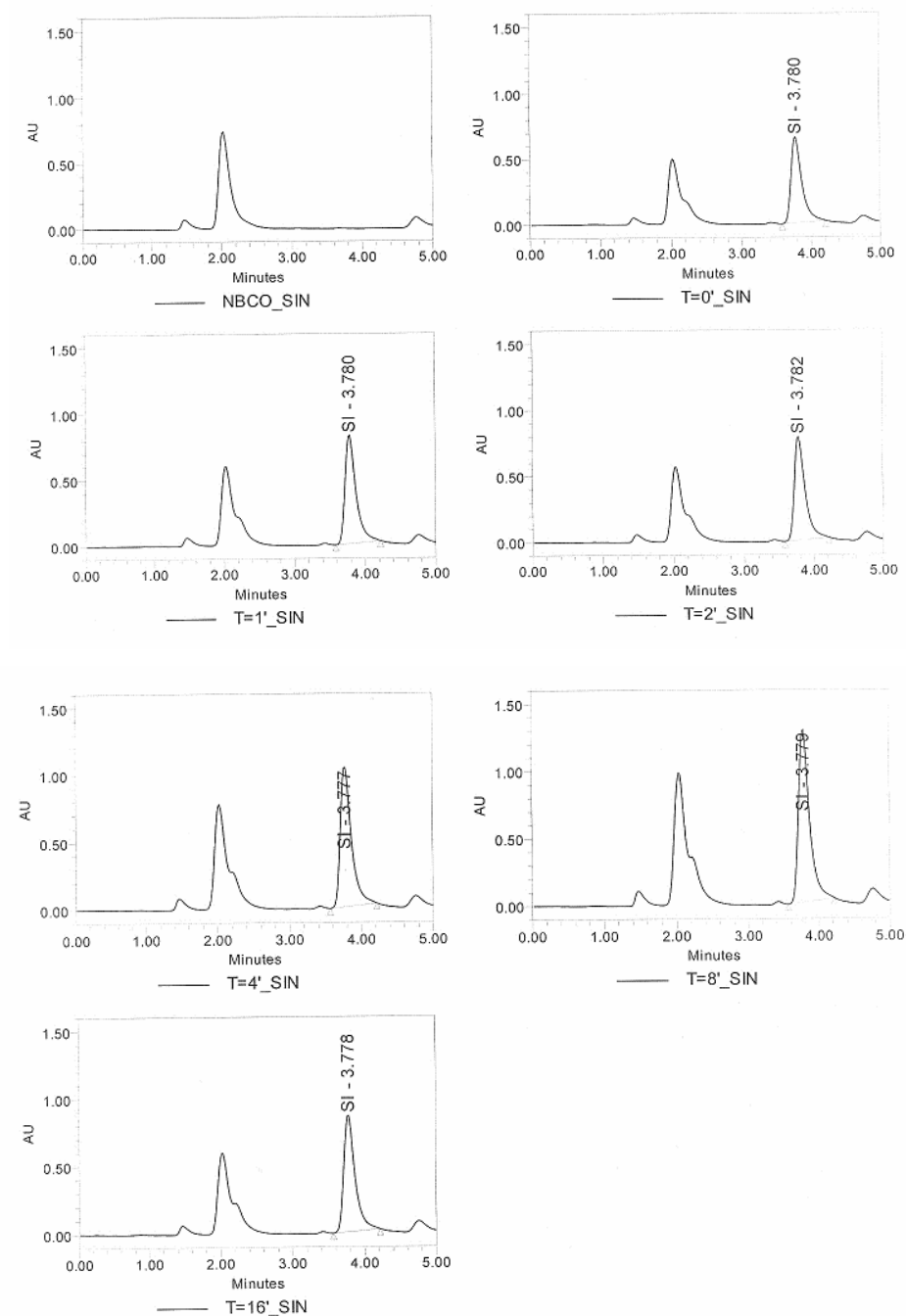


Figura 49. Cromatogramas de HPLC del compuesto 2b obtenido a diferentes tiempos a partir de la incubación con microsomas de hígado de rata tratada con β N.

