

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



GENERACION DE RADICALES LIBRES Y EFECTOS  
*IN VITRO* DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE  
LAS ENZIMAS MICROSOMALES HEPATICAS DE  
*Macaca mulata* Y RATAS WISTAR

POR

Q.F.B. MARIA TERESA ZANATTA CALDERON

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
con Especialidad en Farmacología y Toxicología

DICIEMBRE DEL 2000

Q.F.B. MARIA TERESA ZANATTA CALDERON

TD  
QH603  
.M35  
Z3  
2000  
c.1



1080111677



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**GENERACION DE RADICALES LIBRES Y EFECTOS *IN VITRO***  
**DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE LAS ENZIMAS**  
**MICROSOMALES HEPATICAS DE *Macaca mulata* Y**  
**RATAS WISTAR**

**POR**  
**Q.F.B. MARIA TERESA ZANATTA CALDERON**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN**  
**CIENCIAS con Especialidad en Farmacología y Toxicología**

**Diciembre del 2000**



TO  
QH603  
- M35  
Z3  
200




**GENERACION DE RADICALES LIBRES Y EFECTOS *IN VITRO* DE LA  
PEROXISOMICINA A<sub>1</sub> SOBRE LAS ENZIMAS MICROSOMALES  
HEPATICAS DE *MACACA MULATA* Y RATAS WISTAR**

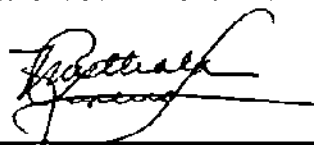
Aprobación de la Tesis:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. med. Alfredo Piñeyro López  
Director de la Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. med. Oscar Torres Alanís  
Codirector de la Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. med. Lourdes Garza Ocañas  
Codirector de la Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Noemí Waksman de Torres  
Miembro del Jurado

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda  
Miembro del Jurado

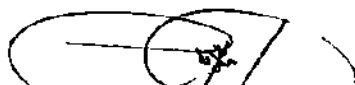
  
\_\_\_\_\_  
Dr. Roberto Mercado Longoria  
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado

**GENERACION DE RADICALES LIBRES Y EFECTOS *IN VITRO* DE LA  
PEROXISOMICINA A1 SOBRE LAS ENZIMAS MICROSOMALES  
HEPATICAS DE *MACACA MULATA* Y RATAS WISTAR**

*Presentado por*

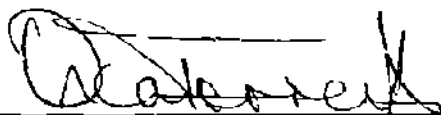
**Q.F.B. María Teresa Zanatta Calderón**

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y  
Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la  
asesoría del Dr. *med.* Alfredo Piñeyro López y la coasesoría del Dr.  
*med.* Oscar Torres Alanís y la Dr. *med.* Lourdes Garza Ocañas.



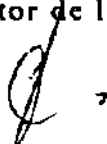
---

**Dr. *med.* Alfredo Piñeyro López**  
Director de la Tesis



---

**Dr. *med.* Oscar Torres Alanís**  
Codirector de la Tesis



---

**Dr. *med.* Lourdes Garza Ocañas**  
Codirector de la Tesis



María Teresa Zanatta Calderón

Fecha de graduación: Dic, 2000

Universidad Autónoma de Nuevo  
León  
Facultad de Medicina

Título del estudio:

**GENERACION DE RADICALES  
LIBRES Y EFECTOS *IN VITRO*  
DE LA PEROXISOMICINA A<sub>1</sub>  
SOBRE LAS ENZIMAS  
MICROSOMALES HEPATICAS  
DE *MACACA MULATA* Y RATAS  
WISTAR**

Número de páginas: 132

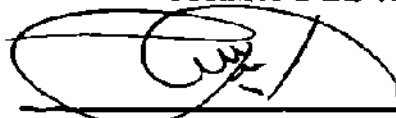
Candidato para la obtención del  
grado de Doctor en Ciencias con  
Especialidad en Farmacología y  
Toxicología.

Area de Estudio: Farmacología y  
Toxicología

**Propósito y Método de Estudio:** La Peroxisomicina A<sub>1</sub> es un compuesto que ha mostrado tener un potencial efecto antineoplásico y que, actualmente está siendo utilizada en ensayos clínicos. En este trabajo, se evaluó la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con las enzimas microsomales hepáticas, responsables del metabolismo de la mayoría de los compuestos. En forma semejante a algunos agentes antineoplásicos, como la Adriamicina y la Bleomicina, la Peroxisomicina A<sub>1</sub> interacciona con las enzimas microsomales hepáticas y produce radicales libres. Por otra parte, la Peroxisomicina A<sub>1</sub> es una antracenona dimérica, por lo que puede autooxidarse y generar radicales libres, por lo tanto, también se evaluó la autooxidación y la inhibición de la generación de los radicales libres con la Superóxido dismutasa y la Catalasa. Se utilizaron los microsomas hepáticos de dos especies: *Macaca mulata* y rata Wistar, con el fin de evaluar las diferencias interespecie.

**Contribuciones y Conclusiones:** En base a los resultados obtenidos se concluye que la Peroxisomicina A<sub>1</sub> interacciona con las enzimas microsomales hepáticas. La Peroxisomicina A<sub>1</sub> se autooxida y a consecuencia de este proceso, genera radicales libres. La generación de radicales libres fue inhibida con la Superóxido dismutasa y la Catalasa. Adicionalmente, se concluye que existen diferencias interespecie en la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con el sistema enzimático microsomal hepático.

FIRMA DEL ASESOR



Dr. med. Alfredo Piñeyro López

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme estar aquí, en el sitio y el momento adecuado, para poder realizar uno de mis mayores deseos. Gracias por estar siempre conmigo.

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional. Gracias por poner los cimientos para hacer de mí la persona que ahora soy. A ti papá, te quiero y siempre te recordaré. A ti mamá, te quiero y estoy orgullosa de que seas mi madre.

A mis hermanos, cuñados y sobrinos, gracias por su cariño, apoyo y comprensión. Gracias por haberme dado la oportunidad de ser tía. Los quiero mucho a todos, sobretodo a los enanos.

Al Dr. Alfredo Piñeyro López, por el inmenso apoyo y cariño que me ha dado, por todas sus enseñanzas, por ser el mejor de los jefes y asesores, por su paciencia, por creer en mí, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, en fin, gracias por todas y cada una de las cosas que he recibido de Ud. Para mí es un honor el conocerlo.

Al Dr. Oscar Torres Alauís y a la Dra. Lourdes Garza Ocañas, por su apoyo, por todos sus valiosos consejos, por el tiempo que me dieron, por estar siempre dispuestos a escucharme y orientarme. Gracias por su valiosa amistad.

A la Dra. Noemí Waksman y a la Dra. Mirthala Moreno por su amistad, comentarios y consejos. Gracias de todo corazón.

A Vero, Rolando, Rosalba, Ricardo y Magaly por su amistad incondicional, por estar siempre conmigo, por soportar mis malos ratos y mi humor sarcástico. Gracias amigos, los quiero mucho y siempre estaré a su lado.

A ti Vero, te agradezco especialmente el estar conmigo y ayudarme siempre que lo he necesitado. A veces la palabra amiga no alcanza a describir a personas como tú. Gracias de verdad por ser mi amiga.

A Erika y Everardo, por estar siempre conmigo, por ser mis amigos, por acompañarme y aconsejarme siempre. Los quiero mucho chulitos.

Gracias a Martha y a Marco, por su amistad, ayuda y consejo durante la escritura de la tesis. Gracias a Magda, por prestarme siempre y de muy buena gana su impresora y por su amistad y apoyo, sobretodo durante mis estancias en su laboratorio.

A todos mis compañeros del doctorado, porque a su lado aprendí y sigo aprendiendo, por todos los momentos que hemos pasado juntos.

A todas las personas que me ayudaron, me dieron su apoyo y amistad, gracias por todo.

## INDICE

Capítulo	Página
<b>1 INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIAL Y METODOS</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>20</b>
2.1.1 Equipo	20
2.1.2 Reactivos	21
2.1.3 Material biológico	22
2.1.3.1 Microsomas de rata	22
2.1.3.2 Microsomas de macaco	22
<b>2.2 Métodos</b>	<b>22</b>
2.2.1 Obtención de microsomas de macaco	22
2.2.2 Obtención de microsomas de rata	23
2.2.3 Determinación de proteínas	24
2.2.3.1 Solución estándar de albúmina	24
2.2.3.2 Reactivo de Lowry	24
2.2.3.3 Reactivo de Folín	24
2.2.3.4 Curva de calibración	24
2.2.3.5 Dilución	25
2.2.3.6 Cálculos	25

<b>2.2.4 Preparación de la Peroxisomicina A1</b>	<b>26</b>
2.2.4.1 Preparación de la solución patrón	26
<b>2.2.5 Determinación de la actividad del Citocromo P-450</b>	<b>26</b>
2.2.5.1 Preparación de la muestra	27
2.2.5.2 Cálculos	27
<b>2.2.6 Determinación de la actividad del Citocromo b5</b>	<b>28</b>
2.2.6.1 Preparación de la muestra	28
2.2.6.2 Cálculos	29
<b>2.2.7 Determinación de las Hemoproteínas totales</b>	<b>29</b>
2.2.7.1 Preparación de la muestra	29
2.2.7.2 Cálculos	30
<b>2.2.8 Determinación de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa</b>	<b>30</b>
2.2.8.1 Preparación de la muestra	30
2.2.8.2 Cálculos	31
<b>2.2.9 Determinación de la autooxidación y de la generación de radicales libres</b>	<b>31</b>
2.2.9.1 Determinación de la autooxidación y generación de radicales libres por el Pirogalol	32
2.2.9.2 Inhibición de la generación de radicales libres por el Pirogalol con SOD y Catalasa	32

2.2.9.3	Determinación de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1	32
2.2.9.4	Inhibición de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1 con SOD y Catalasa	33
2.2.10	Preparación de los microsomas incubados	33
2.2.11	Análisis estadístico	34
<b>1</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>Determinación de la actividad del Citocromo P-450</b>	<b>35</b>
3.1.1	Actividad del Citocromo P-450 en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados e incubados	35
3.1.1.1	Actividad del Citocromo P-450 en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados	36
3.1.1.2	Actividad del Citocromo P-450 en microsomas de <i>Macaca mulata</i> incubados	37
3.1.2	Actividad del Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar no incubados e incubados	38
3.1.2.1	Actividad del Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar no incubados	38



3.3.1.1	Determinación de la concentración de las Hemoproteínas totales en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados	46
3.3.1.2	Determinación de la concentración de las Hemoproteínas totales en microsomas de <i>Macaca mulata</i> incubados	48
3.3.2	Determinación de la concentración de las Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar no incubados e incubados	49
3.3.2.1	Determinación de la concentración de las Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar no incubados	49
3.3.2.2	Determinación de la concentración de las Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar incubados	50
3.4	Determinación de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa	51
3.4.1	Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados e incubados	52
3.4.1.1	Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados	52

3.4.1.2	Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomas de <i>Macaca mulata</i> incubados	53
3.4.2	Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar no incubados e incubados	54
3.4.2.1	Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar no incubados	54
3.4.2.2	Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar incubados	56
3.5	Proceso de autooxidación y generación de radicales libres	57
3.5.1	Generación de radicales libres por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> y el Pirogalol en ausencia de sistemas enzimáticos	57
3.5.2	Generación de radicales libres por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> y el Pirogalol en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	58
3.5.3	Generación de radicales libres por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> y el Pirogalol en presencia de microsomas de rata Wistar	59
3.6	Proceso de inhibición de la autooxidación y generación de radicales libres de la Peroxisomicina A <sub>1</sub> por la Superóxido dismutasa	60



3.6.1 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1 en ausencia de sistemas enzimáticos	61
3.6.1.1 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres del Pirogalol en ausencia de sistemas enzimáticos	61
3.6.1.2 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1 (5 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos	62
3.6.1.3 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1 (10 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos	63
3.6.1.4 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1 (25 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos	64
3.6.1.5 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1 (50 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos	65

3.6.2 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	66
3.6.2.1 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres del Pirogalol (706 µg/mL) en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	67
3.6.2.2 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (5 µg/mL) en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	68
3.6.2.3 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (10 µg/mL) en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	69
3.6.2.4 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (25 µg/mL) en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	70

- 3.6.2.5 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (50  $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de microsomas de *Macaca mulata* 71
- 3.6.3 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 en presencia de microsomas de rata Wistar 72
- 3.6.3.1 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por el Pirogalol (706  $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de microsomas de rata Wistar 72
- 3.6.3.2 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (5  $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de microsomas de rata Wistar 73
- 3.6.3.3 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de microsomas de rata Wistar 74

3.6.3.4	Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (25 µg/mL) en presencia de microsomas de rata Wistar	76
3.6.3.5	Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (50 µg/mL) en presencia de microsomas de rata Wistar	77
3.7	Proceso de inhibición de la autooxidación y generación de radicales libres de la Peroxisomicina A <sub>1</sub> por la Catalasa	78
3.7.1	Efecto inhibitorio de la Catalasa sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> en ausencia de sistemas enzimáticos	78
3.7.1.1	Efecto inhibitorio de la Catalasa sobre la generación de los radicales libres del Pirogalol en ausencia de sistemas enzimáticos	78
3.7.1.2	Efecto inhibitorio de la Catalasa sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (5 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos	80

3.7.1.3 Efecto inhibitorio de la Catalasa sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1 (10 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos	81
3.7.1.4 Efecto inhibitorio de la Catalasa sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1 (25 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos	82
3.7.1.5 Efecto inhibitorio de la Catalasa sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1 (50 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos	83
3.7.2 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	84
3.7.2.1 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por el Pirogalol (706 µg/mL), en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	84
3.7.2.2 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (5 µg/mL), en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	85

3.7.2.3	Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (10 µg/mL), en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	86
3.7.2.4	Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (25 µg/mL), en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	87
3.7.2.5	Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (50 µg/mL), en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	88
3.7.3	Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 en presencia de microsomas de rata Wistar	89
3.7.3.1	Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por el Pirogalol (706 µg/mL), en presencia de microsomas de rata Wistar	90

3.7.3.2 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (5 $\mu\text{g/mL}$ ), en presencia de microsomas de rata Wistar	91
3.7.3.3 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (10 $\mu\text{g/mL}$ ), en presencia de microsomas de rata Wistar	92
3.7.3.4 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (25 $\mu\text{g/mL}$ ), en presencia de microsomas de rata Wistar	93
3.7.3.5 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (50 $\mu\text{g/mL}$ ), en presencia de microsomas de rata Wistar	94
<b>3 DISCUSION</b>	<b>96</b>
4.1 Determinación de la actividad del Citocromo P-450	98

<b>4.2</b>	<b>Determinación de la actividad de la Citocromo b5 reductasa</b>	<b>101</b>
<b>4.3</b>	<b>Determinación de las Hemoproteínas totales</b>	<b>104</b>
<b>4.4</b>	<b>Determinación de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa</b>	<b>106</b>
<b>4.5</b>	<b>Proceso de autooxidación y generación de radicales libres</b>	<b>108</b>
<b>4.6</b>	<b>Proceso de inhibición de la generación de radicales libres con la Superóxido dismutasa</b>	<b>111</b>
<b>4.7</b>	<b>Proceso de inhibición de la generación de radicales libres con la Catalasa</b>	<b>115</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>122</b>



## INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de las posibles rutas metabólicas seguidas por un compuesto	5
2	Ciclo redox de compuestos quinónicos, con formación de radicales libres del oxígeno	6
3	Sistema de las monooxigenasas de función mixta	8
4	Generación de radicales libres del oxígeno	10
5	Formación de algunas especies reactivas del oxígeno y algunas de las posibles alteraciones biológicas que pueden causar	11
6	Estructura de la toxina T-514 o Peroxisomicina A <sub>1</sub>	14
7	Esquema del método de ultracentrifugación seguido para la obtención de los microsomas	23
8	Representación gráfica de la concentración de Citocromo P-450 en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	36
9	Representación gráfica de la concentración de Citocromo P-450 en microsomas de <i>Macaca mulata</i> incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	37
10	Representación gráfica de la concentración de Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	39
11	Representación gráfica de la concentración de Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	40
12	Representación gráfica de la concentración de Citocromo b <sub>5</sub> en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	42

13	Representación gráfica de la concentración de Citocromo b5 en microsomas de <i>Macaca mulata</i> incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	43
14	Representación gráfica de la concentración de Citocromo b5 en microsomas de rata Wistar no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	44
15	Representación gráfica de la concentración de Citocromo b5 en microsomas de rata Wistar incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	45
16	Representación gráfica de la concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	47
17	Representación gráfica de la concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de <i>Macaca mulata</i> incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	48
18	Representación gráfica de la concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	50
19	Representación gráfica de la concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	51
20	Representación gráfica de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	53

21	Representación gráfica de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de <i>Macaca mulata</i> incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	54
22	Representación gráfica de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	55
23	Representación gráfica de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	56
24	Representación gráfica de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> y el Pirogalol en ausencia de sistemas enzimáticos (microsomas)	58
25	Representación gráfica de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> y el Pirogalol en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	59
26	Representación gráfica de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> y el Pirogalol en presencia de microsomas de rata Wistar	60
27	Inhibición de la generación de radicales libres del Pirogalol con las diferentes concentraciones de SOD	62
28	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (5 µg/mL) con las diferentes concentraciones de SOD	63
29	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (10 µg/mL) con las diferentes concentraciones de SOD	64
30	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (25 µg/mL) con las diferentes concentraciones de SOD	65

31	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (50 µg/mL) con las diferentes concentraciones de SOD	66
32	Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL) con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	67
33	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (5 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	69
34	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (10 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	70
35	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (25 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	71
36	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (50 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	72
37	Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL), con las diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar	73
38	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (5 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar	74
39	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (10 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar	75

40	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (25 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar	76
41	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (50 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar	77
42	Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en ausencia de sistemas enzimáticos	79
43	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (5 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa	80
44	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (10 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa	81
45	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (25 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa	82
46	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (50 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa	83
47	Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL) con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de <i>Macaca mulata</i>	85
48	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (5 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de <i>Macaca mulata</i>	86

49	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (10 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de <i>Macaca mulata</i>	87
50	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (25 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de <i>Macaca mulata</i>	88
51	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (50 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de <i>Macaca mulata</i>	89
52	Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de rata Wistar	90
53	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (5 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de rata Wistar	91
54	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (10 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de rata Wistar	92
55	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (25 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de rata Wistar	94
56	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (50 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de rata Wistar	95

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Concentraciones empleadas para la realización de las curvas de proteínas	25
2	Cantidad de cada reactivo utilizado en la determinación del Citocromo P-450	27
3	Cantidad de reactivo que fue utilizada en la determinación del Citocromo b <sub>5</sub>	28
4	Cantidad de cada reactivo utilizado en la determinación de las Hemoproteínas totales	30
5	Cantidad de cada reactivo utilizado para la determinación de la NADH Citocromo P-450 reductasa	31
6	Cantidad de cada reactivo utilizada para determinar la generación de radicales libres	33
7	Concentración del Citocromo P-450 en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	36
8	Concentración del Citocromo P-450 en microsomas de <i>Macaca mulata</i> incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	37
9	Concentración del Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	38
10	Concentración del Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	39
11	Concentración del Citocromo b <sub>5</sub> en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	41
12	Concentración del Citocromo b <sub>5</sub> en microsomas de <i>Macaca mulata</i> incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A <sub>1</sub>	42

13	Concentración del Citocromo b5 en microsomas de rata Wistar no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	44
14	Concentración del Citocromo b5 en microsomas de rata Wistar incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	45
15	Concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	47
16	Concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de <i>Macaca mulata</i> incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	48
17	Concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	49
18	Concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	50
19	Actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de <i>Macaca mulata</i> no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	52
20	Actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de <i>Macaca mulata</i> incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	53
21	Actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	55
22	Actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1	56



23	Concentración de radicales libres obtenidos en un sistema <i>in vitro</i> con la Peroxisomicina A1	57
24	Concentración de radicales libres obtenidos con la Peroxisomicina A1 y el Pirogalol en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	58
25	Concentración de radicales libres obtenidos con la Peroxisomicina A1 en presencia de microsomas de rata Wistar	59
26	Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 $\mu$ M ó 706 $\mu$ g/mL) en presencia de diferentes dosis de SOD	61
27	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (5 $\mu$ g/mL) en presencia de diferentes dosis de SOD	62
28	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (10 $\mu$ g/mL) en presencia de diferentes dosis de SOD	63
29	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (25 $\mu$ g/mL) en presencia de diferentes dosis de SOD	64
30	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (50 $\mu$ g/mL) en presencia de diferentes dosis de SOD	65
31	Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 $\mu$ M ó 706 $\mu$ g/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	67
32	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (5 $\mu$ g/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	68
33	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (10 $\mu$ g/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	69

34	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (25 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	70
35	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (50 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	71
36	Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar	73
37	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (5 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar	74
38	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (10 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar	75
39	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (25 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar	76
40	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (50 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar	77
41	Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL), con diferentes dosis de Catalasa, en ausencia de sistemas enzimáticos	79
42	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (5 µg/mL), en presencia de diferentes dosis de Catalasa	80
43	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (10 µg/mL), en presencia de diferentes dosis de Catalasa	81

44	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (25 µg/mL), en presencia de diferentes dosis de Catalasa	82
45	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (50 µg/mL), en presencia de diferentes dosis de Catalasa	83
46	Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL), con diferentes dosis de Catalasa en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	84
47	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (5 µg/mL), con diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	85
48	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (10 µg/mL), con diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	86
49	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (25 µg/mL), con diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	88
50	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A <sub>1</sub> (50 µg/mL), con diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de microsomas de <i>Macaca mulata</i>	89
51	Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL), con diferentes dosis de Catalasa, en presencia de microsomas de rata Wistar	90

52	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (5 µg/mL), con diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de microsomas de rata Wistar	91
53	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (10 µg/mL), con diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de microsomas de rata Wistar	92
54	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (25 µg/mL), con diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de microsomas de rata Wistar	93
55	Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (50 µg/mL), con diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de microsomas de rata Wistar	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
DNA	Acido desoxirribonucleico
H <sub>2</sub> O	Agua
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
cm	Centímetro
O <sub>2</sub>	Dioxígeno
e <sup>-</sup>	Electrón
etc	Etcétera
°C	Grados Celcius
g	Gramo
kg	Kilogramo
µg	Microgramo
µl	Micro litro
µM	Micromolar
mic	Microsomas
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minuto
M	Molar
n	Número de muestra
nmoles	Nanomoles

<b>NADH</b>	<b>Nicotín adenín dinucleótido reducido</b>
<b>NADPH</b>	<b>Nicotín adenín dinucleótido fosforilado reducido</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peróxido de hidrógeno</b>
<b>PA<sub>1</sub></b>	<b>Peroxisomicina A<sub>1</sub></b>
<b>pH</b>	<b>Potencial de hidrógeno</b>
<b>prot</b>	<b>Proteínas</b>
<b>(p/v)</b>	<b>Peso por volumen</b>
<b>OH<sup>-</sup></b>	<b>Radical hidroxilo</b>
<b>r. p. m.</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>SOD</b>	<b>Superóxido dismutasa</b>
<b>T</b>	<b>Toxina</b>
<b>U</b>	<b>Unidades</b>
<b>UV</b>	<b>Ultravioleta</b>
<b>VIS</b>	<b>Visible</b>
<b>Vol</b>	<b>Volumen</b>

## LISTA DE SIMBOLOS

$\pm$	Más menos
$\%$	Por ciento
$\Delta$	Diferencia

## CAPITULO 1

### INTRODUCCION

El ser humano ha buscado, desde sus *orígenes más remotos*, la forma de evitar las enfermedades, combatir las y así, prolongar su existencia. El descubrimiento de la enorme utilidad de las plantas, no sólo como fuente de alimento, vestido y techo, sino también como un medio para curar las enfermedades, condujo a la búsqueda de la medicina perfecta, la *''panacea''*, que no sólo curara, sino que también proporcionara la *eterna juventud e impidiera la muerte*. El hombre ocupado en esta lucha, aprendió la ciencia de las plantas y de la transformación de la materia, con el fin de encontrar un elixir que le confiriera vida eterna <sup>(1)</sup>.

De esta manera, los hombres desarrollaron sus mentes y pasaron del conocimiento aleatorio al racional y al pensamiento deductivo. No lograron obtener un elixir que diera la vida eterna, pero en el intento abrieron el camino para el desarrollo de la Botánica, la Química y la Farmacología.