En las siguientes tablas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 se muestran los resultados obtenidos de cada uno de los compuestos, en éstas se resumen el tiempo de retención, la cantidad o concentración, según los tiempos empleados durante la biotransformación, llevadas a cabo para cada uno de los derivados del *p*-ABA.

Tabla 5. Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 1a con los microsomas de hígado de rata inducidos con FB con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.

Resultados del análisis

	Muestra	tr	Nombre	Cantidad	Unidades
1	NBCO MAF		1a		
2	t=0' MAF	2.480	1a	1.216	mM
3	t=1' MAF	2.485	1a	0.950	mM
4	t=2' MAF	2.476	1a	1.338	mM
5	t=4' MAF	2.481	1a	1.406	mM
6	t=8' MAF	2.479	1a	1.389	mM
7	t=16' MAF	2.478	1a	1.399	mM
n=10, X=1.283, \pm EEM =0.0726					

Tabla 6. Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 1b con los microsomas de hígado de rata inducidos con FB con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.

Resultados del análisis

	Muestra	tr	Nombre	Cantidad	Unidades
1	NBCO MIF		1b		
2	t=0' MIF	2.479	1b	1.154	mM
3	t=1' MIF	2.483	1b	1.248	mM
4	t=2' MIF	2.479	1b	1.234	mM
5	t=4' MIF	2.481	1b	1.376	mM
6	t=8' MIF	2.477	1b	1.226	mM
7	t=16' MIF	2.479	1b	1.132	mM
n=10, X=1.228, \pm EEM =0.0351					

Tabla 7. Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 2a con los microsomas de hígado de rata inducidos con FB con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.

Resultados del análisis

	Muestra	tr	Nombre	Cantidad	Unidades
1	NBCO SAF		2a		
2	t=0' SAF	2.768	2a	1.059	mM
3	t=1' SAF	2.771	2a	1.147	mM
4	t=2' SAF	2.761	2a	0.642	mM
5	t=4' SAF	2.771	2a	0.933	mM
6	t=8' SAF	2.769	2a	0.950	mM
7	t=16' SAF	2.769	2a	0.724	mM
n=10, X=0.909, \pm EEM =0.0884					

Tabla 8. Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 2b con los microsomas de hígado de rata inducidos con FB con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.

Resultados del análisis

	Muestra	tr	Nombre	Cantidad	Unidades
1	NBCO SIF		2b		
2	t=0' SIF	3.784	2b	1.665	mM
3	t=1' SIF	3.783	2b	1.534	mM
4	t=2' SIF	3.782	2b	1.676	mM
5	t=4' SIF	3.781	2b	1.460	mM
6	t=8' SIF	3.785	2b	1.548	mM
7	t=16' SIF	3.784	2b	1.225	mM
n=10, X=1.518, \pm EEM =0.0675					

Tabla 9. Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 1a con los microsomas de hígado de rata inducidos con β N con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.

Resultados del análisis

	Muestra	tr	Nombre	Cantidad	Unidades
1	NBCO MAN		1a		
2	t=0' MAN	2.481	1a	1.338	mM
3	t=1' MAN	2.481	1a	1.493	mM
4	t=2' MAN	2.477	1a	1.607	mM
5	t=4' MAN	2.478	1a	1.337	mM
6	t=8' MAN	2.476	1a	0.845	mM
7	t=16' MAN	2.474	1a	0.979	mM
n=10, X=1.266, \pm EEM =0.1207					

Tabla 10. Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 1b con los microsomas de hígado de rata inducidos con β N con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.

Resultados del análisis

	Muestra	tr	Nombre	Cantidad	Unidades
1	NBCO MIN		1b		
2	t=0' MIN	2.480	1b	1.959	mM
3	t=1' MIN	2.479	1b	1.336	mM
4	t=2' MIN	2.479	1b	1.217	mM
5	t=4' MIN	2.479	1b	1.831	mM
6	t=8' MIN	2.477	1b	1.213	mM
7	t=16' MIN	2.477	1b	1.409	mM
n=10, X=1.494, \pm EEM =0.1313					

Tabla 11. Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 2a con los microsomas de hígado de rata inducidos con β N con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.

Resultados del análisis					
	Muestra	tr	Nombre	Cantidad	Unidades
1	NBCO SAN		2a		
2	t=0' SAN	2.763	2a	1.294	mM
3	t=1' SAN	2.759	2a	1.104	mM
4	t=2' SAN	2.763	2a	0.974	mM
5	t=4' SAN	2.765	2a	1.443	mM
6	t=8' SAN	2.765	2a	1.272	mM
7	t=16' SAN	2.765	2a	0.866	mM
n=10, X=1.588, \pm EEM =0.0884					

Tabla 12. Datos de los metabolitos obtenidos del compuesto 2b con los microsomas de hígado de rata inducidos con β N con tiempos de 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min.

Resultados del análisis					
	Muestra	tr	Nombre	Cantidad	Unidades
1	NBCO SIN		2b		
2	t=0' SIN	3.780	2b	0.862	mM
3	t=1' SIN	3.780	2b	1.086	mM
4	t=2' SIN	3.782	2b	1.029	mM
5	t=4' SIN	3.777	2b	1.369	mM
6	t=8' SIN	3.779	2b	1.708	mM
7	t=16' SIN	3.778	2b	1.139	mM
n=10, X=1.198, \pm EEM =0.1220					

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este trabajo se indujeron dos isoformas del CYP450 para determinar la biotransformación de los cuatro derivados del *p*-ABA, con la finalidad de conocer los posibles metabolitos que se formarían. La inducción llevada a cabo reveló que el contenido de CYP aumentó en los microsomas de hígado de rata tratadas con FB y β N, así como también aumentó en el contenido de proteínas totales. Por lo que demuestran diferencia significativa ($P < 0.05$) en dichos contenidos totales entre los microsomas de hígado de rata tratadas y las no tratadas.

En los microsomas que se obtuvieron, el contenido de CYP450 se incrementó aproximadamente en 4.2 veces con el fármaco de FB empleado y en proteínas cerca de 2.3 veces comparándolo con las ratas testigo, de igual manera la β N incrementó el contenido de CYP448 en 2.7 veces y de proteínas en 1.3 veces en comparación con las ratas testigo. Esto resulta de mucha importancia en cuanto al aumento en algunas isoformas del CYP450, entre ellas la 2B1 y la 1A1, respectivamente. Según lo reportado en la literatura, al aparecer el pico característico en 450 nm se demuestra que el Fe^{+3} del grupo prostético hemo se reduce a Fe^{+2} , formando el complejo con el $\text{CO}^{56,57}$, el cual se observó en los resultados obtenidos.

En el análisis de las pruebas espectrales para determinar la interacción de los cuatro compuestos derivados del *p*-ABA con los microsomas de hígado de rata tratadas con FB y β N, se encontró que tienen afinidad dichos compuestos con los microsomas, dado que se observó una disminución en el espectro de absorción de cada uno de los compuestos comparado con el espectro de absorción inicial del CYP450, tanto los que se trataron con FB como los de β N. Para poder llevar a cabo la determinación completa de este análisis, se debería realizar diferentes cálculos para encontrar el delta de absorbancia de cada uno de los compuestos y conocer el cambio espectral de tipo I o de tipo II. Esta clasificación nos permite

conocer la absorción máxima y mínima relativa de los compuestos con los microsomas, esto se logra a través de un programa matemático y obtener un resultado más concluyente. Sin embargo, este último paso no se logró, aunque cabe destacar que con los resultados obtenidos se observó que los compuestos derivados del *p*-ABA interaccionan con el sistema microsomal hepático tratados con FB y con β N, debido a que producen un desplazamiento del pico máximo de absorción^{30-34,58}.

Los estudios de docking revelan que los cuatro compuestos derivados del *p*-ABA se unen cerca del grupo hemo del CYP2B4, es decir, la MA se une cerca del sitio activo del grupo hemo, estando el grupo carboxilo cerca de Arg 125 y Leu 129, mientras que el anillo aromático con Arg 98, y la porción del maleico hace contacto con Gly 99 y Arg 434. Asimismo el compuesto MI se une cerca del sitio activo del grupo hemo, estando el grupo carboxilo cerca de Gly 99 y Pro 368, mientras que el anillo aromático con Arg 98 y la porción del maleico con Val 367 y Arg 434. El compuesto SA se une cerca del sitio activo del grupo hemo, estando el anillo aromático cerca de Arg 98 y 125 mientras que la porción del succínico hace contacto con Gly 99, Arg 434 y Pro 368. Y el compuesto SI se une cerca del sitio activo del grupo hemo, estando el grupo carboxilo cerca de Gly 99 y Pro 368, mientras que el anillo aromático con Arg 98 y Val 367 y el succínico cerca de Arg 434. De acuerdo con estos resultados teóricos, los cuatro compuestos derivados del *p*-ABA son sustratos del CYP2B4 y podrían ser biotransformados por esta enzima, según las pruebas computacionales realizadas. Sin embargo a diferencia de los resultados experimentales llevados a cabo *in vitro* (se discute más adelante) se observó que fueron distintos con respecto a las pruebas teóricas.