La Farmacología es una ciencia que estudia todas las facetas de la interacción de las sustancias químicas con los sistemas biológicos.

Entre estas interacciones se incluye el estudio del mecanismo de acción, absorción, distribución, metabolismo y excreción. Considera qué efectos causan las sustancias en el organismo y también, como procesa el organismo a estas sustancias. Cuando las sustancias llevan a la curación o mejoría de las enfermedades, generalmente se denominan "fármacos". Cuando las sustancias producen daños en el organismo se denominan "tóxicos o venenos" (2).

Los seres humanos se encuentran expuestos diariamente a una gran variedad de compuestos exógenos, denominados "xenobióticos", los cuales pueden estar presentes en el medio ambiente, alimentos, bebidas, medicamentos, utensilios, etc. Algunos de estos compuestos pueden ocasionar respuestas biológicas de naturaleza farmacológica o toxicológica, cuyas características dependerán, con frecuencia, de su biotransformación en el organismo (3).

Los efectos biológicos de los compuestos exógenos se inician a través de su interacción con macromoléculas específicas de los tejidos, como son proteínas estructurales, enzimas, receptores, ácidos nucleicos, etc. En la mayoría de los casos, estas interacciones proporcionan las bases moleculares para determinar los efectos farmacológicos o toxicológicos de los xenobióticos.

Aunque algunos xenobióticos son excretados sin modificaciones, la mayoría presenta cierto grado de alteración metabólica en el organismo y la actividad y duración de sus efectos dependerá de la velocidad con la que sean biotransformados <sup>(3)</sup>.

En el organismo existen diversos sistemas enzimáticos, los cuales son necesarios para la regulación y función de compuestos endógenos. Algunas de estas enzimas también intervienen en la biotransformación de los compuestos exógenos o xenobióticos. En general, los productos del metabolismo son más hidrosolubles y, por lo tanto, más rápida y fácilmente excretables a través de la orina <sup>(3)</sup>.

Generalmente, los productos resultantes de la biotransformación de un compuesto son menos activos que el compuesto original y, a veces, incluso son inactivos, a este proceso se le conoce como "bioinactivación". Sin embargo, en ocasiones, los metabolitos pueden tener una mayor actividad que el compuesto original y a este proceso se le conoce como "bioactivación" <sup>(4)</sup>.

Aunque el metabolismo o biotransformación de xenobióticos y de compuestos endógenos, se lleva a cabo en diversos sitios del organismo, el órgano más importante, en cuanto a frecuencia, es el hígado, seguido en menor proporción por el aparato digestivo, los pulmones, la piel y los riñones.

A nivel celular, la biotransformación se realiza principalmente en el retículo endoplásmico y una pequeña parte en las mitocondrias, los lisosomas y en el citoplasma.

Cuando las membranas lipofílicas del retículo endoplásmico se aíslan, por la homogeneización y fragmentación de la célula, forman pequeñas vesículas denominadas "microsomas". Estos microsomas conservan la mayor parte de las características morfológicas y funcionales de las membranas del retículo endoplásmico que les dio origen; por lo tanto, mientras que los microsomas rugosos llevan a cabo la síntesis de proteínas, los microsomas lisos son relativamente ricos en las enzimas que participan en el metabolismo de los xenobióticos y compuestos endógenos <sup>(5)</sup>.

Las reacciones de biotransformación, especialmente las llevadas a cabo en el hígado, generalmente se agrupan en dos fases <sup>(3,6)</sup>.

En la Fase I, que generalmente involucra al sistema enzimático microsomal, se llevan a cabo las reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis del compuesto; estas reacciones pueden activarlo, inactivarlo o no cambiar su actividad.

En la Fase II, que generalmente está catalizada por enzimas microsomales, mitocondriales y citosólicas, se efectúa la conjugación con ácido glucurónico, aminoácidos y glutatión, así como la acetilación y alquilación. Las reacciones de Fase II casi siempre conducen a la inactivación del compuesto, si es que éste no ha sido inactivado desde la

Fase I. Algunos compuestos tienen grupos reactivos susceptibles de ser conjugados y, de esta manera, pueden pasar directamente a la Fase II.

La Figura 1 resume los posibles procesos de biotransformación de las sustancias <sup>(6)</sup>.

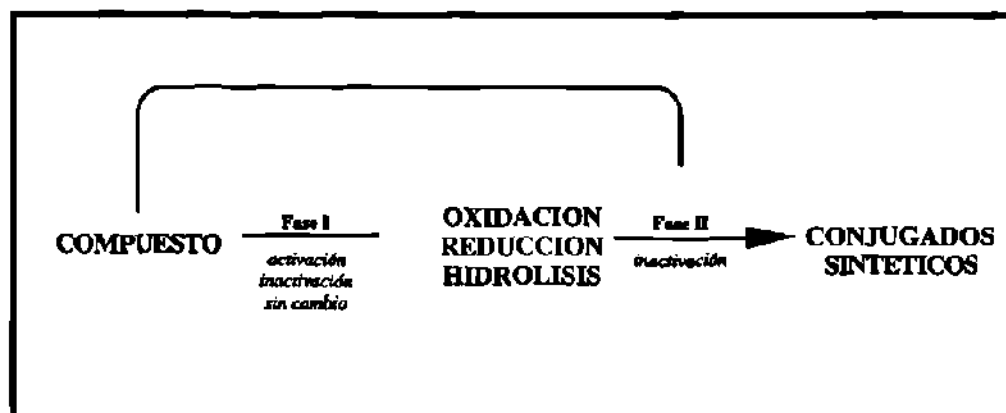


Figura 1. Esquema de las posibles rutas metabólicas seguidas por un compuesto.

En las reacciones metabólicas de la Fase I, los xenobióticos pueden ser biotransformados tanto por un mecanismo no enzimático, como por un mecanismo enzimático o, incluso, por ambos mecanismos.

Un ejemplo de los compuestos que pueden seguir un mecanismo no enzimático, son aquéllos que tienen estructura polihidroxiaromática, como las hidroxiquinonas, que se autooxidan a radicales semiquinónicos y, a consecuencia de este proceso de autooxidación, se ha observado la formación de intermediarios reactivos, los cuales son capaces de transferir un electrón al oxígeno molecular, lo que a su vez conduce a la formación de metabolitos reactivos del oxígeno. Iones metálicos, como el fierro y el cobre, facilitan estos procesos de autooxidación, mientras que

agentes reductores, como el ácido ascórbico y la vitamina E, previenen este proceso o intervienen en la regeneración al compuesto original. De esta manera, se establece un ciclo redox no enzimático (Figura 2) <sup>(7,8)</sup>.

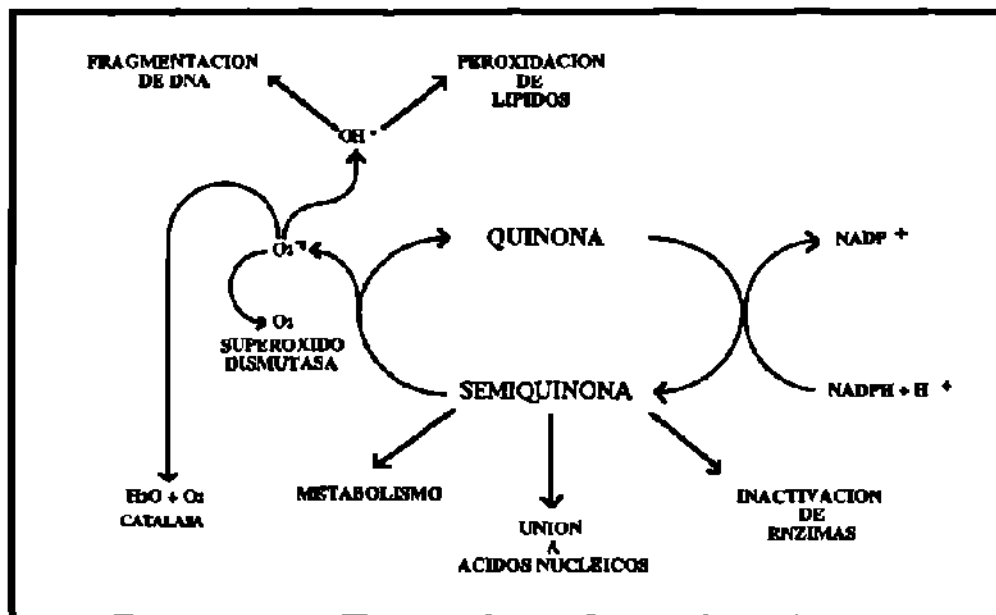


Figura 2. Ciclo redox de compuestos quinónicos, con formación de radicales libres del oxígeno.

La capacidad de una substancia para autooxidarse y generar radicales libres del oxígeno correlaciona directamente con el potencial de óxido-reducción de la molécula <sup>(9)</sup>.

Además de los mecanismos no enzimáticos mencionados anteriormente, existen mecanismos de biotransformación enzimática, los cuales son predominantes <sup>(3)</sup>.

Uno de los sistemas enzimáticos más importantes en la biotransformación de xenobióticos es el sistema microsomal hepático <sup>(3)</sup>.

Otras enzimas participantes son las deshidrogenasas mitocondriales dependientes de NADH, oxidasas de función mixta asociadas a la membrana nuclear, la xantina oxidasa y diaforasas citoplasmáticas.

Estas enzimas, además de participar en el metabolismo de xenobióticos, intervienen en el metabolismo de sustancias endógenas, tales como ácidos grasos, prostaglandinas, esteroides y vitaminas <sup>(3)</sup>.

Las enzimas microsomales requieren de oxígeno molecular y de un agente reductor (NADPH) para realizar su función, por lo que también son designadas como "monooxigenasas de función mixta". En los microsomas existen dos sistemas de monooxigenasas ligados al Citocromo P-450 <sup>(3,7)</sup>.

El primer sistema comprende a una NADPH reductasa y a cualquiera de las numerosas especies de Citocromo P-450. La reductasa es llamada NADPH Citocromo P-450 reductasa cuando transfiere un electrón al Citocromo P-450, el aceptor natural, y es llamada NADPH Citocromo C reductasa cuando el Citocromo C es usado, experimentalmente, como aceptor de electrones. Un considerable número de medicamentos, xenobióticos y compuestos endógenos son substratos de este sistema <sup>(3,7)</sup>.

El segundo sistema <sup>(3)</sup> consiste en la NADH Citocromo b5 reductasa, Citocromo b5 y Citocromo P-450. Aunque este sistema es capaz de llevar a cabo la biotransformación de compuestos sin la intervención del primer sistema, probablemente, su papel más importante

en el metabolismo de xenobióticos sea actuar sinérgicamente con la NADPH Citocromo P-450 reductasa. Anteriormente, se pensó que la Citocromo b5 reductasa era una enzima predominantemente mitocondrial <sup>(4)</sup> pero, posteriormente, se ha descubierto su coexistencia con la Citocromo P-450 reductasa en los microsomas, lo que sugiere que ambos sistemas interactúan durante la oxidación de algunos substratos. Así, durante la oxidación de estos substratos, el primer electrón necesario para la reacción oxidativa puede ser donado por el NADPH, vía el Citocromo P-450, mientras que el segundo electrón puede ser donado por el NADPH o el NADH, vía el Citocromo b5 (Figura 3) <sup>(5)</sup>.

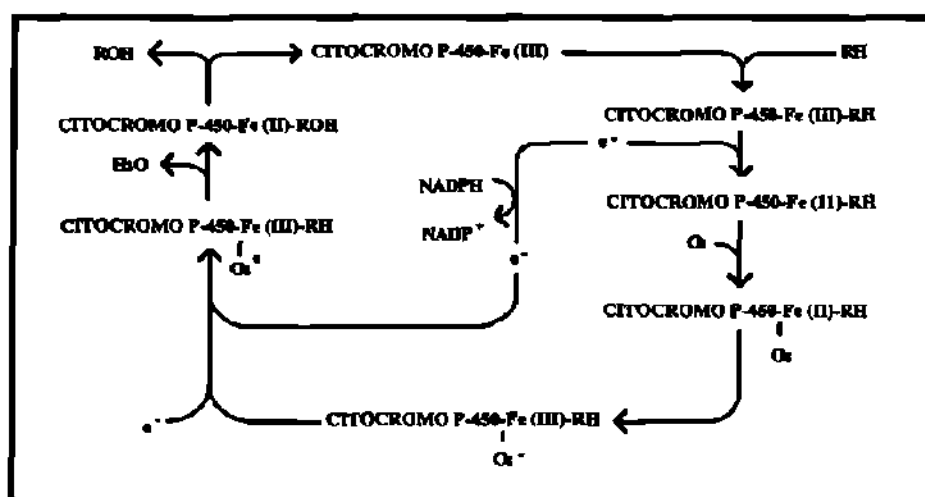


Figura 3. Sistema de las monooxigenasas de función mixta.

En general, un sustrato al ser biotransformado por el sistema de monooxigenasas de función mixta <sup>(5)</sup> sigue la siguiente reacción:



Uno de los resultados de la interacción de algunos compuestos con el sistema de monooxigenasas de función mixta, al igual que en los procesos de autooxidación, es la formación de metabolitos reactivos (8,9,10,11). Estos compuestos tienen un electrón no apareado en su orbital externo. Los compuestos con mayor probabilidad de metabolizarse a intermediarios reactivos son aquéllos con alta afinidad por electrones. Las propiedades termodinámicas hacen que los electrones no apareados busquen el formar pares, por lo que estos radicales libres son extremadamente reactivos (12).

En función del grado de oxigenación de la célula o tejido, la especie reducida a radical puede transferir un electrón del radical intermediario al oxígeno molecular, debido a que las propiedades químicas de éste hacen que pueda aceptar un electrón. El oxígeno en su estado basal tiene dos electrones no apareados, con espines electrónicos paralelos, lo que hace cinéticamente poco favorable la reducción con dos electrones y, así, al aceptar sólo un electrón conduce a la formación de radicales reactivos del oxígeno (5,7,12).

El oxígeno molecular, al aceptar un electrón genera al anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el cual puede producir peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y dióxígeno ( $O_2$ ). Además, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno pueden, en reacciones catalizadas por metales, conducir a la formación de un oxidante extremadamente potente, el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), que interviene en la peroxidación de lípidos. Esta reacción catalizada por metales es llamada ciclo de Haber-Weiss (13). La peroxidación de lípidos conduce a una reacción en cadena, donde hay liberación de más radicales



libres, que a su vez oxidan a otras moléculas y así sucesivamente, hasta que se altera la integridad celular <sup>(7)</sup>.

Existe también la generación de otros radicales libres como el radical perhidroxilo, ión hidropéroxido, ión péroxido y el ión hidroxilo (Figura 4).

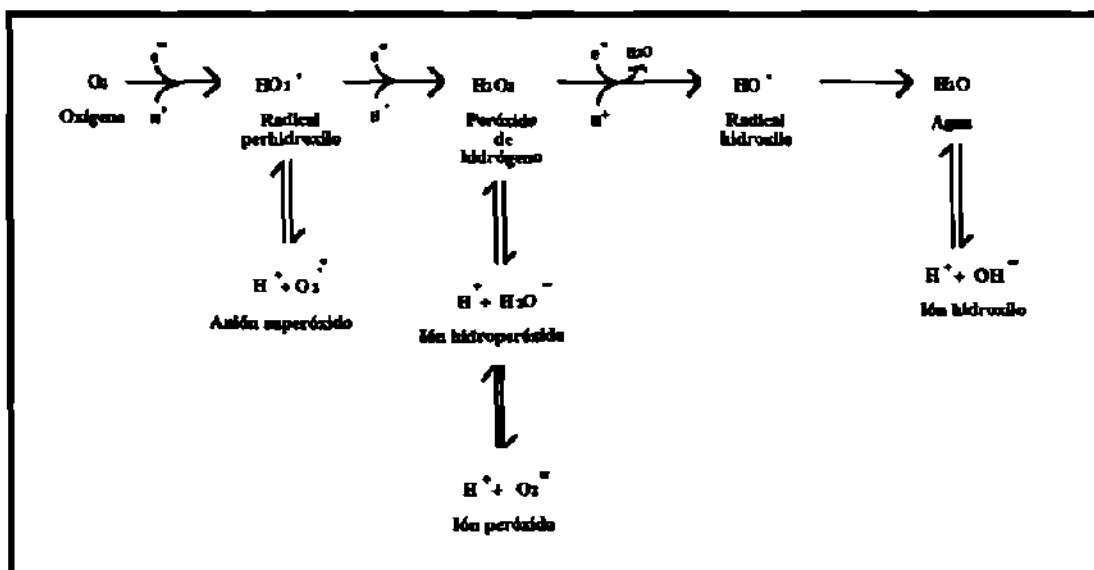


Figura 4. Generación de radicales libres del oxígeno.

Si la interacción del xenobiótico con el ciclo redox o el proceso de autooxidación continúan por un periodo sostenido, entonces se produce un acúmulo de radicales libres. Los radicales libres alteran la función celular, algunas alteraciones son: unión covalente a proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, peroxidación de lípidos, fragmentación del DNA, inactivación de enzimas, etc. (Figura 5) <sup>(12)</sup>.

Los procesos tóxicos asociados a la generación de radicales libres incluyen una gran variedad de eventos como son: mutagénesis,

carcinogénesis, envejecimiento, fotosensibilidad, problemas inmunes, hemólisis, necrosis tisular, alteraciones del metabolismo de prostaglandinas y leucotrienos, etc. (19).

Por otra parte, los radicales libres también pueden tener efecto antineoplásico, antiparasitario y bactericida.

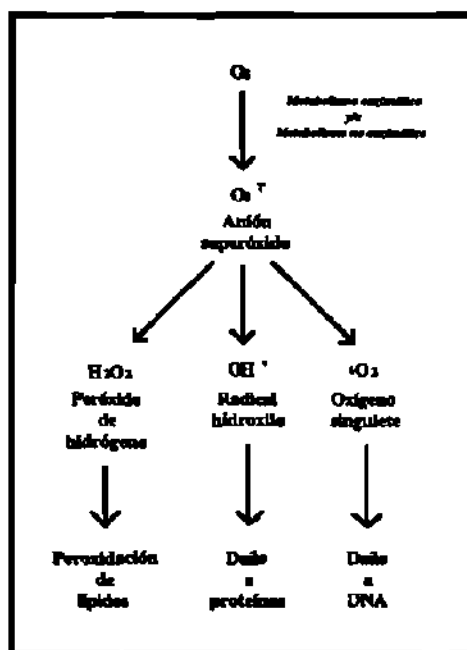


Figura 5. Formación de especies reactivas del oxígeno y algunas de las posibles alteraciones biológicas que pueden causar.

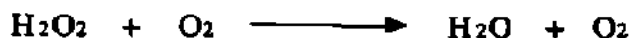
Debido a que, en sistemas biológicos aerobios, los radicales libres del oxígeno son producto de algunas reacciones metabólicas endógenas, no es sorprendente que en la célula existan sistemas de defensa contra la citotoxicidad causada por éstos.

Una de las primeras líneas de defensa está integrada por una serie de enzimas, las Superóxido dismutasas, que catalizan la dismutación del anión superóxido <sup>(13)</sup>:



Hay tres tipos de Superóxido dismutasa, asociadas a distintos metales, la hierro Superóxido dismutasa, la manganeso Superóxido dismutasa, las cuales predominan en las células procariotas, y la cobre-zinc Superóxido dismutasa, que es la enzima característica de las células eucariotas <sup>(13)</sup>.

Otra enzima, primordial en los mecanismos de defensa contra la citotoxicidad causada por los radicales libres del oxígeno, es la Catalasa, que cataliza la siguiente reacción <sup>(3,9,10)</sup>:



La Catalasa en esta reacción impide la formación del radical hidroxilo (OH·).

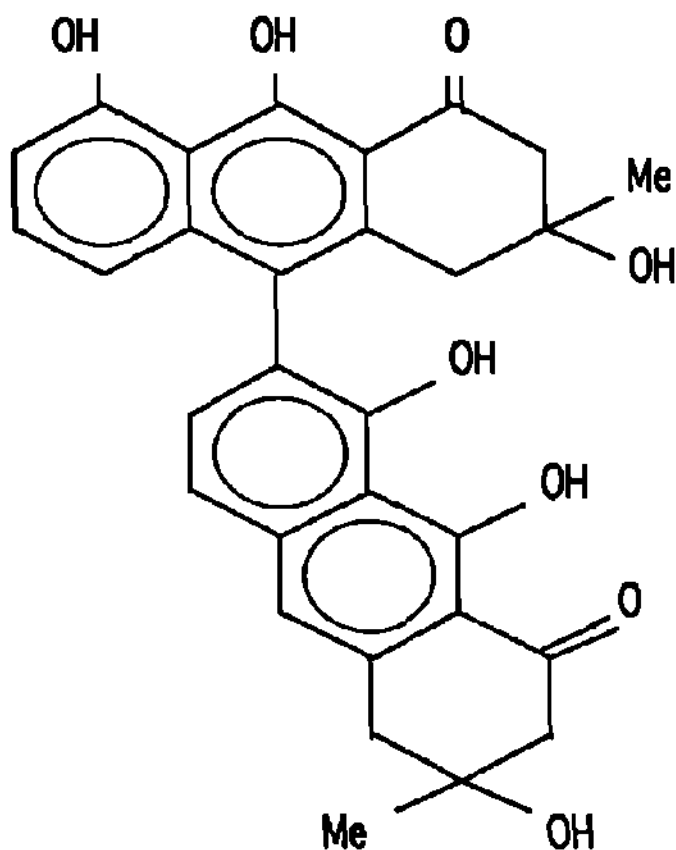
Como ya se ha mencionado (Página 2), la interacción de los xenobióticos con biomoléculas tisulares específicas proporcionan las bases moleculares que explican el efecto farmacológico y/o toxicológico de un compuesto.

Algunos de los compuestos que generan radicales libres han demostrado poseer toxicidad selectiva por ciertos órganos, y así, esta toxicidad puede ser específica para un tipo determinado de célula. La selectividad está determinada por numerosos factores, tanto de parte del tejido, como de parte del compuesto, entre los que se incluyen: la capacidad del xenobiótico de generar radicales libres, la presencia de un sistema enzimático, la relativa actividad bioquímica de los sistemas enzimáticos de defensa y la capacidad de la célula para reparar los daños (12).

Las plantas del género *Karwinskia* pertenecen a la familia de las *Rhamnaceae* y están constituidas básicamente por arbustos y árboles pequeños, se distribuyen en casi todo el territorio mexicano, en el sudoeste de Estados Unidos y en una parte de Centroamérica (14).

La ingestión del fruto de las plantas del género *Karwinskia* produce manifestaciones clínicas como polineuropatía progresiva, caracterizada por una parálisis sistémica ascendente, la cual puede terminar en muerte por paro respiratorio. Este cuadro clínico ha sido comparado con la poliomielitis, el Guillian Barré y otras polineuropatías periféricas, por lo que a la planta se le conoce vulgarmente como "Tullidora" (15,16,17). Cuando se ingieren grandes cantidades del fruto se produce una intoxicación mortal en las 72 horas inmediatas, sin manifestación de daño neuronal. La incidencia de intoxicaciones en México con el fruto de las plantas del género *Karwinskia* es alta (18,19,20,21).

En 1975, Dreyer y cols., aislaron e identificaron cuatro sustancias de la *Karwinskia humboldtiana*, con estructuras diantracénicas, a las que se les denominó T-496, T-514, T-516 y T-544, según sus pesos moleculares <sup>(22)</sup>. La Figura 6 muestra la estructura de la T-514 o Peroxisomicina A1.



**Figura 6.** Estructura de la toxina T-514 o Peroxisomicina A1.

Posteriormente, Waksman y cols., efectuaron un análisis químico y toxicológico a los extractos de los frutos de 10 especies del género *Karwinskia*, donde se demostró que, aunque todas las plantas se caracterizan por la presencia de compuestos antracenónicos, existen diferencias en el contenido de las toxinas <sup>(23,24)</sup>.

Con el objeto de evaluar los efectos de las toxinas T-496, T-514 y T-544 del género *Karwinskia*, Bermúdez y cols. realizaron estudios toxicológicos en diversas especies animales. Los resultados obtenidos indicaron que la T-496 causa diarrea cuando es administrada en forma oral. Con la T-544, se observó una polineuropatía periférica y daño neurológico, además de daño hepatorenal. Con la T-514, se observó un daño hepático, pulmonar y renal grave, en donde los estudios de microscopía electrónica en el hígado mostraron necrosis y depósitos de grasa citoplasmática que se asocian a cambios degenerativos subcelulares; las alteraciones histopatológicas en el pulmón mostraron edema, hemorragia alveolar y numerosos linfocitos polimorfonucleares, mientras que en el riñón se observó una degeneración turbia. También se encontraron manifestaciones tóxicas en músculo estriado y músculo cardiaco con estas tres toxinas <sup>(25,26)</sup>.

Por otra parte, los efectos selectivos de la T-514 y el hecho de que la curva de distribución de la letalidad mostrara una forma particularmente empinada, llevaron a Piñeyro a plantear la hipótesis de que si hubiera una toxicidad selectiva entre las células de origen benigno y las células de origen neoplásico, la T-514 pudiera ser usada como un potencial agente antineoplásico <sup>(27)</sup>.

Los estudios realizados por Piñeyro y cols. para comprobar esta hipótesis incluyeron once líneas celulares, tres de ellas benignas y ocho malignas, en las que se demostró, sin duda alguna, una toxicidad selectiva de la T-514 sobre las líneas de origen neoplásico <sup>(27)</sup>. Este hecho, llevó a Piñeyro a solicitar la patente para su uso potencial como agente antineoplásico, la cual fue otorgada primero en la Comunidad Económica Europea y, recientemente, en Estados Unidos y Japón <sup>(28,29,30)</sup>. Actualmente, este compuesto se encuentra en la fase clínica I.

Aunque todavía se desconoce su mecanismo de acción, se ha observado que la T-514 produce daño selectivo e irreversible en los peroxisomas e inhibe en forma no competitiva a la Catalasa <sup>(32)</sup>, enzima presente en estos organelos, por lo que después se le ha denominado "Peroxisomicina A1". Otros compuestos diantracénónicos relacionados con la T-514 o Peroxisomicina A1 también producen inhibición de la Catalasa y se observó que, entre mayor semejanza estructural tengan estos compuestos diantracénónicos con la T-514, mayor será la inhibición que produzcan <sup>(32)</sup>.

Por otra parte, es interesante hacer notar que, algunos de los medicamentos actualmente usados en la quimioterapia del cáncer, como la Adriamicina, Mitomicina C y la Bleomicina, son activados a radicales libres. También se tienen evidencias de que las células neoplásicas se encuentran deprimidas en algunos de sus mecanismos de defensa, al presentar deficiencias en la actividad de enzimas como la Superóxido dismutasa, Glutación y Glutación peroxidasa y, por lo tanto, son más

susceptibles a los efectos citotóxicos generados por compuestos generadores de radicales libres <sup>(33,34,35)</sup>.

Debido a que la estructura diantracénica de la T-514 o "Peroxisomicina A<sub>1</sub>" está estrechamente relacionada con compuestos polihidroxílicos aromáticos, en los cuales se ha sugerido una acción citotóxica a través de la generación de intermediarios reactivos <sup>(33,34,36)</sup>, podría considerarse que la Peroxisomicina A<sub>1</sub> es capaz de generar este tipo de radicales libres y que, posiblemente, este proceso intervenga en algunos de los efectos citotóxicos y pueda ser considerado como parte de su mecanismo de acción.

Por otra parte, es importante determinar si la Peroxisomicina A<sub>1</sub> interacciona con el sistema de las monooxigenasas de función mixta. Existen reportes que indican que compuestos con estructura semejante a la Peroxisomicina A<sub>1</sub> interaccionan con las enzimas microsomales ya mencionadas y, durante esta interacción generan radicales libres.



## **HIPOTESIS**

**La Peroxisomicina A<sub>1</sub> interacciona con el sistema enzimático microsomal y genera radicales libres como parte de su mecanismo de toxicidad celular.**

**La Peroxisomicina A<sub>1</sub> es capaz de autooxidarse y generar radicales libres, aún en ausencia de sistemas enzimáticos y este proceso también puede formar parte de su mecanismo de acción.**

## OBJETIVOS

- 1.- Estudiar la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con el sistema enzimático microsomal involucrado en la biotransformación de xenobióticos.
- 2.- Determinar si el tiempo es un factor que influya importantemente en la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con las enzimas microsomales.
- 3.- Determinar la posible autooxidación de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>.
- 4.- Evaluar si la presencia de los sistemas enzimáticos microsomales modifican el proceso de autooxidación de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>.
- 5.- Determinar si el radical hidroxilo y el anión superóxido forman parte de los radicales libres generados durante la autooxidación de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con ayuda de enzimas específicas, como son la Catalasa y la Superóxido dismutasa.

## **CAPITULO 2**

### **MATERIAL Y METODOS**

#### **2.1 MATERIAL**

##### **2.1.1 Equipo**

Espectrofotómetro UV-VIS Beckman, modelo DU-7500, con arreglo de diodos, con un controlador de la temperatura Peltier (con una variación en la temperatura de  $\pm 0.1$  °C) y con un programa para realizar cinéticas.

Cubeta de cuarzo con un trayecto óptico de 1 cm.

Ultracentrífuga Beckman L8-M.

Rotor de ángulo fijo Beckman Ti 60, serial 3301, para 60,000 r.p.m.

Potenciómetro Beckman  $\phi 50$ pH meter.

Balanza granataria Sartorius 1206 MP.

Balanza analítica Sartorius.

Tubos para ultracentrífuga de polialómero Beckman.

Homogeneizador Potter-Elvehjem con pistilo de vidrio.

### 2.1.2 Reactivos

Agua destilada

Albúmina bovina (*Sigma A-4731*)

Carbonato de sodio (*Sigma S-4132*)

Catalasa (*Sigma C-9322*)

Cianuro de sodio (*Sigma S-3296*)

Citocromo C (*Sigma C-2506*)

Cloruro de potasio (*Sigma P-5285*)

Cloruro de sodio (*Sigma S-9888*)

Ferricianuro de potasio (*Sigma P-8131*)

Fosfato de potasio monobásico (*Sigma P-5379*)

Fosfato de potasio dibásico (*Sigma P-8281*)

Hidrosulfito de sodio (*Sigma S-1256*)

Hidróxido de sodio (*Sigma S-5881*)

Metanol (*Merck 106009*)

Monóxido de carbono (*Infra UN-1016*)

NADH (*Sigma S-8129*)

NADPH (*Sigma S-1630*)

Piridina (*Merck 109728*)

Pirogalol (*Sigma P-0381*)

Peroxisomicina A<sub>1</sub>

Reactivo de Folin-Ciocalteu (*Sigma F-9252*)

Sulfato de cobre (*Sigma C-7631*)

Superóxido dismutasa (*Sigma S-4761*)

Tartrato de sodio y potasio (*Sigma S-2377*)

### **2.1.3 Material biológico**

#### **2.1.3.1 Microsomas de macaco**

Microsomas de *Macaca mulata*, obtenidos de un macho de 2 años, con un peso de 1.758 kg. y alimentación balanceada *ad libitum*.

#### **2.1.3.2 Microsomas de rata**

Microsomas de hígado de ratas Wistar macho, con un peso de  $150 \pm 20$  g. Los animales tuvieron ciclo luz-obscuridad controlado y alimentación balanceada *ad libitum*.

## **2.2 METODOS**

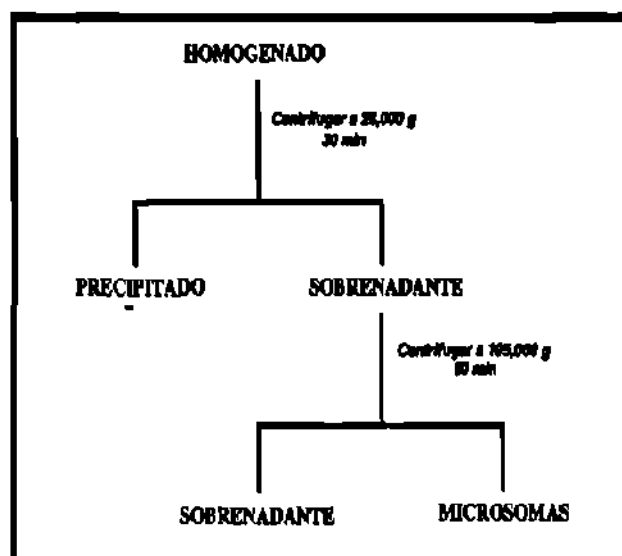
### **2.2.1 Obtención de los microsomas de macaco**

Los microsomas de macaco fueron obtenidos de un macho al que se le retiró el alimento el día previo al experimento.

El animal fue sacrificado con una inyección intracardiaca de KCl al 10% (0.3 mg/kg).

El hígado fue perfundido (KCl 0.154 M, pH 7.4), hasta eliminar los restos de sangre, con ayuda de una bomba peristáltica. Posteriormente, fue extraído, pesado y homogeneizado (KCl 0.154 M, pH 7.4) en una proporción 1:4 (p/v).

El homogenado fue ultracentrifugado mediante los pasos descritos en el Diagrama 1.



**Figura 7.** Esquema del método de ultracentrifugación seguido para la obtención de los microsomas.

Los microsomas obtenidos fueron pesados y resuspendidos (KCl 0.154 M, pH 7.4), en una proporción de 0.1 g/mL. Se colocaron en tubos Eppendorff y se almacenaron a -21 °C.

### 2.2.1 Obtención de microsomas de rata

Los microsomas de ratas fueron obtenidos de ratas macho, las cuales fueron mantenidas sin alimento desde un día antes del experimento. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, durante la mañana.

Los hígados fueron perfundidos (KCl 0.154 M, pH 7.4), hasta eliminar los restos de sangre. Posteriormente, fueron extraídos, pesados y homogeneizados en una proporción 1:4 (p/v).

El proceso siguiente fue el mismo al realizado con los microsomas de macaco.

### **2.2.3 Determinación de proteínas**

Para la determinación del contenido de proteínas en los microsomas se siguió el método de Lowry <sup>(27)</sup>, en donde el incremento en la absorbancia a 750 nm, es proporcional al incremento en la concentración de proteínas.

#### **2.2.3.1 Solución estándar de albúmina**

Se utilizó una solución estándar de albúmina bovina con una concentración de 500 µg/mL. La albúmina fue disuelta en una solución de NaOH 0.5 M.

#### **2.2.3.2 Reactivo de Lowry**

Se preparó con 1 mL de sulfato de cobre al 1%, 1 mL de tartrato de sodio y potasio al 2% y 98 mL de carbonato de sodio al 2%.

#### **2.2.3.3 Reactivo de Folín**

Se diluye el reactivo de Folín-Ciocalteus 1:1 con agua destilada.

#### **2.2.3.4 Curva de calibración**

Se determinó la concentración de proteínas para cada uno de los lotes de microsomas que se usaron en este trabajo.

Cada punto de la curva de calibración fue determinado por triplicado y el promedio de estos valores fue usado en la gráfica.

Las concentraciones empleadas en la curva de calibración se describen en la Tabla 1.

Proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ )	Albúmina ( $\text{mL}$ )	NaOH ( $\text{mL}$ )	Lowry ( $\text{mL}$ )	Folín ( $\text{mL}$ )
0	-----	1	5	0.5
25	0.05	0.95	5	0.5
50	0.1	0.9	5	0.5
100	0.2	0.8	5	0.5
150	0.3	0.7	5	0.5
200	0.4	0.6	5	0.5
250	0.5	0.5	5	0.5

**Tabla 1.** Concentraciones empleadas para la realización de las curvas de proteínas.

#### 2.2.3.5 Dilución de las muestras

Los microsomas fueron determinados por triplicado sin dilución y con diluciones 1:5 y 1:10 en NaOH 0.5M.

#### 2.2.3.6 Cálculos

La concentración de proteínas de las muestras fue interpolada de la curva de calibración obtenida al graficar el valor de absorbancia contra la concentración de proteínas de los estándares, los valores fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500).



#### **2.2.4 Preparación de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>**

Se trabajó con la Peroxisomicina A<sub>1</sub> extraída del fruto de la *Karwinskia parvifolia* recolectada en el municipio de Choix en Sinaloa, en diciembre de 1992. La extracción y purificación del fruto, así como su valoración biológica, se realizó en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León <sup>(38)</sup>.

##### **2.2.4.1 Preparación de la solución patrón**

Se preparó una solución patrón de 400 µg/mL. Se disolvieron 2 mg de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en 0.5 mL de metanol y se aforaron a 5 mL con una solución amortiguadora de fosfatos (0.2 M, pH 7.4).

A partir de esta solución patrón se tomaron alícuotas para obtener concentraciones finales de 5, 10, 25 y 50 µg/mL.

#### **2.2.5 Determinación de la actividad del Citocromo P-450**

El Citocromo P-450 es una hemoproteína que contiene una molécula de hierro-protoporfirina IX como grupo prostético. Es identificado por un pronunciado espectro de absorción, a 450 nm, cuando la hemoproteína es reducida por la adición de monóxido de carbono. Esta propiedad se atribuye a la presencia de grupos tioles como ligandos de la hemoproteína. La concentración de Citocromo P-450 reducido es una medida directa de la actividad de las monooxigenasas de función mixta presentes en los microsomas <sup>(39,40,41)</sup>.

### 2.2.5.1 Preparación de la muestra

Los microsomas se diluyeron en una solución amortiguadora de fosfatos (0.2 M, pH 7.4). Se les adicionó la Peroxisomicina A<sub>1</sub> a las diferentes concentraciones. Posteriormente, se añadió una pequeña cantidad de ditionita de sodio (1-2 mg). Se burbujeó monóxido de carbono durante 1 min. Se determinó el espectro de absorción de 400 a 500 nm y se obtuvo el pico máximo a 450 nm.

La cantidad de cada reactivo que fue usada se describe en la Tabla 2.

Concentración de Peroxisomicina A <sub>1</sub> (µg/mL)	Microsomas (µL)	Fosfatos (mL)	Peroxisomicina A <sub>1</sub> (µL)	Ditionita de sodio	Monóxido de carbono
0	300	2.7	-----	pequeña cantidad	burbujeo por 1 min
5	300	2.662	37.5	pequeña cantidad	burbujeo por 1 min
10	300	2.625	75	pequeña cantidad	burbujeo por 1 min
25	300	2.512	187.5	pequeña cantidad	burbujeo por 1 min
50	300	2.325	375	pequeña cantidad	burbujeo por 1 min

Tabla 2. Cantidad de cada reactivo utilizado en la determinación del Citocromo P-450.

### 2.2.5.2 Cálculos

Los cálculos se realizaron con la siguiente ecuación <sup>(41)</sup>:

$$\text{nmoles Citocromo P-450/mg proteína} = \frac{\Delta A (450 - 490)}{\text{mg/mL proteína}} \cdot \frac{1000}{91} \cdot \frac{\text{Vol. total}}{\text{Vol. mic.}}$$

### 2.2.6 Determinación de la actividad del Citocromo b<sub>5</sub>

El Citocromo b<sub>5</sub> es una hemoproteína presente en la fracción microsomal y mitocondrial <sup>(39)</sup>. Su concentración se determina por el espectro redox del NADH reducido contra el Citocromo oxidado. La reducción del Citocromo b<sub>5</sub> es catalizada por la enzima NADH Citocromo b<sub>5</sub> reductasa, por lo que se considera una medida directa de la actividad de esta enzima <sup>(40,41,42)</sup>.

#### 2.2.6.1 Preparación de la muestra

Los microsomas se diluyeron en una solución amortiguadora de fosfatos (0.2 M, pH 7.4). Se les adicionó la Peroxisomicina A<sub>1</sub> a las diferentes concentraciones. Se añadió NADH al 2% y la muestra se mantuvo en reposo durante 2 minutos. Se determinó el espectro de absorción de 400 a 500 nm. Se obtuvieron las diferencias entre el espectro a 424 y a 409 nm.

La cantidad usada de cada reactivo se describe en la Tabla 3.

Concentración de Peroxisomicina A <sub>1</sub> (µg/mL)	Microsomas (µL)	Fosfatos (µL)	Peroxisomicina A <sub>1</sub> (µL)	NADH (µL)
0	100	875	-----	25
5	100	862.5	12.5	25
10	100	850	25	25
25	100	812.5	62.5	25
50	100	750	125	25

Tabla 3. Cantidad de cada reactivo que fue utilizada en la determinación del Citocromo b<sub>5</sub>.

### 2.2.6.2 Cálculos

Los cálculos se realizaron con la siguiente ecuación <sup>(41)</sup>:

$$\text{nmoles Citocromo bs/mg proteína} = \frac{\Delta A (424 - 409)}{\text{mg/mL proteína}} * \frac{1000}{185} * \frac{\text{Vol. total}}{\text{Vol. mic.}}$$

### 2.2.7 Determinación de las hemoproteínas totales

En ausencia de contaminantes de otras hemoproteínas, las hemoproteínas totales son el resultado de la suma del Citocromo P-450 y del Citocromo bs. Se determinan por el espectro redox reducido con ditionita de sodio contra el hemocromógeno oxidado de la piridina en presencia de hidróxido de sodio 0.5 M <sup>(42,43)</sup>.

#### 2.2.7.1 Preparación de la muestra

Los microsomas se diluyeron en una solución amortiguadora de KCl (0.154 M, pH 7.4). Se añadieron NaOH y piridina. Posteriormente, se les adicionó una pequeña cantidad de ditionita de sodio (1-2 mg) y la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en las diferentes concentraciones. Después se añadió ferricianuro de potasio (2.5 mM) y se determinó el espectro de absorción de 530 a 600 nm.

La cantidad de cada reactivo se describe en la Tabla 4.

Concentración de Peroxisomicina A <sub>1</sub> (μg/ml)	Microsomas (μL)	KCl (μL)	NaOH (μL)	Piridina (μL)	Peroxisomicina A <sub>1</sub> (μL)	Dilución de sodio	Ferriamino de potasio (μL)
0	100	561.4	166	166	-----	problema	6.6
5	100	548.9	166	166	12.5	problema	6.6
10	100	536.4	166	166	25	problema	6.6
25	100	498.5	166	166	62.5	problema	6.6
50	100	436.4	166	166	125	problema	6.6

Tabla 4. Cantidad de cada reactivo utilizado en la determinación de las Hemoproteínas totales.

### 2.2.7.2 Cálculos

Los cálculos se realizaron con la siguiente ecuación <sup>(41)</sup>:

$$\text{nmoles Hemoproteínas/mg proteína} = \frac{\Delta A (557 - 575) * 1000 * \text{Vol. total}}{\text{mg/mL proteína} * 34.7 * \text{Vol. mic.}}$$

### 2.2.8 Determinación de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 Reductasa

La determinación de esta enzima microsomal requiere del Citocromo C como aceptor artificial de electrones. El principio de este ensayo se basa en que el Citocromo C oxidado (férico) se transforma a Citocromo C reducido (ferroso), el cual emite un espectro de absorción característico a 550 nm <sup>(40,42,43,44)</sup>.

#### 2.2.8.1 Preparación de la muestra

Los microsomas se diluyeron en una solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.6), a los que se les añadió KCN (5 mM). Posteriormente, se adicionó la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y NADPH (10 mM) y la mezcla se incubó durante 3 minutos a 37 °C. Al terminar la

incubación, se determinaron los cambios de absorción durante 5 minutos, a 550 nm.

La Tabla 5 muestra la cantidad utilizada de cada reactivo.

Concentración de Peroxisomicina A <sub>1</sub> (µg/mL)	Microsomos (µL)	Citocromo C (µL)	Ferribeta (µL)	ECN (µL)	Peroxisomicina A <sub>1</sub> (µL)	NADPH (µL)
0	100	400	380	80	-----	40
5	100	400	367.5	80	12.5	40
10	100	400	355	80	25	40
25	100	400	312.5	80	67.5	40
50	100	400	245	80	125	40

Tabla 5. Cantidad de cada reactivo utilizado para la determinación de la NADPH Citocromo P-450 reductasa.

### 2.2.8.2 Cálculos

Los cálculos se realizaron con la siguiente ecuación <sup>(41)</sup>:

$$\text{umoles Cit P-450 red/mg prot/min} = \frac{\Delta A (550/\text{min})}{\text{mg/mL proteína}} \cdot \frac{1000}{21} \cdot \frac{\text{Vol. total}}{\text{Vol. mic.}}$$

### 2.2.9 Determinación de la autooxidación y de la generación de radicales libres

La determinación de la posible autooxidación de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> fue realizada siguiendo el método descrito por Salvemini y cols. <sup>(42)</sup>. Este método requiere de Citocromo C como aceptor artificial de electrones. Se usó Pirogalol como control positivo.

### **2.2.9.1 Determinación de la autooxidación y generación de radicales libres por el pirogalol**

Los microsomas se diluyeron en una solución amortiguadora de fosfatos (0.2 M, pH 7.4). También se realizaron determinaciones sin microsomas como control. Se añadió Citocromo C (15.3  $\mu$ M) y NADPH (0.16 mM). Posteriormente, se adicionó el Pirogalol (5.6  $\mu$ M). Se determinó el cambio de absorción cada 5 minutos, durante 60 minutos.

### **2.2.9.2 Inhibición de la generación de radicales libres por el pirogalol con la Superóxido dismutasa y la Catalasa**

Se siguió el método ya mencionado, con la adición de la SOD y la Catalasa en las concentraciones siguientes:

SOD            200, 250, 300 y 400 U/mL

Catalasa      200, 250, 300 y 400 U/mL

### **2.2.9.3 Determinación de la autooxidación y generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub>**

Se siguió el método descrito para el Pirogalol, pero con la Peroxisomicina A<sub>1</sub> a diferentes concentraciones (5, 10, 25 y 50  $\mu$ g/mL). También se determinó la autooxidación en ausencia de los microsomas como control.

La Tabla 6 muestra la cantidad usada de cada reactivo.

	Microsomas ( $\mu$ L)	Citocromo C ( $\mu$ L)	Peróxido ( $\mu$ L)	Peróxido ( $\mu$ L)	Peroxisomicina ( $\mu$ L)	NADPH ( $\mu$ L)
Peróxido	----	1	383.5	50	----	66.5
Peróxido + Microsomas	100	1	383.5	50	----	66.5
Peroxisomicina 5 $\mu$ g/ $\mu$ L	----	1	424.1	----	9.4	66.5
Peroxisomicina 5 $\mu$ g/ $\mu$ L + Microsomas	100	1	324.1	----	9.4	66.5
Peroxisomicina 10 $\mu$ g/ $\mu$ L	----	1	414.7	----	18.8	66.5
Peroxisomicina 10 $\mu$ g/ $\mu$ L + Microsomas	100	1	314.7	----	18.8	66.5
Peroxisomicina 25 $\mu$ g/ $\mu$ L	----	1	386.6	----	46.9	66.5
Peroxisomicina 25 $\mu$ g/ $\mu$ L + Microsomas	100	1	286.6	----	46.9	66.5
Peroxisomicina 50 $\mu$ g/ $\mu$ L	----	1	339.7	----	93.8	66.5
Peroxisomicina 50 $\mu$ g/ $\mu$ L + Microsomas	100	1	239.7	----	93.8	66.5

Tabla 6. Cantidad de cada reactivo utilizada para determinar la generación de radicales libres.

#### 2.2.9.4 Inhibición de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con la Superóxido dismutasa y la Catalasa

Se siguió el método ya mencionado, con la adición de la SOD y la Catalasa en las concentraciones siguientes:

SOD 50, 100, 200, 250, 300 y 400 U/mL

Catalasa 25, 50, 100, 200, 250, 300 y 400 U/mL

#### 2.2.10 Preparación de los microsomas incubados

Para preparar los microsomas incubados, la Peroxisomicina A<sub>1</sub> se añadió 30 minutos antes de empezar a realizar la



determinación. Los métodos seguidos posteriormente fueron los ya mencionados.

#### **2.2.11 Análisis estadístico**

A cada una de las determinaciones realizadas se les realizó una prueba de t de Student no pareada con ayuda del programa Excell versión 4.0, incluido en el paquete computacional Microsoft Office.

## **CAPITULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL CITOCROMO P-450**

Las determinaciones del Citocromo P-450 se realizaron con diferentes concentraciones de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5, 10, 25 y 50 µg/mL), tanto en microsomas de *Macaca mulata* como en microsomas de rata Wistar. También se realizaron estas determinaciones después de incubar a los microsomas con la Peroxisomicina A<sub>1</sub> a 37 °C durante una hora.

##### **3.1.1 Actividad del Citocromo P-450 en microsomas de *Macaca mulata* no incubados e incubados**

###### **3.1.1.1 Actividad del Citocromo P-450 en microsomas de *Macaca mulata* no incubados**

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración del Citocromo P-450 en los microsomas de *Macaca mulata* no incubados se muestran en la Tabla 7.