En el análisis de EM, se identificaron los metabolitos generados durante la incubación con los microsomas de hígado de rata tratadas con FB y el compuesto MA, en donde se detectó la presencia del metabolito DH-*p*-ABA formando aducción con el Na⁺, identificándolo por la m/z de 288.264. Además se registró

otro producto presente, siendo el compuesto MA unido a un r-Cys, con una m/z de 337.156 perdiendo un H⁺ del grupo carboxilo, lo que indica que este producto se formó en el sistema microsomal donde se encuentran presentes una gran cantidad de moléculas producto del aislamiento.

Estos metabolitos no habían sido caracterizados, por lo que hasta la fecha no se tiene información completa de los mismos. En relación a los compuestos de MI y SA, no se encontraron metabolitos de ningún tipo, ni aún los propuestos inicialmente, esto podría deberse a que la estructura del compuesto posee un grupo carboxilo, que le confiere a la molécula un carácter ácido, provocando que se encuentre disociada, impidiendo su paso a través de las capas membranales, por tanto la concentración es menor o nula para metabolizar, sin embargo no hay que descartar que debido a la polaridad media que posee la molécula, ésta sólo pasó a través del CYP450 sin sufrir ningún tipo de modificación y por tanto permaneció intacta. También existe la posibilidad que estos compuestos puedan ser inhibidores del CYP450, ya que a través de las pruebas por docking se observó que se unen a dicha enzima.

En cuanto al compuesto SI se detectó un producto con una m/z de 93.003 correspondiendo éste al peso molecular de la anilina, un metabolito tóxico el cual no se esperaba que se formara dado la estructura de la molécula. Según la hipótesis propuesta siguió la vía de descarboxilación y la desmetilación la cual se desconocía para este compuesto, así mismo se formó otro fragmento de menor importancia como ya fue discutido anteriormente. Por tanto estos resultados sugieren que no es posible emplearlo como un fármaco terapéutico, dada las características y los resultados arrojados, aunque no se debe descartar darle seguimiento con análisis más detallados y comprobar si efectivamente esta molécula es tóxica.

Siguiendo con el análisis de los derivados del *p*-ABA por EM, los resultados que se generaron durante la incubación con los microsomas de hígado de rata tratadas con β N con el compuesto MA, se identificó nuevamente el metabolito DH-*p*-ABA formando aducción con el Na^+ con una *m/z* de 288.292, resultando similar éste con la primera identificación de los metabolitos, como ya se explicó anteriormente. Asimismo se identificó otro producto siendo la molécula de MA con un r-Cys sin la pérdida del ión H^+ del grupo carboxilo, teniendo una *m/z* de 338.156. Como se hizo referencia en el resultado anterior a éste con los microsomas de hígado de rata tratadas con FB, esto se explica debido a que cuando se llevó a cabo la inducción con β N, no sólo se generó la isoforma 1A1, sino también otras isoformas en menor cantidad, llegando a formarse dichos metabolitos.

Respecto al compuesto de MI, se detectó la presencia del mismo compuesto unido a un r-Tyr con una *m/z* de 379.161, esto se explica de la misma manera que con el metabolito formado de MA con r-Cys. Por otro lado el resultado del compuesto de SA, generó el metabolito propuesto inicialmente, siendo el producto de fenilamida con una *m/z* de 173.586, sufriendo una descarboxilación por la isoforma 1A1, esta detección del metabolito en cuanto a la intensidad es muy pequeña, esto se puede explicar debido a que dichas isoformas que se inducen con β N, no aumentaron tanto como las que fueron inducidas con FB, lo que indica una actividad menor de las enzimas durante la biotransformación de este compuesto. En cuanto al compuesto derivado del *p*-ABA de SI, se registró la misma molécula con una *m/z* de 221.178, lo que hace suponer que el compuesto en estudio no sufrió modificación alguna por el CYP, aun a pesar de que se detectó sin modificación. Esto es debido a que este compuesto no es sustrato del CYP450.