P A1 0 µg/mL	P A1 5 µg/mL	P A1 10 µg/mL	P A1 25 µg/mL	P A1 50 µg/mL
0.678 ± 0.051	0.465 ± 0.055	0.566 ± 0.042	1.222 ± 0.058	0.765 ± 0.047
	*	*	*	
n = 200	n = 200	n = 200	n = 200	n = 200

Tabla 7. Concentración del Citocromo P-450 en microsomas de *Macaca mulata* no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Citocromo P-450/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La Figura 8 muestra la representación gráfica de las diferencias observadas en la concentración del Citocromo P-450, en relación con las diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

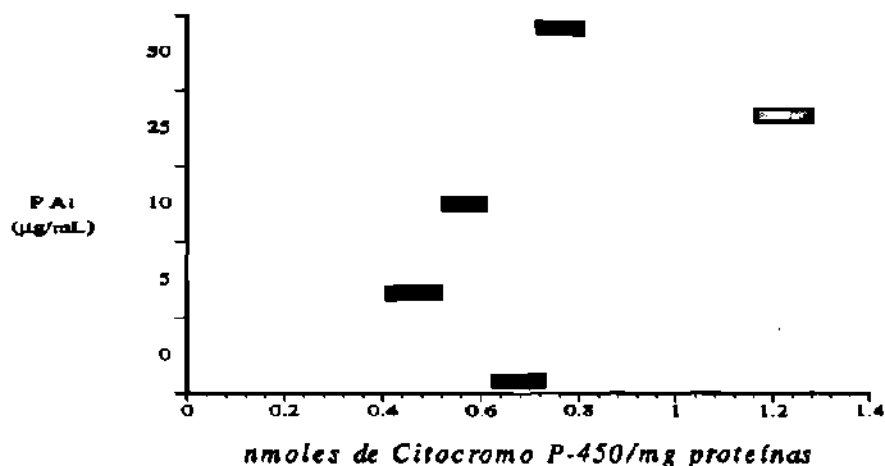


Figura 8. Representación gráfica de la concentración del Citocromo P-450 en microsomas de *Macaca mulata* no incubados, tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.1.1.2 Actividad del Citocromo P-450 en microsomas de *Macaca mulata* incubados

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

PA1 0 µg/mL	PA1 5 µg/mL	PA1 10 µg/mL	PA1 25 µg/mL	PA1 50 µg/mL
0.579 ± 0.045	0.637 ± 0.055	0.617 ± 0.056	1.298 ± 0.065	0.815 ± 0.047
			*	*
n = 200	n = 200	n = 200	n = 200	n = 200

Tabla 8. Concentración del Citocromo P-450 en microsomas de *Macaca mulata* incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Citocromo P-450/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La Figura 9 muestra la representación gráfica de los resultados.

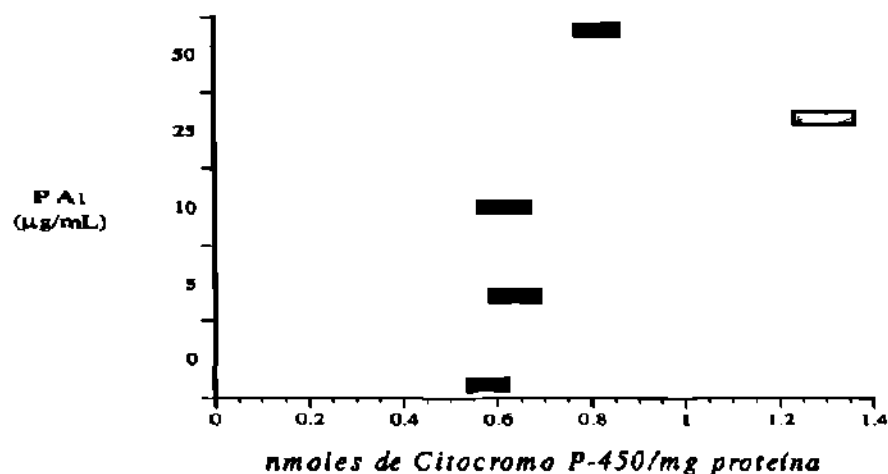


Figura 9. Representación gráfica de la concentración del Citocromo P-450 en microsomas de *Macaca mulata* incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.1.2 Actividad del Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar no incubados e incubados

#### 3.1.2.1 Actividad del Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar no incubados

Los resultados obtenidos en las determinaciones de la concentración del Citocromo P-450 en los microsomas de rata Wistar se muestran en la Tabla 9.

P A <sub>1</sub> 0 µg/mL	P A <sub>1</sub> 5 µg/mL	P A <sub>1</sub> 10 µg/mL	P A <sub>1</sub> 25 µg/mL	P A <sub>1</sub> 50 µg/mL
0.456 ± 0.039	0.447 ± 0.044	0.494 ± 0.042	0.391 ± 0.038	0.217 ± 0.047
n = 68	n = 40	n = 41	n = 63	n = 48

Tabla 9. Concentración del Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub>.

Las unidades son nmoles de Citocromo P-450/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La Figura 10 muestra la representación gráfica de las diferencias obtenidas en la actividad del Citocromo P-450, en relación con las diferentes concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub>.

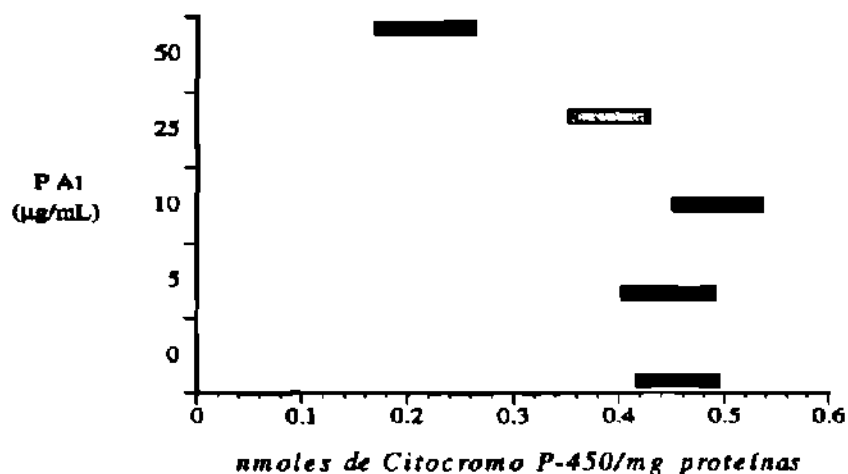


Figura 10. Representación gráfica de la concentración del Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.1.2.2 Actividad del Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar incubados

Los resultados que se observaron en la determinación de la actividad del Citocromo P-450 con estos microsomas se muestran en la Tabla 10.

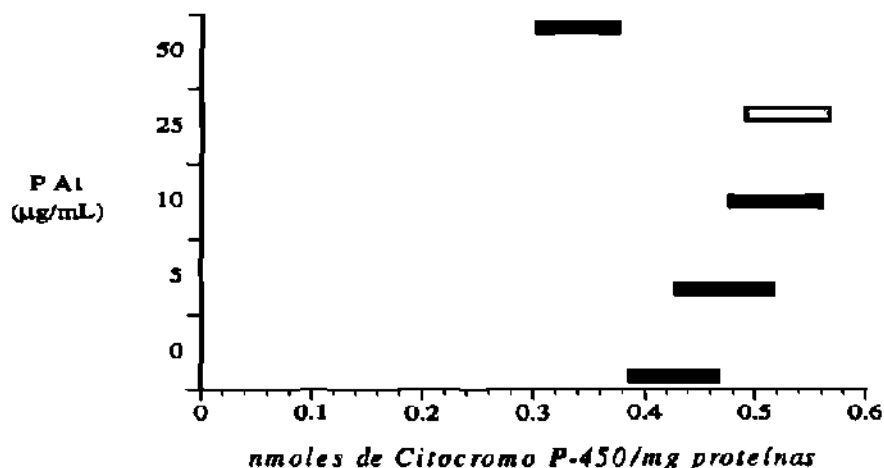
P A <sub>1</sub> 0 µg/mL	P A <sub>1</sub> 5 µg/mL	P A <sub>1</sub> 10 µg/mL	P A <sub>1</sub> 25 µg/mL	P A <sub>1</sub> 50 µg/mL
0.427 ± 0.041	0.472 ± 0.044	0.519 ± 0.042	0.529 ± 0.039	0.339 ± 0.037
		*	*	
n = 43	n = 49	n = 41	n = 53	n = 48

Tabla 10. Concentración del Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Citocromo P-450/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La Figura 11 muestra la representación gráfica de estos resultados.



**Figura 11.** Representación gráfica de la concentración del Citocromo P-450 en microsomas de rata Wistar incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CITOCROMO $b_5$ REDUCTASA

Las determinaciones de la enzima Citocromo  $b_5$  reductasa fueron realizadas bajo las mismas condiciones experimentales usadas en la determinación del Citocromo P-450, es decir, en microsomas no incubados e incubados de *Macaca mulata* y rata Wistar y las concentraciones de Peroxisomicina A1 fueron 5, 10, 25 y 50 µg/mL.

### 3.2.1 Actividad de la Citocromo b<sub>5</sub> reductasa en microsomas de *Macaca mulata* no incubados e incubados

#### 3.2.1.1 Actividad de la Citocromo b<sub>5</sub> reductasa en microsomas de *Macaca mulata* no incubados

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración del Citocromo b<sub>5</sub> con los microsomas de *Macaca mulata* no incubados se muestran en la Tabla 11.

P A1 0 µg/mL	P A1 5 µg/mL	P A1 10 µg/mL	P A1 25 µg/mL	P A1 50 µg/mL
0.277 ± 0.056	0.201 ± 0.051	0.343 ± 0.045	0.359 ± 0.063	0.748 ± 0.075
		*	*	*
n = 200	n = 200	n = 200	n = 200	n = 200

Tabla 11. Concentración del Citocromo b<sub>5</sub> en microsomas de *Macaca mulata* no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Cit. b<sub>5</sub>/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La Figura 12 muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos con los microsomas no incubados, en la determinación de la actividad de la NADH Citocromo b<sub>5</sub> reductasa.



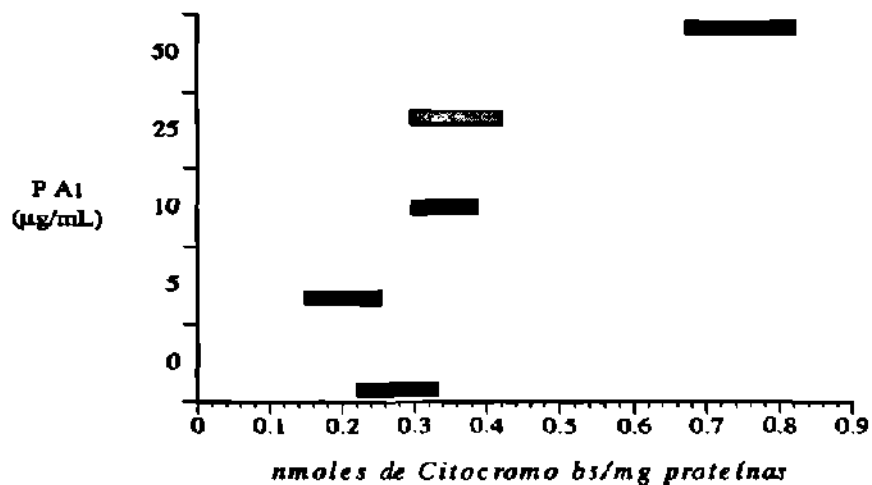


Figura 12. Representación gráfica de la concentración del Citocromo b5 en microsomas de *Macaca mulata* no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.2.1.2 Actividad de la Citocromo b5 reductasa en microsomas de *Macaca mulata* incubados

Los resultados obtenidos con los microsomas incubados de *Macaca mulata* se muestran en la Tabla 12.

PA1 0 µg/mL	PA1 5 µg/mL	PA1 10 µg/mL	PA1 25 µg/mL	PA1 50 µg/mL
0.231 ± 0.047	0.164 ± 0.044	0.318 ± 0.033	0.427 ± 0.041	0.836 ± 0.051
		*	*	*
n = 200	n = 200	n = 200	n = 200	n = 200

Tabla 12. Concentración del Citocromo b5 en microsomas de *Macaca mulata* incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmols de Cit. b5/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

En la Figura 13 se muestra la representación gráfica de los resultados.

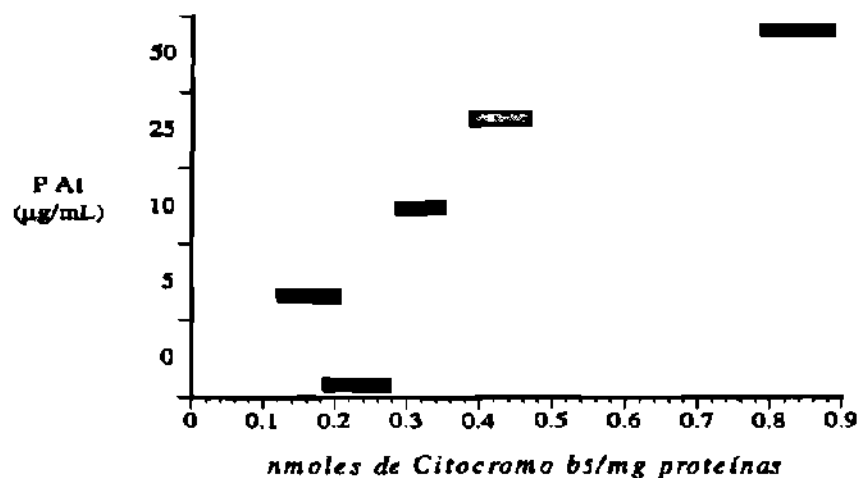


Figura 13. Representación gráfica de la concentración del Citocromo b5 en microsomos de *Macaca mulatta* incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.2.2 Actividad de la Citocromo b5 reductasa en microsomos de rata Wistar no incubados e incubados

#### 3.2.2.1 Actividad de la Citocromo b5 reductasa en microsomos de rata Wistar no incubados

Los resultados obtenidos sobre la actividad enzimática de la NADH Citocromo b5 reductasa con los microsomos no incubados de rata Wistar se muestran en la Tabla 13.

PA1 0 µg/mL	PA1 5 µg/mL	PA1 10 µg/mL	PA1 25 µg/mL	PA1 50 µg/mL
0.182 ± 0.034	0.067 ± 0.024	0.060 ± 0.023	0.068 ± 0.030	0.227 ± 0.051
	*	*	*	
n = 140	n = 50	n = 50	n = 50	n = 50

Tabla 13. Concentración del Citocromo b5 en microsomas de rata Wistar no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Cit. b5/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La Figura 14 muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos con los microsomas no incubados de rata Wistar.

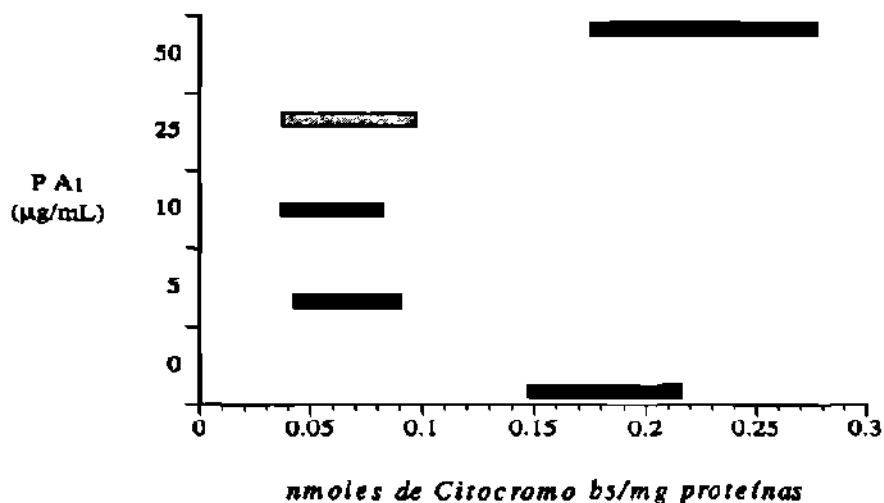


Figura 14. Representación gráfica de la concentración del Citocromo b5 en microsomas de rata Wistar no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.2.2.2 Actividad de la Citocromo b<sub>5</sub> reductasa en microsomas de rata Wistar incubados

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

PA1 0 µg/mL	PA1 5 µg/mL	PA1 10 µg/mL	PA1 25 µg/mL	PA1 50 µg/mL
0.198 ± 0.032	0.048 ± 0.023	0.064 ± 0.022	0.209 ± 0.033	0.350 ± 0.035
	*	*		*
n = 30	n = 30	n = 30	n = 30	n = 30

Tabla 14. Concentración del Citocromo b<sub>5</sub> en microsomas de rata Wistar incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Cit. b<sub>5</sub>/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La Figura 15 muestra la representación gráfica de los resultados.

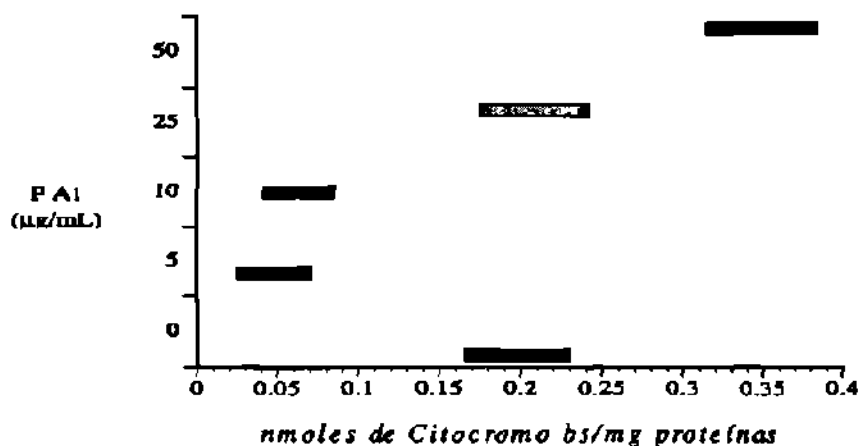


Figura 15. Representación gráfica de la concentración del Citocromo b<sub>5</sub> en microsomas de rata Wistar incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### **3.3 DETERMINACION DE LAS HEMOPROTEINAS TOTALES**

Las determinaciones para evaluar la cantidad de Hemoproteínas totales fueron realizadas con las mismas condiciones bajo las que se realizaron las determinaciones enzimáticas anteriores, es decir, las concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub> usadas fueron 5, 10, 25 y 50 µg/mL, los microsomas, tanto de *Macaca mulata* como de rata Wistar también fueron no incubados e incubados.

#### **3.3.1 Determinación de la concentración de las Hemoproteínas totales en microsomas de *Macaca mulata* no incubados e incubados**

##### **3.3.1.1 Determinación de la concentración de las Hemoproteínas totales en microsomas de *Macaca mulata* no incubados**

Los resultados obtenidos en las determinaciones realizadas con los microsomas de *Macaca mulata* no incubados se muestran en la Tabla 15.

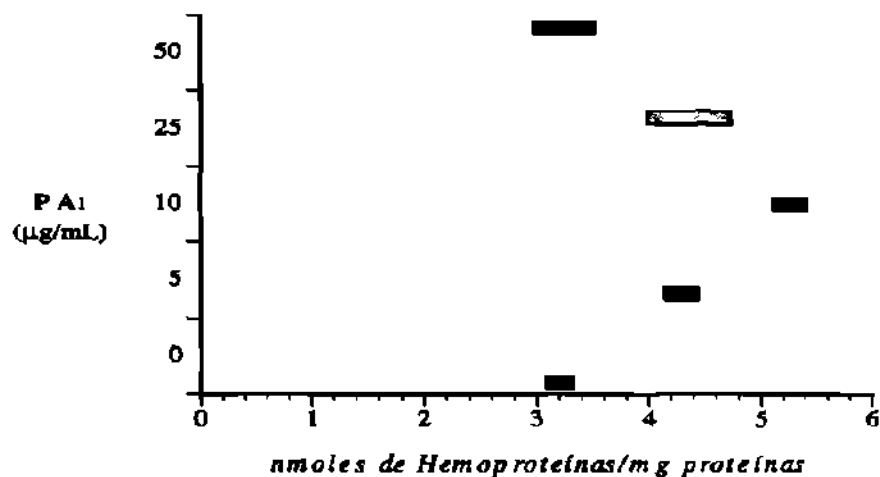
P A1 0 µg/mL	P A1 5 µg/mL	P A1 10 µg/mL	P A1 25 µg/mL	P A1 50 µg/mL
3.208 ± 0.126	4.289 ± 0.147	5.267 ± 0.155	4.362 ± 0.375	3.254 ± 0.271
	*	*	*	
n = 200	n = 200	n = 200	n = 200	n = 200

**Tabla 15.** Concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de *Macaca mulata* no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Hemoproteínas/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

Estos resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 16.



**Figura 16.** Representación gráfica de la concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de *Macaca mulata* no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.3.1.2 Determinación de la concentración de las Hemoproteínas totales en microsomas de *Macaca mulata* incubados

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 16.

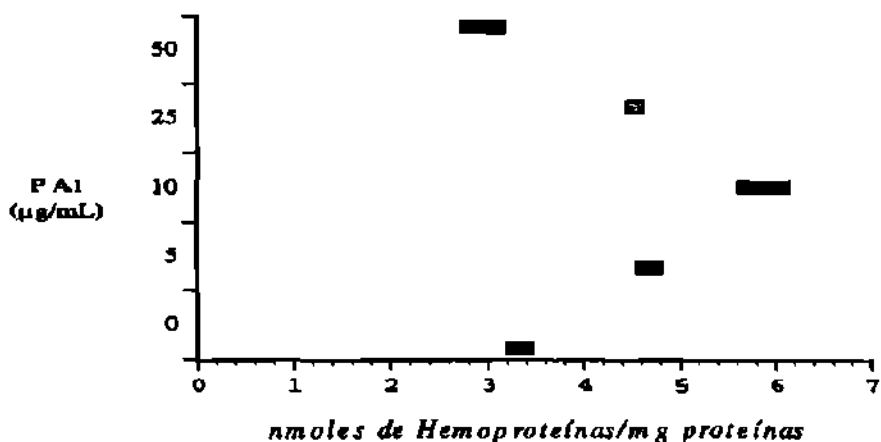
P A1 0 $\mu\text{g/mL}$	P A1 5 $\mu\text{g/mL}$	P A1 10 $\mu\text{g/mL}$	P A1 25 $\mu\text{g/mL}$	P A1 50 $\mu\text{g/mL}$
3.331 $\pm$ 0.134	4.687 $\pm$ 0.134	5.887 $\pm$ 0.267	4.543 $\pm$ 0.085	2.978 $\pm$ 0.226
	*	*	*	
n = 200	n = 200	n = 200	n = 200	n = 200

**Tabla 16.** Concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de *Macaca mulata* incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Hemoproteínas/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La Figura 17 muestra los resultados en forma gráfica.



**Figura 17.** Representación gráfica de la concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de *Macaca mulata* incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.3.2 Determinación de la concentración de las Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar no incubados e incubados

#### 3.3.2.1 Determinación de la concentración de las Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar no incubados

Los resultados obtenidos con los microsomas de rata Wistar no incubados se muestran en la Tabla 17.

PA1 0 µg/mL	PA1 5 µg/mL	PA1 10 µg/mL	PA1 25 µg/mL	PA1 50 µg/mL
1.759 ± 0.418	3.882 ± 0.446	6.031 ± 0.091	4.563 ± 0.367	3.179 ± 0.212
	*	*	*	*
n = 110	n = 110	n = 110	n = 110	n = 110

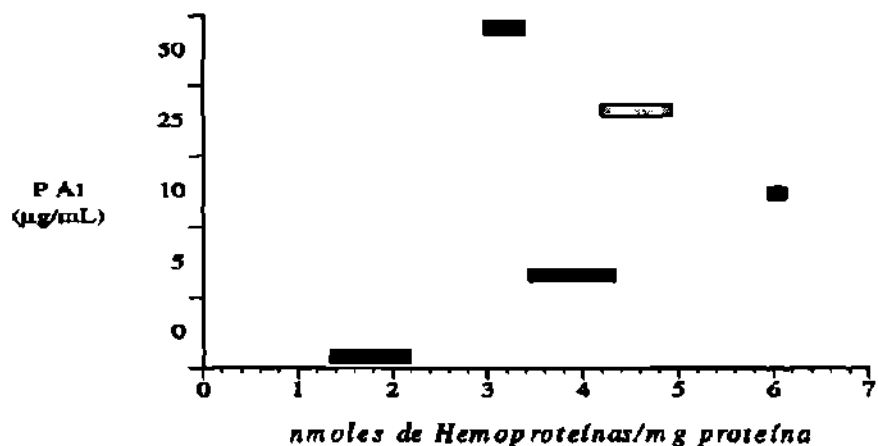
**Tabla 17.** Concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Hemoproteínas/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La Figura 18 muestra los resultados de una manera gráfica.