Siguiendo con los análisis, se llevó a cabo la cuantificación de los metabolitos derivados del *p*-ABA con los microsomas de hígado de rata tratadas con FB y β N en el equipo de HPLC, los resultados que se obtuvieron no fueron los esperados, es decir, que los valores obtenidos en la cuantificación de dichos metabolitos

fueron mayores cuando los resultados que se debieron observar era que la concentración inicial de 0.1 mM del sustrato fuera disminuyendo, lo que indicaría que el compuesto está siendo metabolizado. Según los resultados obtenidos se puede apreciar que en cada uno de los compuestos derivados del *p*-ABA aparentemente no lograron biotransformarse tanto en los microsomas de hígado de rata tratados con FB como con los tratados con β N, ya que se observa un incremento en el ABC conforme pasa el tiempo. En los resultados observados en los distintos cromatogramas de HPLC no se logró inferir la presencia de ningún metabolito generado a través de las distintas isoformas del CYP450, esto indica aparentemente que durante la incubación de los compuestos con los microsomas de hígado de rata tratadas con FB y β N, no se metabolizaron. Aunque cabe señalar que a pesar de que no se lograron resultados satisfactorios en este análisis, sí se obtuvieron metabolitos producto de la biotransformación con los microsomas de hígado de rata con los derivados del *p*-ABA, los cuales se identificaron a través de EM. Esto se explica debido a que estos cuatro compuestos derivados del *p*-ABA poseen dobles enlaces que no se encuentran fuertemente retenidos provocando que se exciten más fácilmente por la radiación, haciendo que absorban más a la longitud de onda que le corresponde a cada compuesto, por eso se ve dicho incremento. Cabe mencionar que hay que tomar en cuenta otros factores que lograron influir en este análisis, como las condiciones de operación del equipo, las condiciones rigurosas del sistema microsomal utilizado, etc. Sin embargo éstas son unas hipótesis que tendrían que complementarse con técnicas más sensibles, por lo que no puede descartarse que el sistema microsomal *in vitro* no funcionó, sino todo lo contrario, de hecho es soportado por otros autores que han realizado metabolismo *in vitro*.

De manera general, podríamos decir que los compuestos de MA y SI, poseen baja toxicidad debido a que pasan a través de la vía del CYP450 y son biotransformados en forma de DH-*p*-ABA por la isoforma 2B1 y son eliminados fácilmente. Sin embargo cabe destacar que hay que seguir analizando y probando

compuestos, que generen nuevas opciones y que puedan competir con otros productos en el mercado. Para ello, los compuestos de MA y SI han demostrado que actúan como inhibidores de la AChE, con resultados favorables para su posible aplicación terapéutica.

8. CONCLUSIONES

El contenido de proteínas y citocromo en microsomas de hígado de rata tratadas con FB y β N se indujeron de manera significativa ($P < 0.05$).

En las pruebas espectrales, las amidas e imidas que son de polaridad media son inicialmente unidas a la enzima para ser metabolizadas.

Los modelos de Docking dan como resultado que los compuestos estudiados, se unen cerca del sitio activo del CYP2B4, haciendo contacto con residuos involucrados con el sitio activo.

El citocromo inducido con FB y β N catalizó la oxidación del compuesto maleamida generando el metabolito DH-*p*-ABA, lo que hace que pueda considerarse al compuesto como no hepatotóxico.

Los metabolitos del compuesto de maleimida y succinamida no fueron detectados cuando se realizó la biotransformación con los microsomas inducidos con FB, esto indica que inhibe o no se metaboliza por esta vía

El compuesto succinimida generó el metabolito de anilina cuando se biotransformó por el citocromo inducido con FB lo que hace que el compuesto se pueda considerar hepatotóxico.