**Figura 18.** Representación gráfica de la concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.3.2.2 Determinación de la concentración de las Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar incubados

Los resultados se muestran en la Tabla 18.

P A1 0 µg/mL	P A1 5 µg/mL	P A1 10 µg/mL	P A1 25 µg/mL	P A1 50 µg/mL
3.258 ± 0.172	5.730 ± 0.131	7.615 ± 0.283	5.331 ± 0.097	3.161 ± 0.292
	*	*	*	
n = 110	n = 110	n = 110	n = 110	n = 110

**Tabla 18.** Concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmol de Hemoproteínas/mg proteínas.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

Los resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 19.

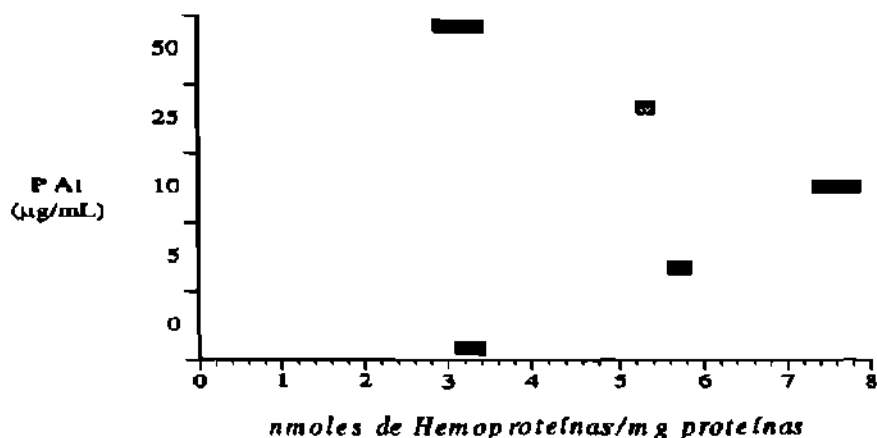


Figura 19. Representación gráfica de la concentración de Hemoproteínas totales en microsomas de rata Wistar incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA NADPH CITOCROMO P-450 REDUCTASA

La NADPH Citocromo P-450 reductasa es una importante enzima del sistema enzimático microsomal de las monooxigenasas de función mixta y para su determinación se usa al Citocromo C como aceptor de electrones. Las variables utilizadas en las determinaciones de esta enzima fueron las mismas que se utilizaron anteriormente. Se usaron microsomas de *Macaca mulata* y de rata Wistar, no incubados e incubados. Las concentraciones de Peroxisomicina A1 utilizadas fueron 5, 10, 25 y 50 µg/mL.

### 3.4.1 Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomas de *Macaca mulata* no incubados e incubados

#### 3.4.1.1 Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomas de *Macaca mulata* no incubados

Los resultados de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa obtenidos con los microsomas de *Macaca mulata* no incubados se muestran en la Tabla 19.

P A1 0 µg/mL	P A1 5 µg/mL	P A1 10 µg/mL	P A1 25 µg/mL	P A1 50 µg/mL
5.705 ± 0.144	6.251 ± 0.121	6.505 ± 0.162	8.602 ± 0.197	9.103 ± 0.144
	*	*	*	*
n = 50	n = 50	n = 50	n = 50	n = 50

**Tabla 19.** Actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de *Macaca mulata* no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Cit. P-450 red/mg proteínas/min.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La representación gráfica de los resultados se muestra en la Figura 20.

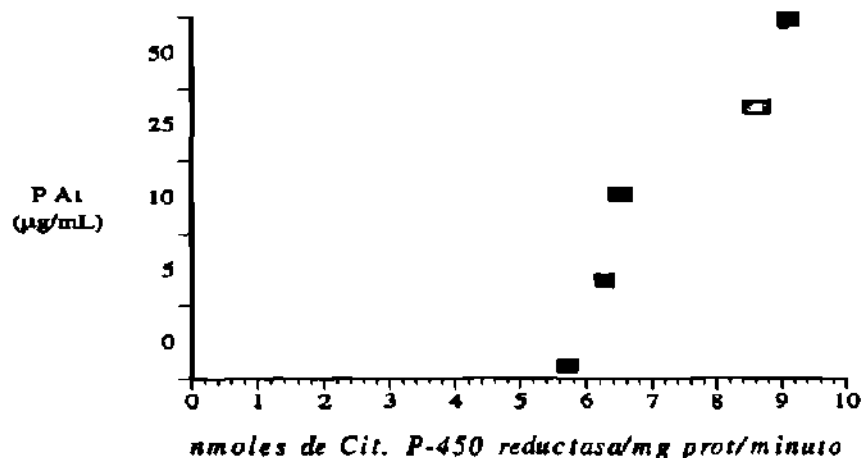


Figura 20. Representación gráfica de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de *Macaca mulata* no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.4.1.2 Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomas de *Macaca mulata* incubados

Los resultados de los microsomas de *Macaca mulata* incubados se muestran en la Tabla 20.

P A1 0 µg/mL	P A1 5 µg/mL	P A1 10 µg/mL	P A1 25 µg/mL	P A1 50 µg/mL
6.428 ± 0.168	7.118 ± 0.135	7.947 ± 0.117	9.283 ± 0.143	9.153 ± 0.261
	*	*	*	*
n = 50	n = 50	n = 50	n = 50	n = 50

Tabla 20. Actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de *Macaca mulata* incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmol de Cit. P-450 red./mg proteínas/min.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

En la Figura 21 se muestra la representación gráfica de estos resultados.

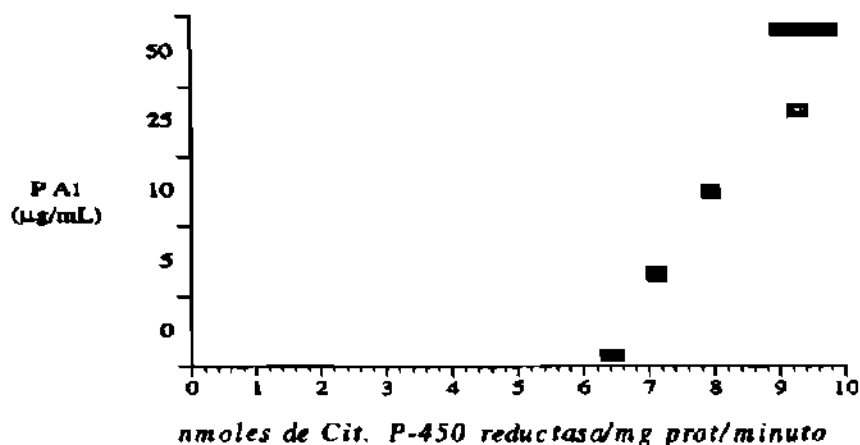


Figura 21. Representación gráfica de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomos de *Macaca mulata* incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.4.2 Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomos de rata Wistar no incubados e incubados

#### 3.4.2.1 Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomos de rata Wistar no incubados

Los resultados obtenidos en las determinaciones de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa con los microsomos de rata Wistar no incubados se muestran en la Tabla 21.

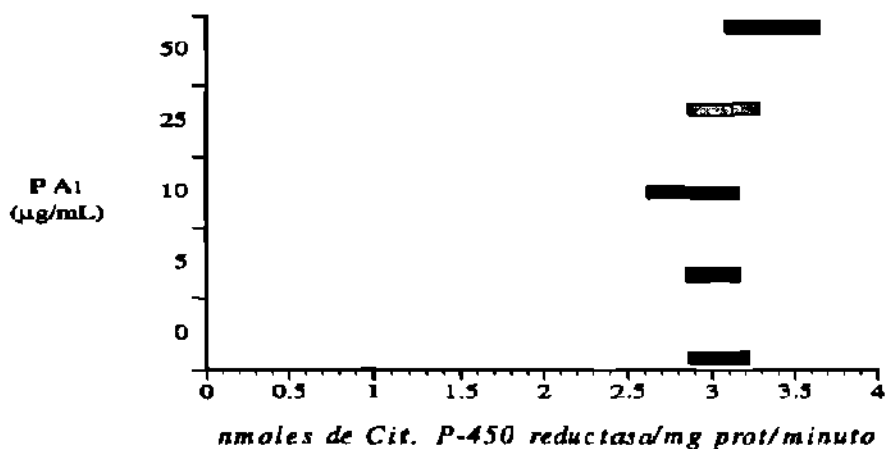
P A1 0 $\mu\text{g/mL}$	P A1 5 $\mu\text{g/mL}$	P A1 10 $\mu\text{g/mL}$	P A1 25 $\mu\text{g/mL}$	P A1 50 $\mu\text{g/mL}$
3.046 $\pm$ 0.179	3.017 $\pm$ 0.157	2.899 $\pm$ 0.273	3.087 $\pm$ 0.210	3.479 $\pm$ 0.284
n = 50	n = 50	n = 50	n = 50	n = 50

**Tabla 21.** Actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Cit. P-450 red./mg proteínas/min.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La Figura 22 muestra la representación gráfica de estos resultados.



**Figura 20.** Representación gráfica de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar no incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.4.2.2 Actividad de la Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar incubados

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 22.

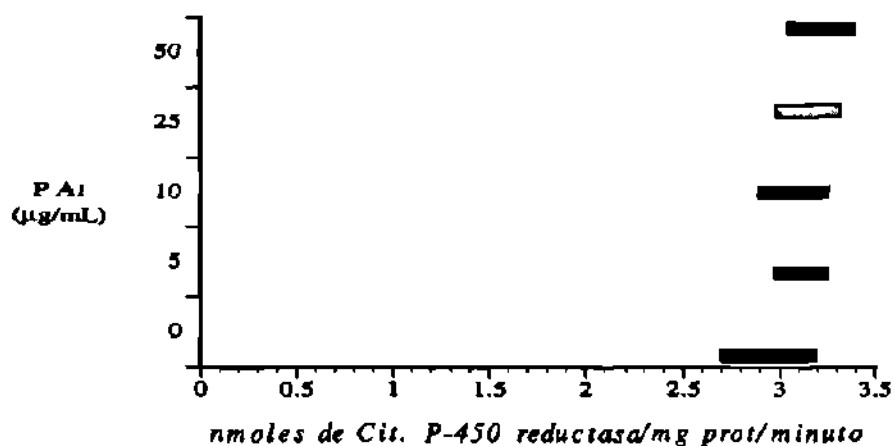
P A1 0 µg/mL	P A1 5 µg/mL	P A1 10 µg/mL	P A1 25 µg/mL	P A1 50 µg/mL
1.898 ± 0.196	3.110 ± 0.138	3.074 ± 0.180	3.151 ± 0.169	3.216 ± 0.175
n = 50	n = 50	n = 50	n = 50	n = 50

**Tabla 22.** Actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

Las unidades son nmoles de Cit. P-450 red./mg proteínas/min.

\* Indica una diferencia significativa con respecto al control, donde  $p < 0.001$ .

La Figura 23 muestra la representación gráfica de estos resultados.



**Figura 23.** Representación gráfica de la actividad de la NADPH Citocromo P-450 reductasa en microsomas de rata Wistar incubados tratados con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1.

### 3.5 PROCESO DE AUTOOXIDACION Y GENERACION DE RADICALES LIBRES

El proceso de autooxidación y generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> se evaluó tanto en ausencia de los sistemas enzimáticos aportados por los microsomas, como en presencia de los microsomas de *Macaca mulata* y rata Wistar.

Las concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub> fueron 5, 10, 25 y 50 µg/mL, que corresponden a 9.7, 19.5, 48.6 y 97.3 µM respectivamente. Se usó el Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL) como control positivo. El proceso de autooxidación fue seguido durante una hora.

#### 3.5.1 Generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol en ausencia de sistemas enzimáticos (microsomas).

La Tabla 23 muestra la concentración de radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol, expresadas en nmoles/mL/hr.

PIROGALOL 706 µg/mL	PA <sub>1</sub> 5 µg/mL	PA <sub>1</sub> 10 µg/mL	PA <sub>1</sub> 25 µg/mL	PA <sub>1</sub> 50 µg/mL
87.57 ± 3.82	40.36 ± 2.31	66.99 ± 2.98	134.79 ± 2.54	140.71 ± 3.08

Tabla 23. Concentración de radicales libres obtenidos en un sistema *in vitro* con la Peroxisomicina A<sub>1</sub>. El Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL) es el control positivo.

Las unidades son nmoles/mL/hr.

\* Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.



La Figura 24 muestra la generación de radicales libres, en base a las diferencias de absorbancia en relación al tiempo.

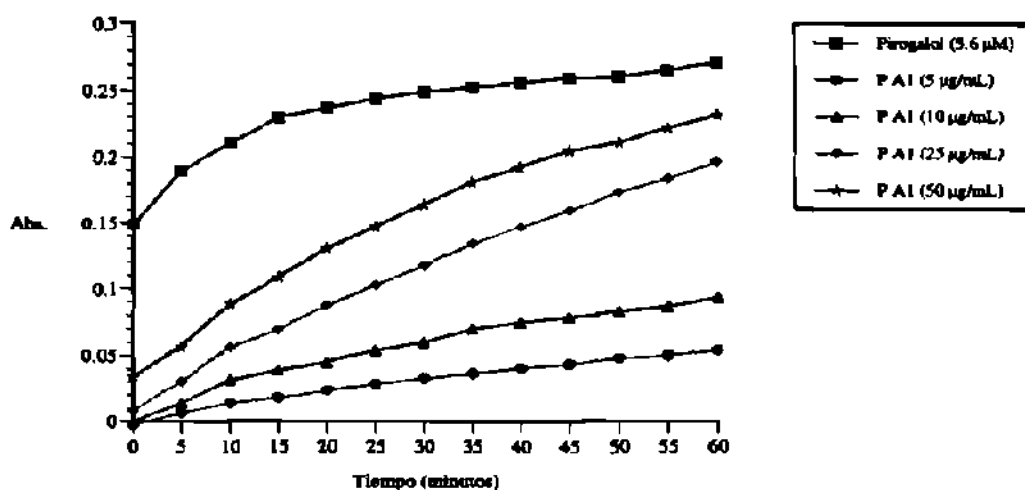


Figura 24. Representación gráfica de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1 y el Pirogalol en ausencia de sistemas enzimáticos (microsomas).

### 3.5.2 Generación de radicales libres por la Peroxisomicina A1 y el Pirogalol en presencia de microsomas de *Macaca mulata*

La cantidad de radicales libres que fue se muestra en la Tabla 24.

PIROGALOL 706 µg/mL	PA1 5 µg/mL	PA1 10 µg/mL	PA1 25 µg/mL	PA1 50 µg/mL
16.05 ± 0.32	17.18 ± 0.54	19.75 ± 1.02	32.22 ± 1.31	38.17 ± 1.56

Tabla 24. Concentración de radicales libres obtenidos con la Peroxisomicina A1 y el Pirogalol en presencia de microsomas de *Macaca mulata*. El Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL) es el control positivo. Las unidades son nmoles/mL/hr.

\* Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 25 muestra los resultados en base a las diferencias en la absorbancia.

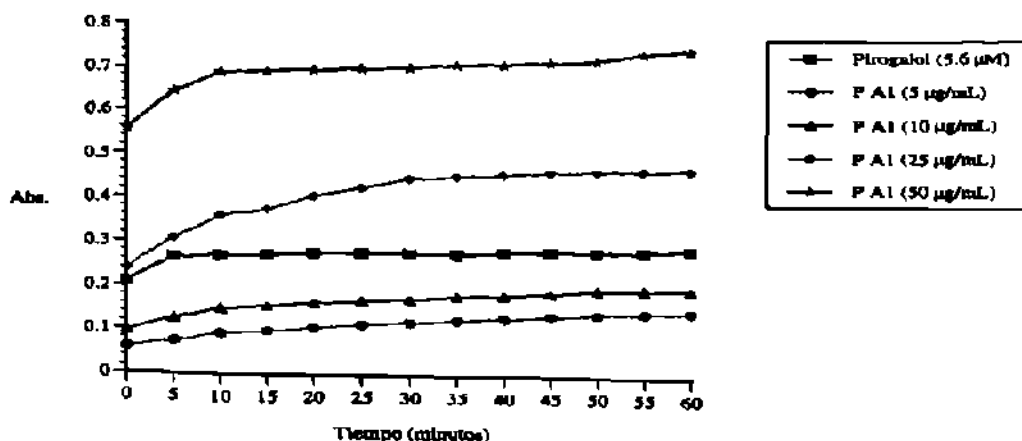


Figura 25. Representación gráfica de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

### 3.5.3 Generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol en presencia de microsomas de rata Wistar

La cantidad de radicales libres generada por el Pirogalol y la Peroxisomicina A<sub>1</sub> se muestra en la Tabla 25.

PIROGALOL 706 μg/mL	PA <sub>1</sub> 5 μg/mL	PA <sub>1</sub> 10 μg/mL	PA <sub>1</sub> 25 μg/mL	PA <sub>1</sub> 50 μg/mL
47.17 ± 1.12	28.38 ± 2.09	34.89 ± 2.67	50.23 ± 3.21	56.06 ± 0.81

Tabla 25. Concentración de radicales libres obtenidos con la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en presencia de microsomas de rata Wistar. El Pirogalol (5.6 μM ó 706 μg/mL) es el control positivo. Las unidades son nmoles/mL/hr.

\* Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La generación de radicales libres en presencia de los microsomas de rata Wistar se presenta en la Figura 26.

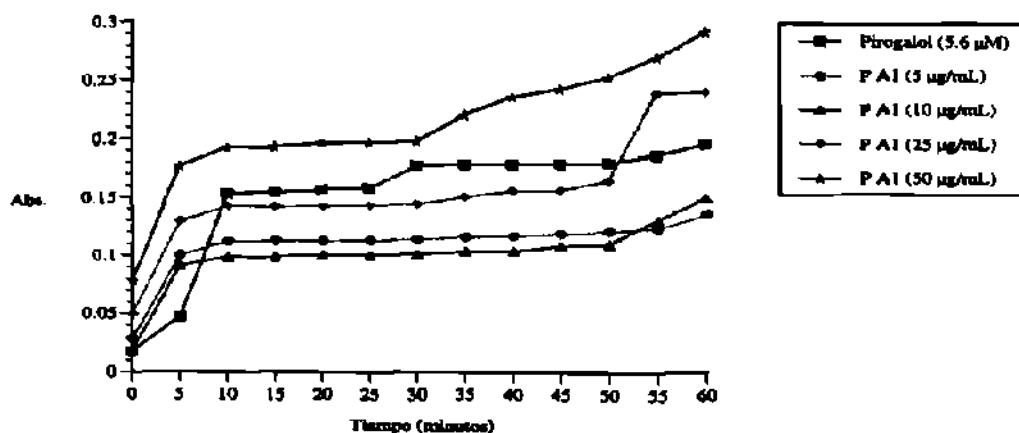


Figura 26. Representación gráfica de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol en presencia de microsomas de rata Wistar.

### 3.6 PROCESO DE INHIBICION DE LA AUTOOXIDACION Y GENERACION DE RADICALES LIBRES DE LA PEROXISOMICINA A<sub>1</sub> POR LA SUPEROXIDO DISMUTASA

Durante la evaluación del proceso de inhibición de la generación de radicales libres con la Superóxido dismutasa (SOD), las condiciones experimentales fueron las mismas que se siguieron durante el proceso de generación de radicales libres. Las concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub> y de Pirogalol fueron las mismas y el periodo de evaluación también.

Las concentraciones de SOD utilizadas para la inhibición del anión superóxido fueron 200, 250, 300 y 400 U/mL en ausencia de microsomas y de 50, 100, 150 y 200 U/mL en presencia de microsomas de macaco y de rata.

### 3.6.1 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en ausencia de sistemas enzimáticos (microsomas).

Se evaluó la inhibición de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> por la Superóxido dismutasa. El control positivo fue el Pirogalol.

#### 3.6.1.1 Efecto inhibitorio de la SOD sobre la generación de los radicales libres del Pirogalol en ausencia de sistemas enzimáticos

Los resultados de la inhibición de los radicales libres producidos por el Pirogalol (5.6  $\mu$ M ó 706  $\mu$ g/mL), con las diferentes concentraciones de la SOD, se muestran en la Tabla 26.

SOD	Radicales libres amoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	87.57 $\pm$ 3.82	0
200 U/mL	81.36 $\pm$ 1.46	7.1
250 U/mL	56.64 $\pm$ 2.03	35.3
300 U/mL	51.29 $\pm$ 1.88	41.4
400 U/mL	35.07 $\pm$ 2.59	59.9

**Tabla 26.** Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6  $\mu$ M ó 706  $\mu$ g/mL) en presencia de diferentes dosis de SOD.

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 27 muestra en forma gráfica el efecto inhibitorio producido con la SOD sobre los radicales libres generados por el Pirogalol.

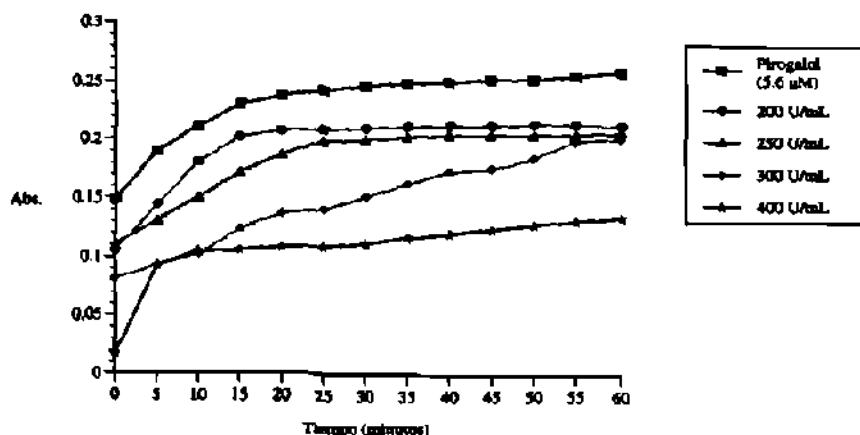


Figura 27. Inhibición de la generación los radicales libres del Pirogalol con las diferentes concentraciones de SOD.

### 3.6.1.2 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de los radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 μg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos

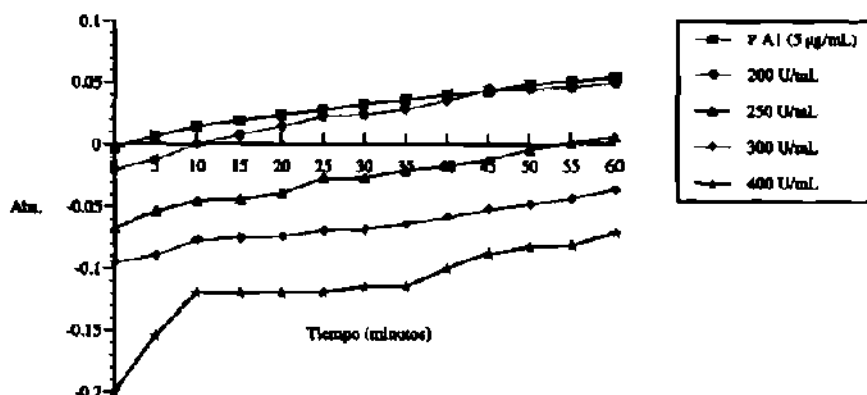
Los resultados del efecto inhibitorio producido por la SOD en la generación de los radicales libres generados por la concentración más baja de Peroxisomicina A<sub>1</sub> se muestran en la Tabla 27.

SOD	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	40.36 ± 2.31	0
200 U/mL	29.71 ± 3.29	26.4
250 U/mL	3.43 ± 1.67	91.5
300 U/mL	0	100
400 U/mL	0	100

Tabla 27. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 μg/mL), en presencia de diferentes dosis de SOD.

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 28 muestra la representación gráfica de la inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub>.



**Figura 28.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 µg/mL) con las diferentes concentraciones de SOD.

### 3.6.1.3 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de los radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos

Los resultados se muestran en la Tabla 28.

SOD	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	66.99 ± 2.98	0
200 U/mL	48.93 ± 3.25	26.9
250 U/mL	40.57 ± 2.28	39.4
300 U/mL	20.36 ± 2.93	69.9
400 U/mL	0	100

**Tabla 28.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL), en presencia de diferentes dosis de SOD.

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 29 muestra los resultados de la inhibición producida por la SOD en forma gráfica.

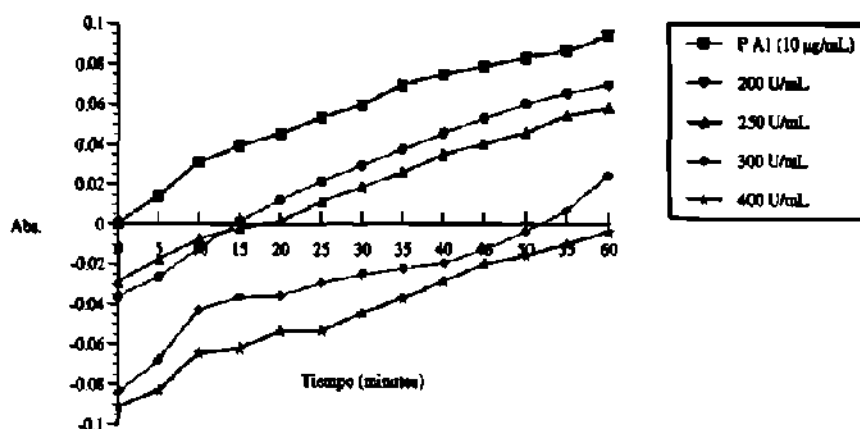


Figura 29. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (10 µg/mL) con las diferentes concentraciones de SOD.

#### 3.6.1.4 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de los radicales libres por la Peroxisomicina A1 (25 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos

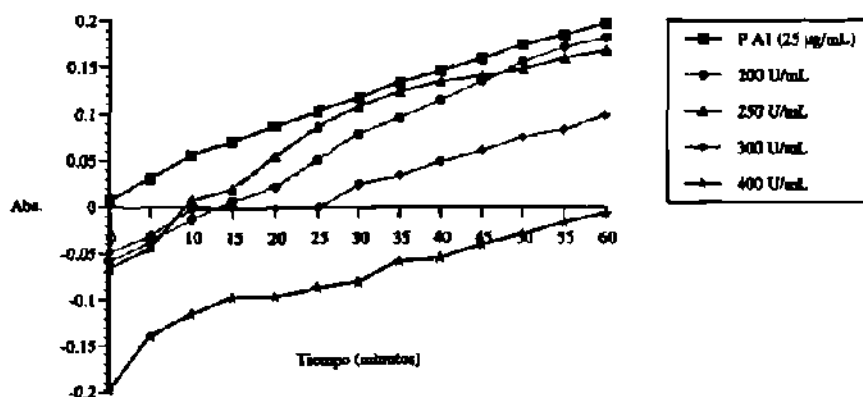
Los resultados se muestran en la Tabla 29.

SOD	Radicales libres nanmoles/ml/tir	% de inhibición
0 U/mL	134.79 ± 2.54	0
200 U/mL	124.79 ± 1.77	7.4
250 U/mL	114.14 ± 3.04	15.3
300 U/mL	52.79 ± 0.98	60.8
400 U/mL	0	100

Tabla 29. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (25 µg/mL), en presencia de diferentes dosis de SOD.

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 30 muestra los resultados obtenidos en forma gráfica.



**Figura 30.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (25 µg/mL) con las diferentes concentraciones de SOD.

**3.6.1.5 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de los radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos**  
Los resultados de la inhibición con la SOD se muestran en la Tabla 30.

SOD	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	140.71 ± 3.08	0
200 U/mL	122.64 ± 2.97	12.8
250 U/mL	103.71 ± 2.36	26.3
300 U/mL	57.93 ± 2.06	58.8
400 U/mL	0	100

**Tabla 30.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), en presencia de diferentes dosis de SOD.

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.



Los resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 31.

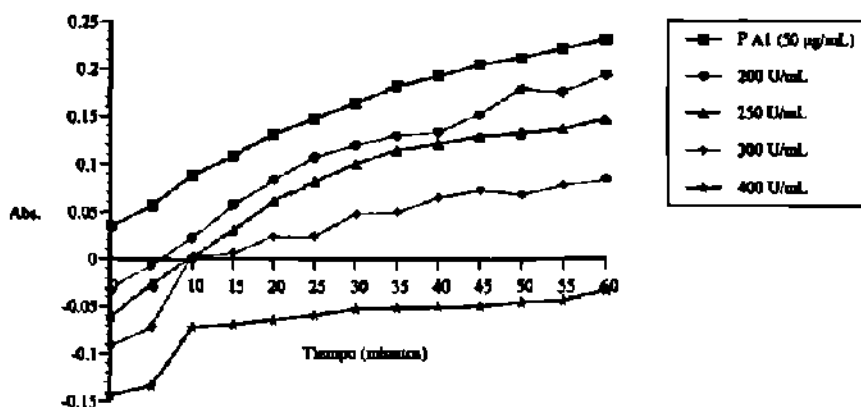


Figura 31. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL) con las diferentes concentraciones de SOD.

### 3.6.2 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en presencia de microsomas de *Macaca mulata*

En las evaluaciones sobre la inhibición de los radicales libres por la SOD, en presencia de los microsomas de *Macaca mulata*, las concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub> fueron las mismas que han sido usadas durante todo el desarrollo experimental, pero en este caso, las concentraciones de la SOD fueron 50, 100, 150 y 200 U/mL.

### 3.6.2.1 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por el Pirogalol (706 $\mu\text{g/mL}$ ), en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

Los resultados de la inhibición de los radicales libres producidos por el Pirogalol se muestran en la Tabla 31.

SOD	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	16.65 $\pm$ 0.32	0
50 U/mL	-----	-----
100 U/mL	-----	-----
150 U/mL	-----	-----
200 U/mL	13.42 $\pm$ 0.97	19.4

Tabla 31. Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6  $\mu\text{M}$  ó 706  $\mu\text{g/mL}$ ), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

En la Figura 32 se muestran los resultados en forma gráfica

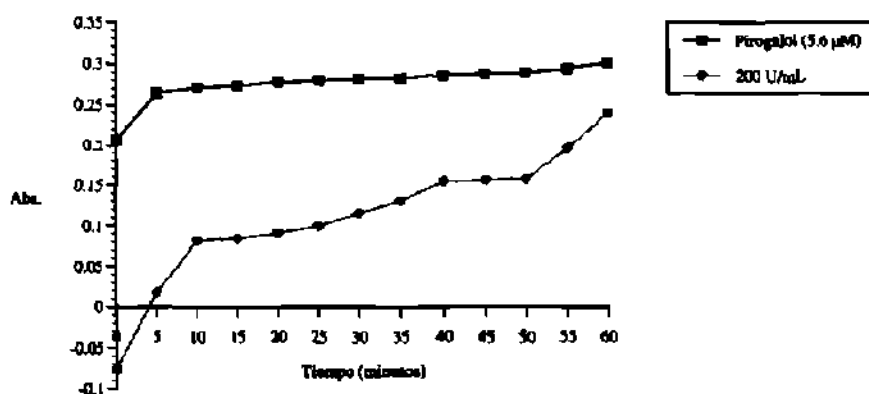


Figura 32. Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6  $\mu\text{M}$  ó 760  $\mu\text{g/mL}$ ) con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

**3.6.2.2 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 µg/mL), en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.**

Los resultados de la inhibición de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en presencia de los microsomas de *Macaca mulata* se muestran en la Tabla 32.

SOD	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	17.18 ± 0.54	0
50 U/mL	11.95 ± 1.30	30.4
100 U/mL	0	100
150 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

**Tabla 32.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 33 muestra la representación gráfica de los resultados de la inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con las diferentes concentraciones de SOD.

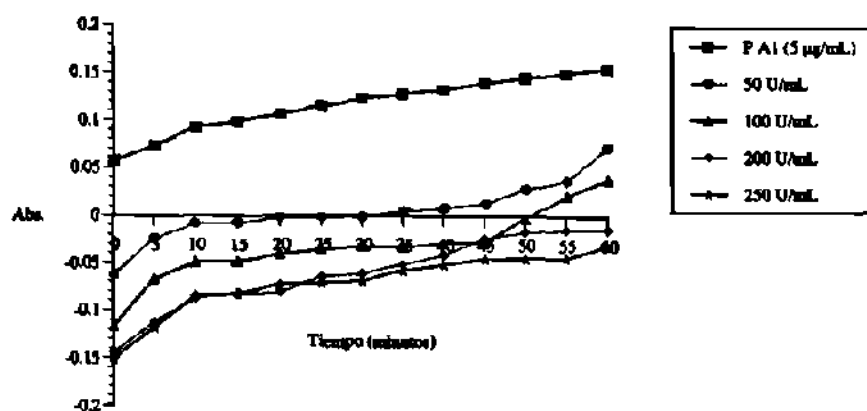


Figura 33. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

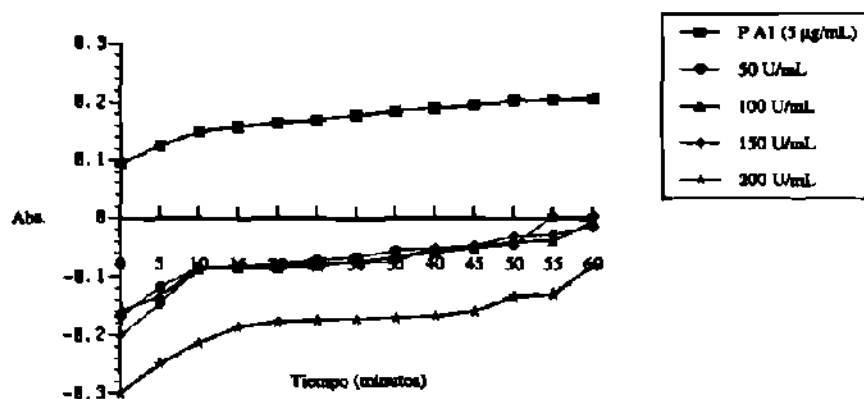
### 3.6.2.3 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL), en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

Los resultados se muestran en la Tabla 33.

SOD	Radicales libres µmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	19.75 ± 1.02	0
50 U/mL	8.68 ± 1.28	56.1
100 U/mL	0	100
150 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

Tabla 33. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

Los resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 34.



**Figura 34.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

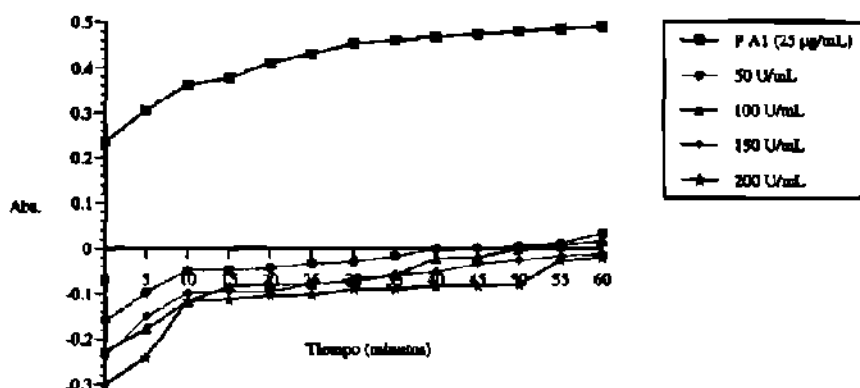
#### 3.6.2.4 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 ( $25 \mu\text{g/mL}$ ), en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

Los resultados de la inhibición de la generación de radicales libres se muestran en la Tabla 34.

SOD	Radicales libres nmolea/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	$32.22 \pm 1.31$	0
50 U/mL	$6.00 \pm 0.87$	81.4
100 U/mL	$3.31 \pm 1.18$	89.7
150 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

**Tabla 34.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 ( $25 \mu\text{g/mL}$ ), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

Los resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 35.



**Figura 35.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (25 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

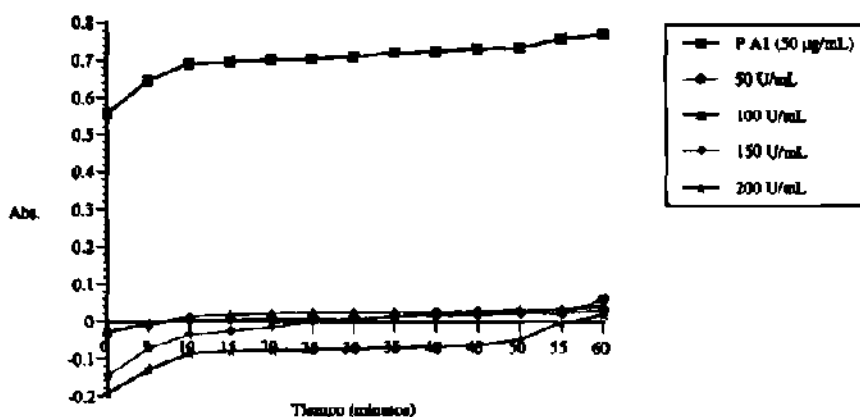
### 3.6.2.5 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

Los resultados se muestran en la Tabla 35.

SOD	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	38.17 ± 1.56	0
50 U/mL	10.67 ± 1.73	71.4
100 U/mL	6.79 ± 1.06	82.2
150 U/mL	5.09 ± 0.91	86.7
200 U/mL	3.01 ± 1.37	92.1

**Tabla 35.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 36 muestra los resultados en forma gráfica.



**Figura 36.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de microsomas de *Macaca mulatta*.

### 3.6.3 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en presencia de microsomas de rata Wistar

Para realizar las evaluaciones de la inhibición de la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol, en presencia de los microsomas de rata Wistar, se utilizaron las mismas concentraciones de SOD.

#### 3.6.3.1 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por el Pirogalol (706 µg/mL), en presencia de microsomas de rata Wistar.

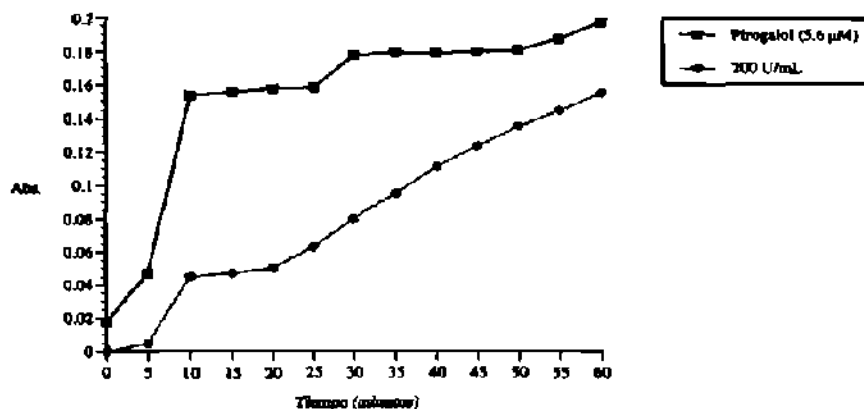
Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 36.

SOD	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	47.17 ± 1.12	0
50 U/mL	-----	-----
100 U/mL	-----	-----
150 U/mL	-----	-----
200 U/mL	28.78 ± 2.04	39.0

**Tabla 36.** Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6  $\mu$ M ó 706  $\mu$ g/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar.

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 37 muestra los resultados en forma gráfica.



**Figura 37.** Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6  $\mu$ M ó 706  $\mu$ g/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de los microsomas de rata Wistar.

### 3.6.3.2 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 $\mu$ g/mL), en presencia de microsomas de rata Wistar.

Los resultados de la inhibición de la generación de radicales libres se muestran en la Tabla 37.



SOD	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	28.38 ± 2.09	0
50 U/mL	4.16 ± 2.31	85.4
100 U/mL	0.68 ± 1.96	97.6
150 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

Tabla 37. Inhibición de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 38 muestra la representación gráfica de los resultados.

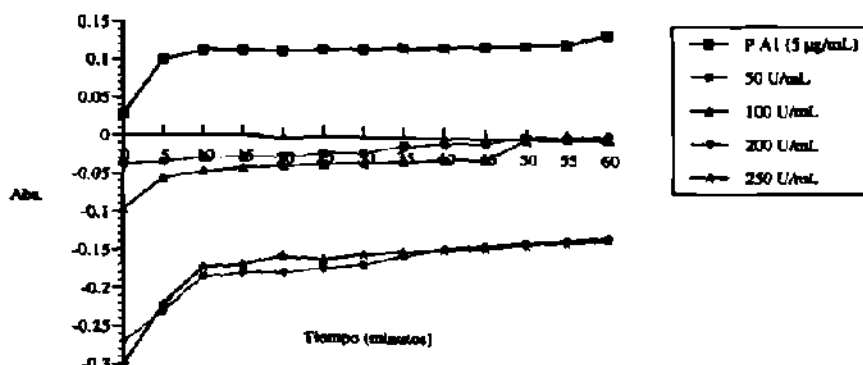


Figura 38. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de los microsomas de rata Wistar.

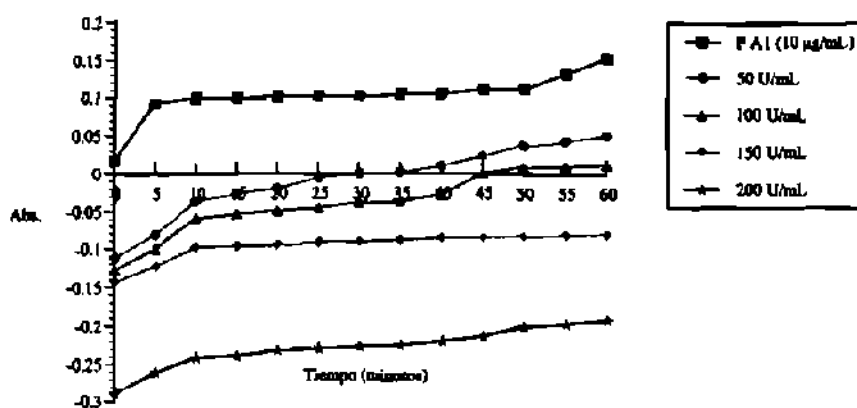
### 3.6.3.3 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL), en presencia de microsomas de rata Wistar.

Los resultados se muestran en la Tabla 38.

SOD	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	34.89 ± 2.67	0
50 U/mL	6.89 ± 0.82	80.2
100 U/mL	1.05 ± 2.55	97
150 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

**Tabla 38.** Inhibición de los radicales libres generados generado por la Peroxisomicina A1 (10 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 39 muestra la representación gráfica de estos resultados.



**Figura 39.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (10 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de los microsomas de rata Wistar.

### 3.6.3.4 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (25 µg/mL), en presencia de microsomas de rata Wistar

Los resultados de la inhibición de radicales libres se muestran en la Tabla 39.

SOD	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	50.23 ± 3.21	0
50 U/mL	16.3 ± 3.18	67.5
100 U/mL	7.34 ± 2.90	85.4
150 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

Tabla 39. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (25 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar.

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 40 muestra los resultados en forma gráfica.

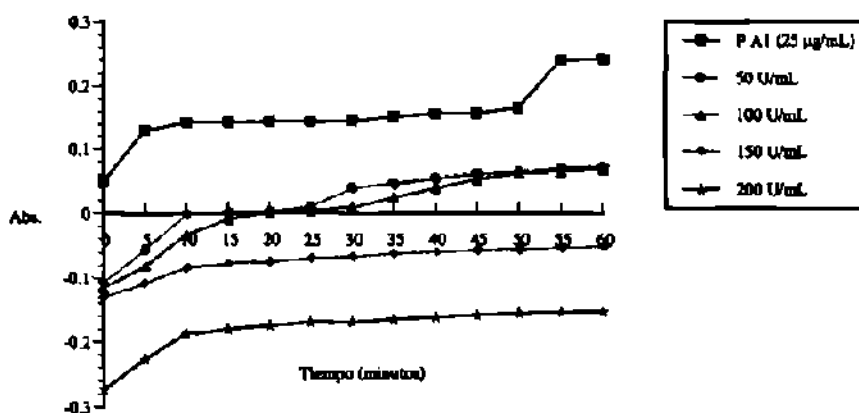


Figura 40. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (25 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de los microsomas de rata Wistar.

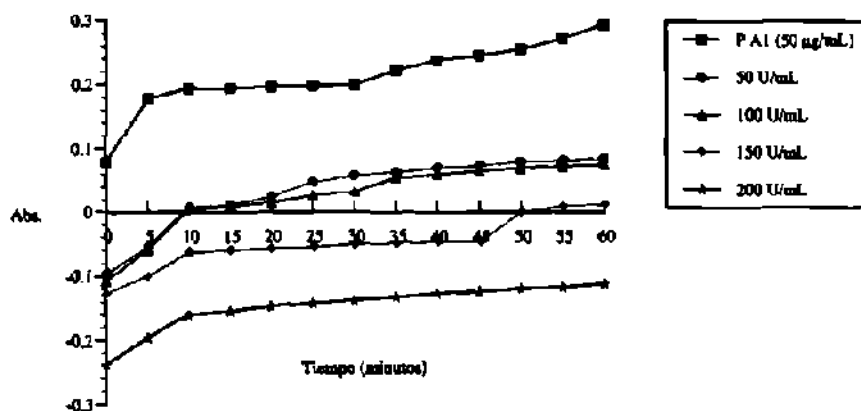
**3.6.3.5 Efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), en presencia de microsomas de rata Wistar.**

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 40.

SOD	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	56.06 ± 0.81	0
50 U/mL	18.92 ± 2.13	66.3
100 U/mL	11.5 ± 1.85	79.5
150 U/mL	2.18 ± 1.33	96.1
200 U/mL	0	100

**Tabla 40.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), con diferentes dosis de SOD, en presencia de microsomas de rata Wistar. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 41 muestra la representación gráfica de los resultados.



**Figura 41.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), con las diferentes concentraciones de SOD, en presencia de los microsomas de rata Wistar.

### **3.7 PROCESO DE INHIBICION DE LA AUTOOXIDACION Y GENERACION DE RADICALES LIBRES DE LA PEROXISOMICINA A<sub>1</sub> POR LA CATALASA**

Para valorar una posible inhibición de la generación de otros radicales libres como el radical hidroxilo, se realizaron pruebas con la Catalasa.

El trabajo experimental fue realizado bajo las mismas condiciones que se siguieron durante la evaluación de la inhibición de la generación de radicales libres con la SOD y las concentraciones de Catalasa utilizadas para la inhibición fueron 25, 50, 100 y 200 U/mL.

#### **3.7.1 Efecto inhibitorio de la Catalasa sobre la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en ausencia de sistemas enzimáticos (microsomas).**

Se evaluó la posible inhibición de la generación de radicales libres (específicamente el radical hidroxilo) de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol con la Catalasa, en ausencia de los sistemas enzimáticos aportados por los microsomas.

##### **3.7.1.1 Efecto inhibitorio de la Catalasa sobre la generación de los radicales libres del Pirogalol en ausencia de sistemas enzimáticos**

Los resultados de la inhibición de los radicales libres producidos por el Pirogalol (706 µg/mL), con las

diferentes concentraciones de la Catalasa, se muestran en la Tabla 41.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de Inhibición
0 U/mL	87.57 ± 3.82	0
25 U/mL	-----	-----
50 U/mL	-----	-----
100 U/mL	-----	-----
200 U/mL	61.71 ± 2.63	29.5

Tabla 41. Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6  $\mu$ M ó 706  $\mu$ g/mL), con diferentes dosis de Catalasa, en ausencia de sistemas enzimáticos. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

Los resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 42.

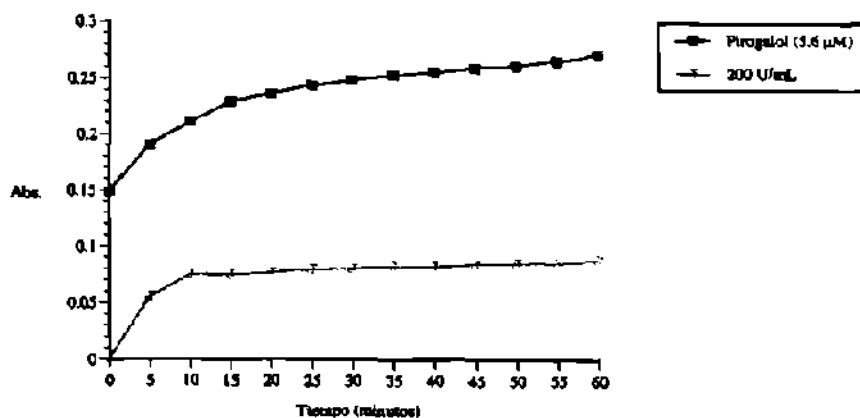


Figura 42. Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6  $\mu$ M ó 706  $\mu$ g/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en ausencia de sistemas enzimáticos.