No se formaron los metabolitos esperados del compuesto maleimida cuando se llevó a cabo la biotransformación con los microsomas inducidos con β N pero se generó un complejo que se formó durante la reacción *in vitro*.

El citocromo inducido con β N catalizó la descarboxilación del compuesto succinamida generando el metabolito fenilenamidas, lo que hace que pueda considerarse al compuesto como no hepatotóxico.

Los metabolitos del compuesto de succinimida no fueron detectados cuando se realizó la biotransformación con los microsomas inducidos con β N, solo se observó el mismo compuesto, esto indica que inhibe o no es metabolizado por el CYP450.

9. PROPUESTAS

Este trabajo, deja abierta la posibilidad de emplear técnicas más sofisticadas para complementar estos resultados y poder así eliminar errores en el empleo de estos compuestos derivados del *p*-ABA con el fin de descartar completamente que son de baja toxicidad y por tanto su posible aplicación terapéutica como inhibidores de la AChE. No así, la importancia de diseñar nuevos fármacos con posibilidad de aplicación clínica, siendo importante encontrar que la cantidad de efectos nocivos al organismo sea menor o completamente nula.

En este caso, resultó interesante estudiar y analizar la biotransformación de estos cuatro derivados del *p*-ABA, ya que generó un avance en el seguimiento de estos compuestos, pues hasta ese momento no se contaba con otro tipo de estudios sobre dichos compuestos. Esto da pauta a continuar con más estudios y poder descartar de manera contundente si son tóxicos o no, dado que se logró obtener datos muy importantes en esta investigación.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_farmacos.pdf
2. Myriam, O. B., Guajardo T. (2004). *Rev Méd Chile*; **132**: 85-94
3. Ingelman, S. M., Kaur, H., Terelius, Y., Persson, J. O., and Halliwell, B. (1991). *Biochem. J.* **276**, 753-757.
4. Winston, G. W., and Cederbaum, A. I. (1982). *Biochem.* **21**, 4265-4270.
5. Correa, B. J., Vázquez, A. J., Espinoza, F. M., and Trujillo, F. J. (2005). *Eur. J. Med. Chem.* **40**, 732-735.
6. Melchor, M. P. (2005). Síntesis y relación estructura actividad de arilimidias sustituidas de acción anticolinesterasa. Tesis de Maestría. Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. p. 20 y 21.
7. Marquardt, H., Schäfer, S. G., McClellan, R., and Welsh, F. (1999). *Toxicology. Academic Press, New York.*
8. White, R. E., and Coon, M.J. (1980). *Annual Reviews of Biochemistry.* **49**, 315-356.
9. Guengerich, F. P. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 10019-10022
10. Porter, T. D., and Coon, M. J. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 13469-13472
11. Mansuy, D. (1998). *Comp Bio and Phys. Part C.* **121**, 5-14

12. Goodman, G. G. (2001). *The pharmacological basis of therapeutics*. Ed. McGraw Hill. 10^a ed. p. 12-13.
13. Axelrod, J. (1955) *J. Pharma.* **114**, 430.
14. Brodie, B., Axelrod, J., Copper, J. R., Gaudette, L. (1955). *Science.* **21**, 603.
15. Klingerberg, M. (1958). *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **75**, 376-386.
16. Garfinkel, D. (1958). *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **77**, 493-386.
17. Imai, Y., Sato, R. (1966). *Biochem Biophys Res Commun.* **23**, 5.
18. Alvares, A. P., Schilling, G., Levin, W. and Kuntzman, R. (1967). *Biochem and Biophys Res Commun.* **29**, 521-526.
19. Ryan, D. E., Thomas, P. E., Korzeniowski, D., and Levin, W. (1979). *J of Biol Chem.* **254**, 1365-1374.
20. Bhat, K. S. and Padmanaban, G. (1979). *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **198**, 110-116.
21. Waxman, D. J. and Walsh, C. (1982). *J of Biol Chem.* **257**, 10446-10457.
22. Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F.P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okuda, K. and Nebert, D. W. (1993). *DNA Cell Biol.* **12**, 1.
23. Devlin, T. M. (1997). *Textbook of Biochemistry with clinical correlations.* **982**.