### 3.7.1.2 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de los radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos

Los resultados se muestran en la Tabla 42.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	40.36 ± 2.31	0
25 U/mL	19.93 ± 1.23	50.6
50 U/mL	0	100
100 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

Tabla 42. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 µg/mL), en presencia de diferentes dosis de Catalasa.

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

En la Figura 43 se muestra la representación gráfica de los resultados.

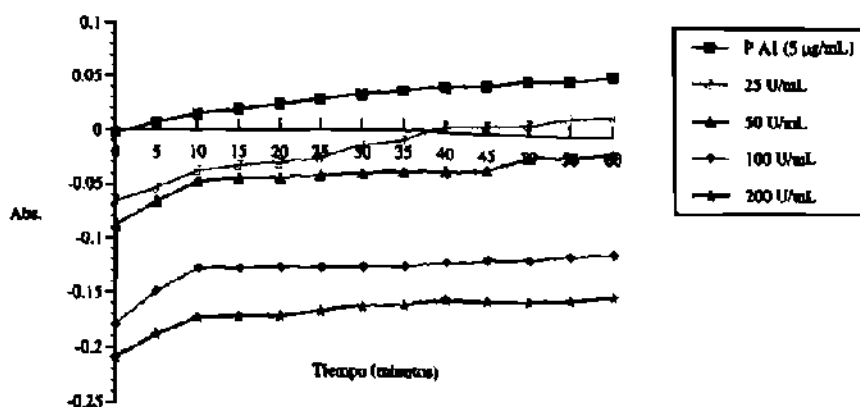


Figura 43. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 µg/mL) con las diferentes concentraciones de Catalasa.

### 3.7.1.3 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de los radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos

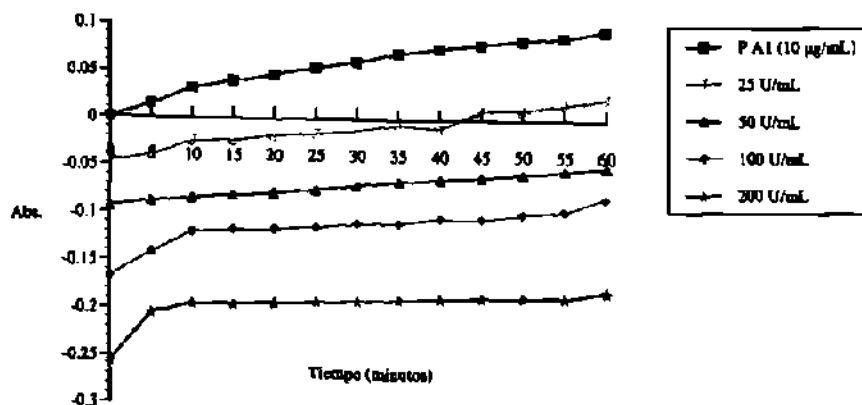
Los resultados se muestran en la Tabla 43.

CATALASA	Radicales libres nmoles/mL/hr	% de inhibición
0 U/mL	66.99 ± 2.98	0
25 U/mL	23.43 ± 0.95	65
50 U/mL	0	100
100 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

**Tabla 43.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL), en presencia de diferentes dosis de Catalasa.

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

Los resultados de esta inhibición se muestran en forma gráfica en la Figura 44.



**Figura 44.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL) con las diferentes concentraciones de Catalasa.



### 3.7.1.4 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de los radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (25 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos

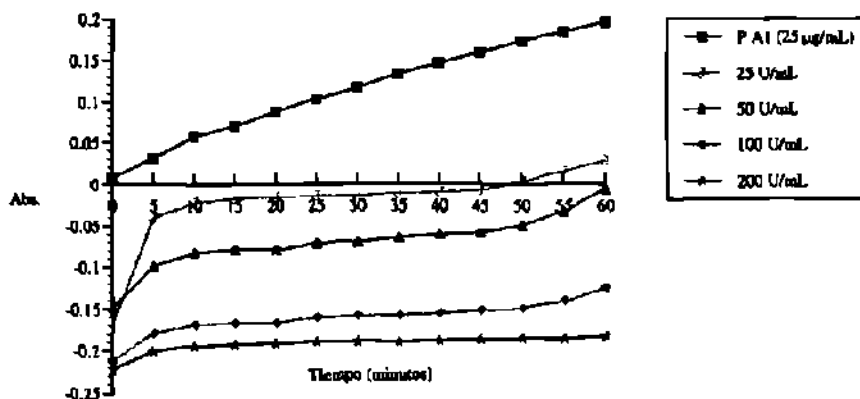
Los resultados obtenidos con esta dosis se muestran en la Tabla 44.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	134.79 ± 2.56	0
25 U/mL	25.86 ± 3.41	80.8
50 U/mL	0	100
100 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

**Tabla 44.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (25 µg/mL), en presencia de diferentes dosis de Catalasa.

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

Los resultados se presentan en forma gráfica en la Figura 45.



**Figura 45.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (25 µg/mL) con las diferentes concentraciones de Catalasa.

### 3.7.1.5 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de los radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL) en ausencia de sistemas enzimáticos

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 45.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	140.71 ± 3.08	0
25 U/mL	35.86 ± 3.77	74.5
50 U/mL	8.71 ± 2.34	93.8
100 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

Tabla 45. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), en presencia de diferentes dosis de Catalasa.

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

Los resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 46.

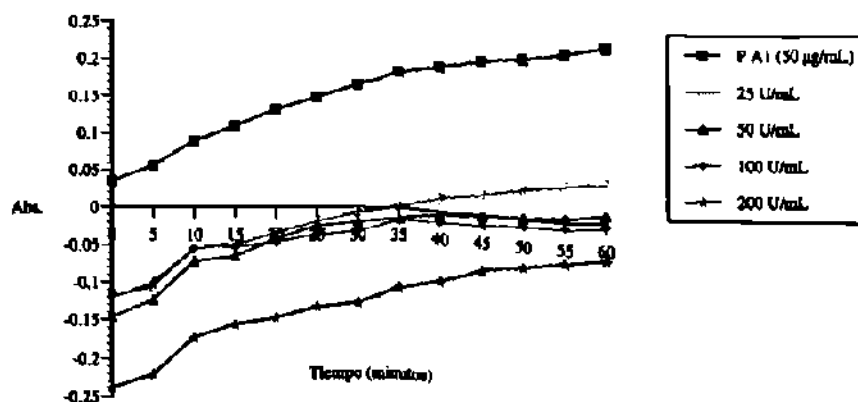


Figura 46. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL) con las diferentes concentraciones de Catalasa.

### 3.7.2 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en presencia de microsomas de *Macaca mulata*

Se evaluó la inhibición de la generación de radicales libres de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol con la Catalasa, en presencia de los microsomas de *Macaca mulata*.

#### 3.7.2.1 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por el Pirogalol (706 µg/mL), en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

Los resultados de la inhibición de los radicales libres producidos por el Pirogalol, con las diferentes concentraciones de la Catalasa se muestran en la Tabla 46.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	16.65 ± 0.32	0
25 U/mL	----	----
50 U/mL	----	----
100 U/mL	----	----
200 U/mL	0	100

Tabla 46. Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6 µM ó 706 µg/mL), con diferentes dosis de Catalasa, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 47 muestra los resultados en forma gráfica.

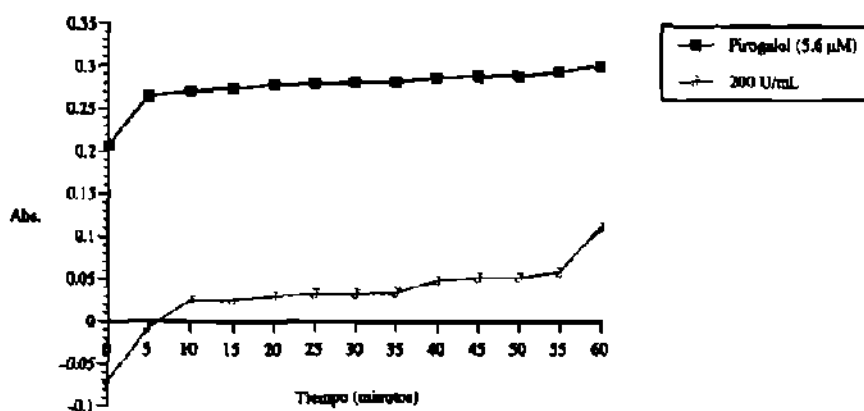


Figura 47. Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol ( $5.6 \mu\text{M}$  ó  $760 \mu\text{g/mL}$ ) con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de *Macaca mulata*.

### 3.7.2.2 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> ( $5 \mu\text{g/mL}$ ), en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

Los resultados obtenidos con la dosis más baja de Peroxisomicina A<sub>1</sub> en presencia de los microsomas de *Macaca mulata* se muestran en la Tabla 47.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de Inhibición
0 U/mL	$17.18 \pm 0.54$	0
25 U/mL	0	100
50 U/mL	0	100
100 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

Tabla 47. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> ( $5 \mu\text{g/mL}$ ), con diferentes dosis de Catalasa, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 48 muestra la representación gráfica de los resultados.

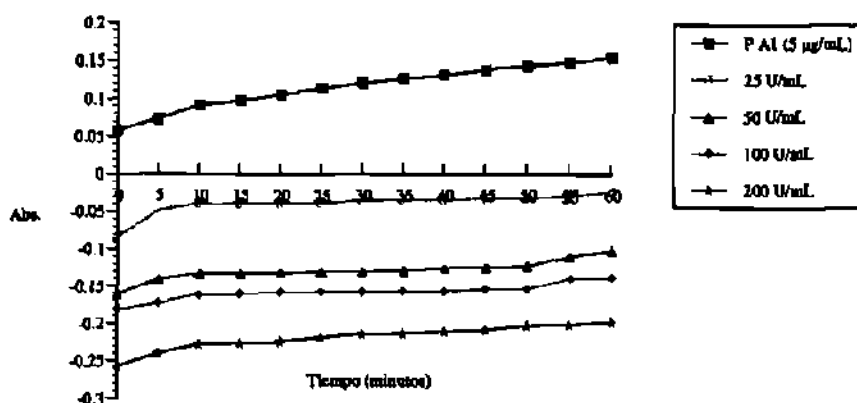


Figura 48. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de *Macaca mulata*.

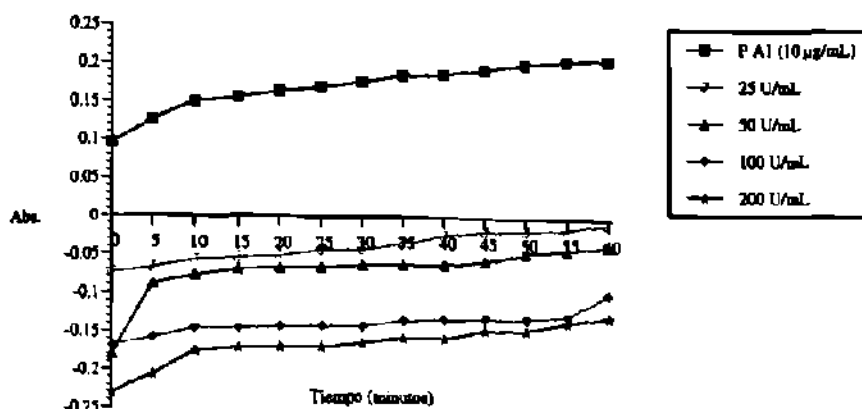
### 3.7.2.3 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL), en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

Los resultados se muestran en la Tabla 48.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	19.75 ± 1.02	0
25 U/mL	0	100
50 U/mL	0	100
100 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

Tabla 48. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL), con diferentes dosis de Catalasa, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

Los resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 49.



**Figura 49.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de *Macaca mulata*.

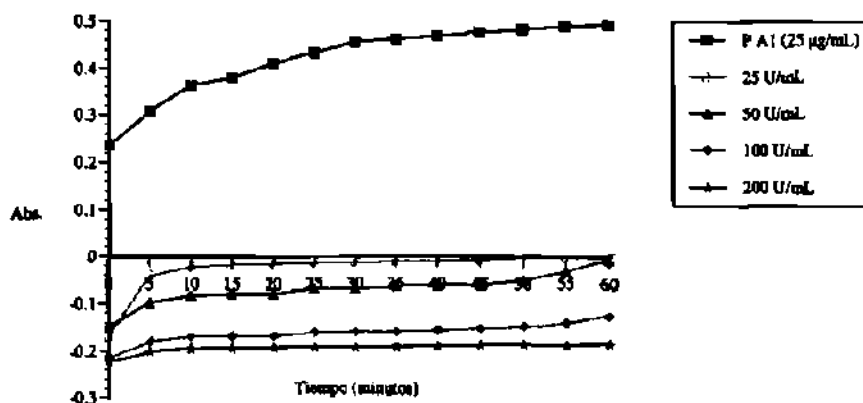
#### 3.7.2.4 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (25 µg/mL), en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

Los resultados de la inhibición de la generación de radical hidroxilo de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> a la concentración de 25 µg/mL se muestran en la Tabla 49.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	32.22 ± 1.31	0
25 U/mL	0	100
50 U/mL	0	100
100 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

**Tabla 49.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (25 µg/mL), con diferentes dosis de Catalasa, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 50 muestra los resultados en forma gráfica.



**Figura 50.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (25 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de *Macaca mulata*.

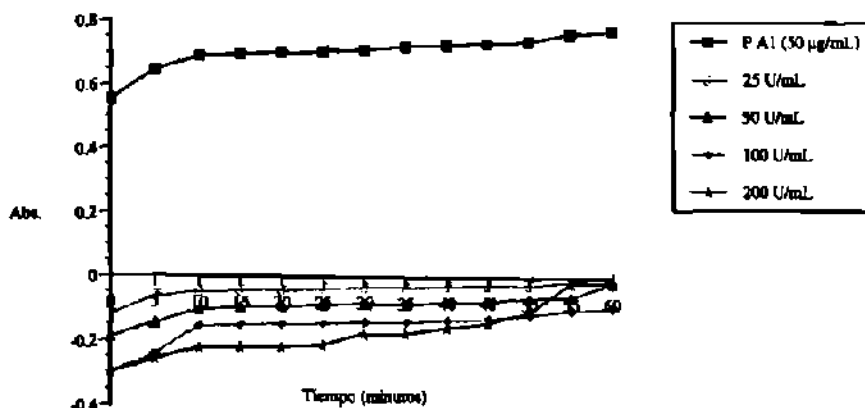
### 3.7.2.5 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), en presencia de microsomas de *Macaca mulata*.

Los resultados se muestran en la Tabla 50.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	38.17 ± 1.56	0
25 U/mL	2.92 ± 0.76	92.3
50 U/mL	0	100
100 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

**Tabla 50.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), con diferentes dosis de Catalasa, en presencia de microsomas de *Macaca mulata*. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 51 muestra estos resultados en forma gráfica.



**Figura 51.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de *Macaca mulata*.

### 3.7.3 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en presencia de microsomas de rata Wistar

También se evaluó la inhibición de la generación de radicales libres de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol con la Catalasa, en presencia de los microsomas de rata Wistar.



### 3.7.3.1 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por el Pirogalol (706 $\mu\text{g/mL}$ ), en presencia de microsomas de rata Wistar.

La inhibición la generación de radicales libres del Pirogalol por la Catalasa, en presencia de microsomas de rata Wistar, se muestra en la Tabla 51.

CATALASA	Radicales libres nmolea/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	47.17 $\pm$ 1.12	0
25 U/mL	----	----
50 U/mL	----	----
100 U/mL	----	----
200 U/mL	21.64 $\pm$ 1.06	54.1

Tabla 51. Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6  $\mu\text{M}$  ó 706  $\mu\text{g/mL}$ ), con diferentes dosis de Catalasa, en presencia de microsomas de rata Wistar. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 52 muestra los resultados en forma gráfica.

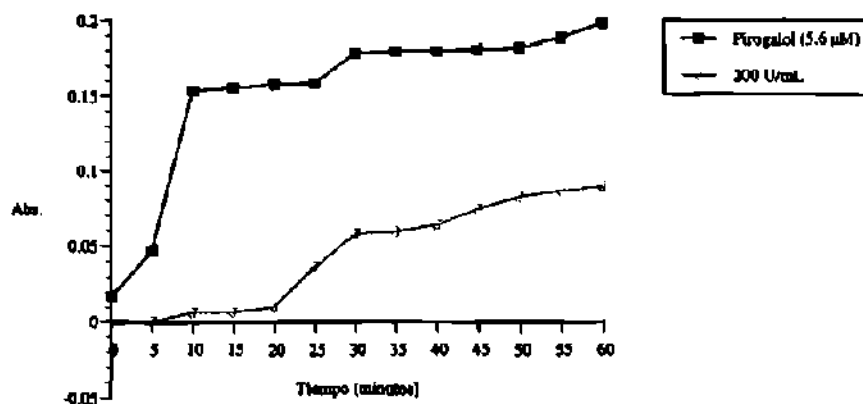


Figura 52. Inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol (5.6  $\mu\text{M}$  ó 706  $\mu\text{g/mL}$ ), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de rata Wistar.

### 3.7.3.2 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A1 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), en presencia de microsomas de rata Wistar.

La inhibición se muestra en la Tabla 52.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	28.38 $\pm$ 2.09	0
25 U/mL	5.74 $\pm$ 1.38	79.7
50 U/mL	1.22 $\pm$ 1.04	95.7
100 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

Tabla 52. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), con diferentes dosis de Catalasa, en presencia de microsomas de rata Wistar. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 53 muestra la representación gráfica de los resultados.

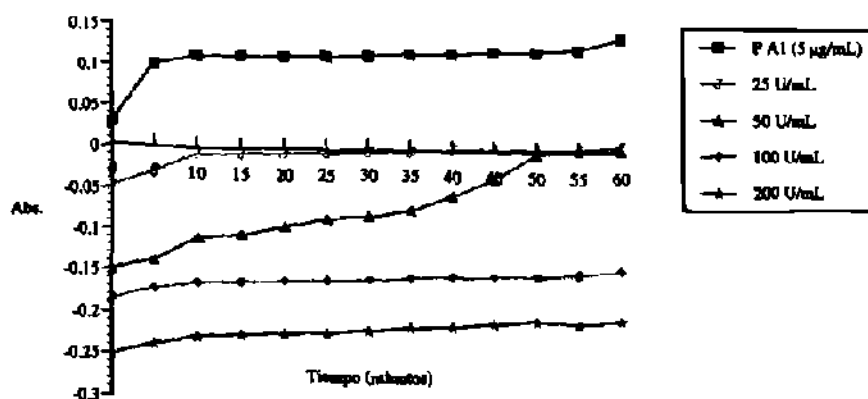


Figura 53. Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de rata Wistar.

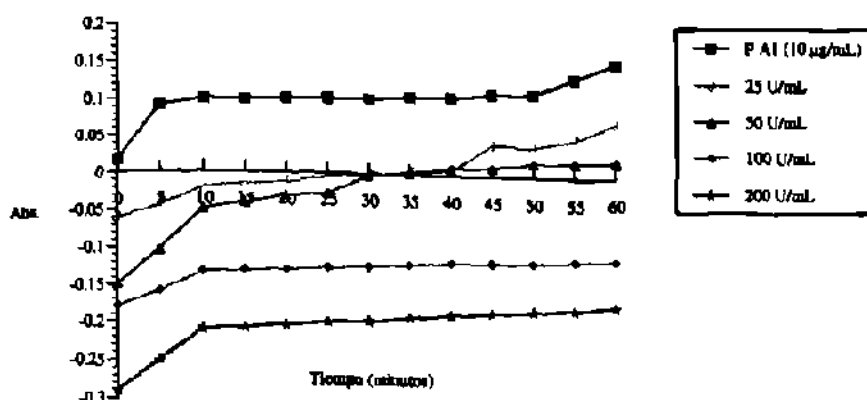
**3.7.3.4 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL), en presencia de microsomas de rata Wistar.**

Los resultados se muestran en la Tabla 53.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	34.89 ± 2.67	0
25 U/mL	7.95 ± 1.56	77.2
50 U/mL	4.94 ± 2.05	85.8
100 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

**Tabla 53.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL), con diferentes dosis de Catalasa, en presencia de microsomas de rata Wistar. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 54 muestra la representación gráfica de estos resultados.



**Figura 54.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (10 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de rata Wistar.

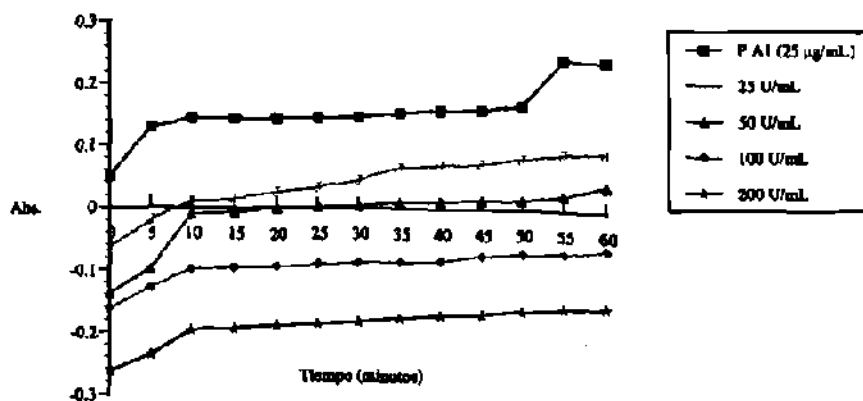
**3.7.3.4 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (25 µg/mL), en presencia de microsomas de rata Wistar.**

La inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en la concentración de 10 µg/mL en presencia de los microsomas de rata Wistar se muestra en la Tabla 54.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	59.23 ± 3.21	0
25 U/mL	16.09 ± 0.97	67.9
50 U/mL	9.88 ± 1.18	80.3
100 U/mL	0	100
200 U/mL	0	100

**Tabla 54.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (25 µg/mL), con diferentes dosis de Catalasa, en presencia de microsomas de rata Wistar. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

Los resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 55.



**Figura 55.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (25 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de rata Wistar.

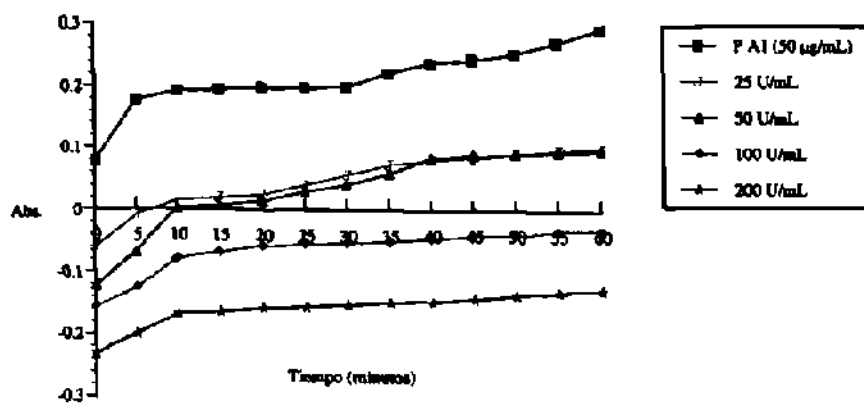
### 3.7.3.5 Efecto inhibitorio de la Catalasa en la generación de radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), en presencia de microsomas de rata Wistar.

La inhibición con la concentración de 50 µg/mL de Peroxisomicina A<sub>1</sub> se muestran en la Tabla 55.

CATALASA	Radicales libres nmoles/ml/hr	% de inhibición
0 U/mL	56.06 ± 0.81	0
25 U/mL	21.01 ± 1.23	62.5
50 U/mL	17.48 ± 1.48	68.8
100 U/mL	2.44 ± 1.36	95.6
200 U/mL	0	100

**Tabla 55.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (50 µg/mL), con diferentes dosis de Catalasa, en presencia de microsomas de rata Wistar. Los resultados son el promedio de 6 determinaciones.

La Figura 56 muestra la representación gráfica de los resultados.



**Figura 56.** Inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A1 (50 µg/mL), con las diferentes concentraciones de Catalasa, en presencia de los microsomas de rata Wistar.