24. Ingelman-Sundberg M. (2002). *Toxicology*. **181-182**, 447-452.
25. Guengerich, F. P. and Macdonald, T. L. (1984). *Accounts of chemical Research*. **17**, 9-16.
26. Mansuy, D. (1998). *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part. C. **121**, 5-14.
27. Lewis, D. F. V. and Pratt, J. M. (1998). *Drug metabolism Reviews*. **30**, 739-786.
28. White, R.E., Coon, M. J. (1980). *Annu Rev Biochem*. **49**.315.
29. Hildebrandt, A. G., Leibman, K. C. and Estabrook, R. W. (1969). *Biochem and Biophys Res Commun*. **37**, 3, 477-485.
30. Schenkman, J. B., Remmer, H. and Estabrook, R. W. (1967). *Mol. Pharmacol*. **3**, 113-123.
31. Jefcoate, C. R. (1969). *Enzymol*. **27**, 258-257.
32. Hildebrandt, A. G., Remmer, H. and Estabrook, R. W. (1968). *Biochem and Biophys Res Commun*. **30**, 607.
33. Hildebrandt, A. G. and Estabrook, R. W. (1969). *Academic Press, New York*.
34. Jefcoate, C. R. and Gaylor, J. L. (1969). *Biochem*. **8**, 3464.
35. Giacobini, E. *Jpn. J. Pharmacol*. (1997). **74**, 225-241

36. Sauers, C.K. *J. Org. Chem.* (1969) **34**, 2275.
37. Cohen, G. and Cederbaum, A. I. (1979). *Science (Washington, D. C.)* **204**, 66-68.
38. Cohen, G. and Cederbaum, A. I. (1980). *Arch Biochem Biophys.* **199**, 438-447.
39. Sagone, A. L., Decker, M. A., Wells, R. M. and Democko, C. (1980). *Biochem Biophys. Acta* **628**, 90-97
40. Hildebrandt, A. G. and Roots, I. (1975). *Arch Biochem and Biophys.* **171**, 385-397.
41. Thurman, R. G., Ley, H. G. and Scholz, R. (1972). *Eur J. Biochem.* **25**, 420, 430.
42. Aust, S. D., Roerig, D. L. and Pederson, T. C. (1972). *Biochem and Biophys Res Commun.* **47**, 1131-1137.
43. Pryor, W. A. and Tang, R. H. (1978). *Biochem and Biophys Res Commun.* **81**, 498-503.
44. Cederbaum, A. I., Dicker, E. and Cohen, G. (1978). *Biochem.* **17**, 3058-3064.
45. Cederbaum, A. I., Dicker, E., Rubin, E. and Cohen, G. (1979). *Biochem.* **18**, 1187-1191.
46. Cederbaum, A. I., Qureshi, A. and Messenger, P. (1981). *Biochem Pharmacol.* **30**, 825-831.

47. Reidl, U. (1983). *J Chromatogr.* **272**, 325-331.
48. Davison, C. (1971). *Ann N. Y. Acad. Sci.* **179**, 249-268
49. Vane, J. and Botting, R. (1987). *FASEB J.* **1**, 89-96.
50. Eynard, A. R., Galli, G., Tremolli, E., Moderna, P., Magni, F. and Paoletti, R. (1986). *J Lab Clin Med.* **107**, 73-79
51. Avendaño, L. C. (2004). *Introducción a la Química Farmacéutica.* McGraw-Hill, Interamericana de España.
52. Jones, C. R., Lubet, R. A., Henneman, J. R. and Nims, R. W. (1998). *Comp Biochem and Physiol Part C.* **121**, 197-203
53. Bhat, K. S. and Padmanaban, G. (1979). *Arch of Biochem and Biophys.* **198**, 110-116.
54. Manno, M., Cazzaro, S., and Rezzadore, M. (1991). *Arch of Toxicol.* **65**, 191-198.
55. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R.J. (1951). *J of Biol Chem.* **193**, 265-275.
56. Omura, T., and Sato, R. (1964). *J of Biol Chem.* **239**, 2370-2378.
57. Omura, T., and Sato, R. (1964). *J of Biol Chem.* **239**, 2379-2385.
58. Grootveld, M. and Halliwell, B. (1986). *Biochem. J.* **237**, 499-507.