## CAPITULO 4

### DISCUSION

El interés de evaluar la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con las enzimas del sistema enzimático microsomal de las monooxigenasas de función mixta se debió a que, actualmente, esa sustancia está siendo utilizada como agente antineoplásico en ensayos clínicos, en la fase I. Así, los estudios de las interacciones metabólicas, como de la generación de radicales libres por parte de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, pudieran dar una orientación de lo que sucede durante el paso de esta sustancia en el organismo.

Debido a que existen variaciones interespecie en la actividad enzimática microsomal <sup>(5)</sup>, se seleccionaron dos especies, la rata y el macaco, para evaluar la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con las enzimas del sistema de monooxigenasas de función mixta.

De este modo, el uso de estas dos especies, rata Wistar y *Macaca mulata* nos permitió evaluar, además de la interacción y posible metabolismo de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, las diferencias que pudieran existir interespecie.

Las enzimas evaluadas fueron: el Citocromo P-450, la NADH Citocromo b<sub>5</sub> reductasa, la NADPH Citocromo P-450 reductasa y la cantidad de Hemoproteínas totales, pues son las enzimas más importantes

del sistema de las monooxigenasas de función mixta y son las encargadas de metabolizar la mayoría de los compuestos endógenos y/o exógenos.

Las concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub> de 5, 10, 25 µg/mL fueron seleccionadas debido a que son semejantes a las concentraciones que han sido utilizadas para evaluar el efecto antineoplásico en los cultivos celulares <sup>(27)</sup>.

Posteriormente, fue seleccionada la dosis de 50 µg/mL porque en los experimentos iniciales, donde se determinó la actividad de la enzima NADPH Citocromo P-450 reductasa en los microsomas de rata, no se observaron cambios significativos con las concentraciones ya mencionadas de Peroxisomicina A<sub>1</sub> y se pensó que, quizá con un incremento en la concentración, a 50 µg/mL, se podría obtener un efecto significativo en la actividad de esta enzima.

Más tarde, cuando los resultados obtenidos con esta enzima en los microsomas de rata, fueron evaluados estadísticamente tampoco se observaron diferencias significativas con la concentración de 50 µg/mL. Sin embargo, en los microsomas de *Macaca mulata* y en las determinaciones de la actividad de las otras enzimas, sí se observaron diferencias significativas, aún con la concentración más baja de Peroxisomicina A<sub>1</sub>.

Por otra parte, debido que los resultados obtenidos en las determinaciones enzimáticas fueron diferentes a lo esperado, estas evaluaciones fueron repetidas con un nuevo lote de Peroxisomicina A<sub>1</sub>, para descartar si los resultados obtenidos pudieran ser atribuidos a una posible alteración del compuesto.



#### 4.1 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL CITOCROMO P-450

La concentración de Citocromo P-450 reducido es una medida directa de la actividad de las monooxigenasas de función mixta debido a que estas enzimas catalizan las reacciones de óxido-reducción del Citocromo P-450, una hemoproteína que actúa como oxidasa terminal de este sistema. Así, un aumento en la concentración del producto (Citocromo P-450 reducido), indica un aumento en la actividad enzimática <sup>(5)</sup>.

La evaluación de la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con el Citocromo P-450 reducido nos indica que esta sustancia es metabolizada por las monooxigenasas de función mixta y que durante este proceso se producen radicales libres.

Las determinaciones del Citocromo P-450 se realizaron con las diferentes concentraciones de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en presencia de los microsomas de *Macaca mulata* y de rata Wistar. Además, también se realizaron evaluaciones de la concentración del Citocromo P-450 reducido después de incubar a los microsomas con la Peroxisomicina A<sub>1</sub> a 37 °C durante una hora.

En los resultados obtenidos de la evaluación de la interacción Peroxisomicina A<sub>1</sub> con el sistema de las monooxigenasas de función mixta, en los microsomas de *Macaca mulata* no incubados (Tabla 7) se observó un efecto bifásico, con una disminución de la actividad con respecto al control, de las enzimas microsomales con las dosis de 5 y 10

$\mu\text{g/mL}$  de Peroxisomicina A<sub>1</sub>, seguido de un posterior aumento con la dosis de 25  $\mu\text{g/mL}$ . La dosis de 50  $\mu\text{g/mL}$  no mostró diferencias estadísticamente significativas.

La inhibición de la actividad enzimática observada con las dosis de 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$  pudiera ser debida a que la Peroxisomicina A<sub>1</sub> se una fuertemente y por periodos prolongados a la enzima y, de esta manera, sea metabolizada lentamente.

El aumento en la actividad enzimática observado con la dosis de 25  $\mu\text{g/mL}$  quizá se deba a que, con esta dosis se presente un fenómeno inicial de saturación de los sitios de unión a la enzima y, así, una concentración más alta de Peroxisomicina A<sub>1</sub> podría generar, por un mecanismo de retroalimentación negativa, que una cierta cantidad de enzima inactiva pudiera activarse.

En relación a la dosis de 50  $\mu\text{g/mL}$ , donde no se observaron diferencias significativas con respecto al control, pudiera presentarse un fenómeno de saturación total de los sitios de unión, ya que cuando un compuesto es metabolizado lentamente o está en concentraciones muy altas, el sitio activo de la enzima permanece ocupado por largos periodos y esto puede llevar a una inhibición enzimática, que posteriormente, produzca una desrepresión genómica y así, una síntesis acelerada de la enzima <sup>(5)</sup>.

Otra explicación posible podría ser la disponibilidad de donadores de electrones (NADPH o NADH), indispensables para la actividad de las enzimas del sistema de monooxigenasas de función mixta, ya que si las concentraciones de un compuesto son muy altas, los

donadores de electrones no son suficientes y esto conduciría a una disminución en la actividad enzimática <sup>(5)</sup>.

Además, debido a su estructura química la Peroxisomicina A<sub>1</sub> puede generar radicales libres y puede formar complejos con el Citocromo P-450 y dañar al retículo endoplásmico o a los microsomas, lo que también produce una pérdida de la actividad enzimática <sup>(5,7,8)</sup>.

Cuando se incubaron los microsomas a 37 °C durante una hora con las diferentes concentraciones de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (Tabla 8), también se observó un comportamiento bifásico, en donde si bien las concentraciones de 5 y 10 µg/mL de Peroxisomicina A<sub>1</sub> no mostraron diferencias significativas con respecto al control, la dosis de 25 µg/mL sí lo hizo y, nuevamente, con la concentración de 50 µg/mL no se observó una diferencia significativa.

En el caso de la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con las monooxigenasas de función mixta presentes en los microsomas de rata Wistar (Tabla 9), las concentraciones de 5, 10 y 25 µg/mL no mostraron diferencias significativas con respecto al control y sólo con la dosis de 50 µg/mL, se aprecia una inhibición en la actividad enzimática.

Con respecto a los microsomas incubados (Tabla 10), se observó un aumento significativo con las dosis de 10 y 25 µg/mL de Peroxisomicina A<sub>1</sub>, con una inhibición enzimática semejante a la observada en los microsomas no incubados con la dosis de 50 µg/mL.

Las diferencias observadas entre los microsomas de rata no incubados e incubados se deben al tiempo. Probablemente, las enzimas requieren de un determinado tiempo para activarse o no se activen todas simultáneamente. A esto se debe que un compuesto sea metabolizado en diferentes velocidades y proporciones.

#### 4.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CITOCROMO b<sub>5</sub> REDUCTASA

La concentración del Citocromo b<sub>5</sub> reducido es una medida directa de la actividad de la enzima NADH Citocromo b<sub>5</sub> reductasa, ya que un aumento en la concentración del producto de reacción (Citocromo b<sub>5</sub> reducido), indica un aumento en la actividad de la enzima que cataliza esta reacción <sup>(3)</sup>. Esta enzima, además de participar en el metabolismo de lípidos también participa en el metabolismo de xenobióticos.

Los resultados obtenidos de la enzima Citocromo b<sub>5</sub> reductasa con los microsomas de *Macaca mulata*, mostraron, tanto en los microsomas no incubados como en los incubados, que todas las dosis de Peroxisomicina A<sub>1</sub> mostraron un aumento en la actividad enzimática, excepto la dosis de 5 µg/mL, que presentó una actividad semejante a la observada en el control (Tablas 11 y 12). Así, la Peroxisomicina A<sub>1</sub> produce un aumento en la actividad enzimática directamente proporcional a la dosis.

Por otra parte, la NADH Citocromo b<sub>5</sub> reductasa es una enzima que interviene importantemente en el metabolismo de lípidos, en los cuales modifica la estructura de sus cadenas alifáticas, tanto en los fenómenos de saturación, como en los de desaturación.

El metabolismo de lípidos se lleva a cabo predominantemente en mitocondrias, peroxisomas y, una mínima parte, en el retículo endoplásmico. Dado que el Citocromo b<sub>5</sub> participa en la formación de las enzimas Acil CoA sintetasa y Acil CoA oxidasa y que estas enzimas, a su vez, participan en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados, en la β-oxidación y en el metabolismo de ácidos grasos de cadena muy larga, procesos llevados a cabo dentro del peroxisoma, pudiéramos suponer que la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, al ser metabolizada por las enzimas microsomales, compite por el Citocromo b<sub>5</sub> y el NADH, con las enzimas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos y la β-oxidación. Esto puede llevar a una alteración en el contenido de grasa intracelular y en las funciones efectuadas por los peroxisomas y por las mitocondrias <sup>(9)</sup>.

De hecho, algunos trabajos de microscopía realizados por Bermúdez y cols. <sup>(20,21)</sup> en órganos de diferentes animales (rata, ratón y macaco), tratados con diferentes dosis de Peroxisomicina A<sub>1</sub> han mostrado infiltración de partículas de grasa.

Adicionalmente, los resultados de Sepúlveda y cols. <sup>(31)</sup> relacionados con la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y sus efectos sobre las células, han mostrado que esta sustancia produce la muerte peroxisomal, debido a lo cual se le denominó Peroxisomicina A<sub>1</sub>, en lugar de T-514. Aunque en esta tesis sólo se evaluó la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con el sistema enzimático microsomal, pudiera ser que, a nivel celular ambos

procesos estuvieran relacionados y que, juntos participen en el mecanismo de acción de esta sustancia.

Los resultados obtenidos en las evaluaciones realizadas con los microsomas de rata no incubados (Tabla 13) indican que hubo una inhibición marcada de la actividad de la NADH Citocromo b<sub>5</sub> reductasa con las concentraciones de 5, 10 y 25 µg/mL de Peroxisomicina A<sub>1</sub>. La concentración de 50 µg/mL muestra un incremento en la actividad con respecto al control, aunque este resultado no es estadísticamente significativo. Probablemente, la concentración de 50 µg/mL sea capaz de producir la activación de algunas enzimas que pudieran estar inactivas.

Por otra parte, los resultados obtenidos con los microsomas de rata incubados (Tabla 14) muestran que hubo una inhibición de la actividad de la NADH Citocromo b<sub>5</sub> reductasa con las concentraciones de 5 y 10 µg/mL de Peroxisomicina A<sub>1</sub>, con una posterior recuperación de la actividad enzimática al aumentar las concentraciones. Así, la concentración de 25 µg/mL presentó una actividad similar al control, mientras que, la concentración de 50 µg/mL mostró un aumento significativo en la actividad de la enzima. Las diferencias que se presentan, en comparación con los microsomas no incubados, pueden deberse al efecto del tiempo en la actividad enzimática. Tal vez, con las dosis de 25 y 50 µg/mL, durante el periodo de la incubación se produce una regeneración de la actividad enzimática.

Estos resultados difieren notablemente con los obtenidos con los microsomas de *Macaca mulata*, donde se observó un aumento de la actividad enzimática directamente proporcional a la dosis de Peroxisomicina A<sub>1</sub>. En este caso, también pudiera suponerse que los procesos metabólicos que existen entre las ratas y los macacos son diferentes y que la Peroxisomicina A<sub>1</sub> sigue rutas metabólicas diferentes.

#### 4.3 DETERMINACION DE LAS HEMOPROTEINAS TOTALES

Las Hemoproteínas totales son un indicador, tanto de la cantidad de sustrato disponible para las enzimas microsomales que contienen hierro como grupo prostético, como del contenido de éstas. Por tal razón pueden ser utilizadas como una medida indirecta del Citocromo P-450, la NADH Citocromo b<sub>5</sub> reductasa y la NADPH Citocromo P-450 reductasa (5).

Los resultados obtenidos con los microsomas de *Macaca mulata* no incubados e incubados (Tabla 15 y 16), muestran un aumento de la cantidad de Hemoproteínas con las dosis de 5, 10, y 25 µg/mL de Peroxisomicina A<sub>1</sub>, excepto con la dosis de 50 µg/mL, donde la cantidad fue semejante a la obtenida en el control. Sin embargo, si bien con la dosis de 25 µg/mL se produce un aumento en la concentración de Hemoproteínas con respecto al control, este aumento es estadísticamente menor al observado con la dosis de 10 µg/mL.

Los resultados obtenidos con los microsomas de *Macaca mulata* para la concentración de Hemoproteínas totales correlacionan con la actividad observada en las enzimas que se midieron.

Por otra parte, no todas las Hemoproteínas se encuentran como enzimas activas, sino también como enzimas inactivas y éstas pueden activarse en presencia de un sustrato adecuado.

Con respecto a los microsomas de rata no incubados e incubados (Tablas 17 y 18), se observó un aumento en la concentración de Hemoproteínas totales con todas las dosis de Peroxisomicina A<sub>1</sub>. Sin embargo, la dosis de 10 mg/mL produjo el mayor incremento en la concentración y, posteriormente, las dosis de 25 y 50 µg/mL, mostraron un decremento en la concentración al compararse con la dosis de 10 µg/mL. Los microsomas de rata Wistar incubados presentan mayor concentración de Hemoproteínas totales que los microsomas no incubados, probablemente, por influencia tanto de la temperatura, como del factor tiempo.

Dado que, proporcionalmente, el aumento en la concentración de Hemoproteínas totales es mayor en los microsomas de rata que en los de macaca, estos resultados, pudieran indicar que, como la concentración de Hemoproteínas totales comprende tanto a las enzimas activas como a las proteínas y/o enzimas no activas, la mayor parte de éstas se encuentra en forma de enzimas inactivas o como parte de otras proteínas. Esta situación confirma las evidencias de las variaciones metabólicas que existen entre las diferentes especies.



Por otra parte, el hecho de que en las ratas la cantidad de las Hemoproteínas totales no sea proporcional a la de las enzimas sugiere que probablemente, en esa especie, la Peroxisomicina A<sub>1</sub> siga otra vía metabólica que involucre a otro tipo de enzimas.

#### 4.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA NADPH CITOCROMO P-450 REDUCTASA

La NADPH Citocromo P-450 reductasa es una de las enzimas más importantes del sistema enzimático microsomal, pues interviene en el metabolismo de la mayoría de los xenobióticos, característica que hace que sea la enzima de elección en las evaluaciones metabólicas de cualquier compuesto <sup>(5,6,7,8)</sup>.

Los resultados obtenidos de la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con los microsomas de *Macaca mulata* no incubados e incubados, con la NADPH Citocromo P-450 reductasa, muestran un aumento significativo en la actividad de esta enzima (Tablas 19 y 20), que es dosis-dependiente con respecto a las diferentes concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub>.

Con respecto a las determinaciones enzimáticas realizadas con los microsomas de rata Wistar no incubados e incubados, los resultados no mostraron diferencias significativas (Tablas 21 y 22), lo cual difiere

notablemente a lo observado en los microsomas de *Macaca mulata*, lo que confirma nuevamente las diferencias metabólicas interespecie.

La Citocromo P-450 reductasa es una enzima que, en el caso de los macacos, parece intervenir en forma importante en el metabolismo de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, al igual que las monooxigenasas de función mixta dependientes del Citocromo P-450 y que la Citocromo b<sub>5</sub> reductasa. Así, conjuntando los resultados obtenidos de las enzimas y de las Hemoproteínas totales, se puede afirmar que la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, en el caso de los microsomas de *Macaca mulata*, es metabolizada por la mayoría de las enzimas que conforman las diferentes rutas metabólicas llevadas a cabo por las monooxigenasas de función mixta.

Por otra parte, si bien las enzimas microsomales catalizan reacciones de oxidación y de reducción, el importante aumento de actividad que presenta la NADPH Citocromo P-450 reductasa, en el caso de los microsomas de *Macaca mulata*, pudiera indicar que la Peroxisomicina A<sub>1</sub> presenta predominantemente reacciones de reducción. Este hecho también se puede observar con la NADH Citocromo b<sub>5</sub> reductasa. Además, compuestos con estructura semejante a la Peroxisomicina A<sub>1</sub> presentan procesos tanto de oxidación como de reducción, a partir de los cuales generan radicales libres. Sin embargo, aunque se han llevado a cabo estudios para analizar la existencia de los posibles metabolitos de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, no se han logrado detectar. Posiblemente estos metabolitos sean intermediarios reactivos que estén en transformación constante, por lo que sea difícil detectarlos.

#### 4.5 PROCESO DE AUTOOXIDACION Y GENERACION DE RADICALES LIBRES

Además de evaluar la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con algunas enzimas microsomales del sistema de las monooxigenasas de función mixta, también se evaluó el posible proceso de autooxidación de esta sustancia y la concomitante generación de radicales libres. Como ya se ha mencionado, la estructura de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> hace suponer que es capaz de autooxidarse y, consecuentemente, producir radicales libres capaces de interactuar con las macromoléculas intracelulares y alterar así sus funciones. El fenómeno de generación de radicales libres y su interacción con las macromoléculas intracelulares también puede formar parte de los mecanismos por los cuales esta sustancia tiene efecto antineoplásico <sup>(12)</sup>.

La evaluación de la autooxidación y la posterior generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> fue realizada tanto en ausencia, como en presencia de sistemas enzimáticos (microsomas de *Macaca mulata* y rata Wistar). Las concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub> fueron las mismas a las usadas durante la evaluación de los procesos metabólicos. Para estas determinaciones se usó al Pirogalol, a una concentración de 5.6 µM, como control positivo.

Todos los procesos de autooxidación fueron seguidos durante una hora. En este caso, no se incubaron los microsomas debido a que se

espera que la generación de radicales libres sea inmediata a la adición de Peroxisomicina A<sub>1</sub> al medio.

Para evaluar si la Peroxisomicina A<sub>1</sub> tiene la capacidad de autooxidarse y así, generar radicales libres, se realizaron determinaciones de la generación de estos radicales libres en ausencia de los sistemas enzimáticos aportados por la fracción microsomal.

Los cálculos de la generación de radicales libres se hicieron en base a las diferencias de absorbancia en relación al tiempo y con el uso del coeficiente de extinción molar del Citocromo C, que fue el aceptor artificial de electrones.

Los resultados obtenidos (Tabla 23) indican que, la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, es capaz de autooxidarse y de generar radicales libres, de manera dosis-dependiente. Por otra parte, los resultados indican que, aún cuando la Peroxisomicina A<sub>1</sub> es capaz de generar radicales libres, al comparar las concentraciones molares, lo hace en menor proporción que el Pirogalol (control positivo).

Posteriormente, se evaluó la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> en un medio que contenía microsomas de *Macaca mulata*. Es conocido que el sistema enzimático microsomal y, particularmente, el sistema del Citocromo P-450, es capaz de catalizar la formación de metabolitos altamente reactivos en base a la estructura del sustrato <sup>(9,12)</sup>.

Sin embargo, aunque en las reacciones catalizadas por las enzimas microsomales se generen radicales libres, la proporción es menor

a la observada durante los procesos de autooxidación, pues las enzimas regulan las reacciones de óxido-reducción.

Los resultados indican que, la Peroxisomicina A<sub>1</sub> generó radicales libres (Tabla 24) en presencia de los microsomas de *Macaca mulata*. La generación de los radicales libres fue dosis-dependiente y fue menor en presencia de los sistemas enzimáticos, que en ausencia de éstos, aún en el caso del Pirogalol.

Así, la Peroxisomicina A<sub>1</sub> también genera radicales libres en presencia de las enzimas microsomales, aunque en menor proporción. Probablemente, las enzimas microsomales pueden ejercer una acción moduladora, mediante la cual, aunque sí se produce la generación de radicales libres, el proceso es más lento que en ausencia de las enzimas.

Los resultados de las evaluaciones realizadas con los microsomas de rata Wistar indicaron que la generación de radicales libres fue dependiente de la dosis de Peroxisomicina A<sub>1</sub> (Tabla 25). También en este caso, el Pirogalol generó una mayor cantidad de radicales libres que la Peroxisomicina A<sub>1</sub>.

Al comparar la generación de radicales libres en presencia de los microsomas de rata Wistar, con la generación de radicales libres en presencia de microsomas de *Macaca mulata*, se observó que los microsomas de la rata producen una mayor cantidad de radicales libres.

Por otra parte, los resultados obtenidos en las evaluaciones de la interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con las enzimas microsomales,

mostraron una menor actividad en los microsomas de rata Wistar, en comparación con los microsomas de *Macaca mulata*. Esta menor actividad enzimática, unida a los resultados que muestran que el Pirogalol y la Peroxisomicina A<sub>1</sub> producen una mayor generación de radicales en presencia de estos microsomas, confirma que las enzimas microsomales modulan la generación de radicales libres y, de esta manera, aunque éstos se produzcan, el proceso es más lento.

#### **4.6 PROCESO DE INHIBICION DE LA AUTOOXIDACION Y GENERACION DE RADICALES LIBRES CON LA SUPEROXIDO DISMUTASA**

Después de evaluar y confirmar la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, fue importante el tratar de determinar que tipo de radicales son los que se producen. Como ya se ha mencionado, compuestos con una estructura semejante a la Peroxisomicina A<sub>1</sub> generan radicales libres como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el ión hidroperóxido <sup>(9,12)</sup>. Así, la Superóxido dismutasa (SOD) fue elegida debido a que, es la enzima que cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno (como intermediario de esta reacción puede producirse el radical hidroxilo).

Inicialmente, se evaluó la inhibición de la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol con la SOD, en ausencia de los sistemas enzimáticos aportados por los microsomas.

Los resultados obtenidos con el Pirogalol (Tabla 26) muestran que la SOD sí produjo una inhibición en la generación de radicales libres, en forma dosis-dependiente.

Por otra parte, el hecho de que la SOD sea capaz de inhibir el proceso de generación de radicales por el Pirogalol, confirma que el anión superóxido forma parte de estos radicales libres <sup>(47)</sup>.

Los resultados obtenidos con la Peroxisomicina A<sub>1</sub> (5, 10, 25 y 50 µg/mL) indicaron que, al igual que en el caso del Pirogalol, la SOD también inhibe la generación de radicales libres. El proceso de inhibición fue directamente proporcional a la concentración de enzima usada (Tablas 27, 28, 29 y 30). La única diferencia existente entre las diferentes concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub>, es que la cantidad de SOD requerida para la inhibición fue mayor de acuerdo al incremento en la concentración de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>. Al final, en todas las concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub> se produjo una inhibición total con la dosis de 400 U/mL de SOD.

Si se comparan los resultados obtenidos con la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con los del Pirogalol, se observa que la Peroxisomicina A<sub>1</sub> requiere de una menor concentración de la SOD para inhibir la generación de radicales libres. En realidad, este es un proceso lógico, debido a que la Peroxisomicina A<sub>1</sub> también genera una menor cantidad de radicales libres que el Pirogalol al realizar una comparación de sus concentraciones molares.

Posteriormente, se evaluó la inhibición de la generación de radicales libres de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y del Pirogalol con la SOD, en presencia de los microsomas de *Macaca mulata*. De esta manera, también se observó la influencia de las enzimas microsomales en los procesos de inhibición.

Las concentraciones de SOD que se utilizaron fueron de 50, 100, 150 y 200 U/mL, debido a que en el caso de la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, las concentraciones que se requirieron para inhibir la generación de radicales libres fueron menores en presencia de los sistemas enzimáticos.

Al evaluar el efecto inhibitorio producido por la SOD en la generación de radicales libres por el Pirogalol, sólo se presentaron los resultados obtenidos con la dosis de 200 U/mL de SOD (Tabla 31). Las evaluaciones con 50, 100 y 150 U/mL de SOD no se realizaron, debido a que, la dosis de 200 U/mL, que fue la más alta, produjo tan sólo un 13.4 % de inhibición. Como ya se ha mencionado, las concentraciones de SOD utilizadas para la inhibición de la generación de radicales libres en presencia de sistemas enzimáticos, se basaron en el grado de inhibición que presentó la Peroxisomicina A<sub>1</sub>; sin embargo, estas concentraciones fueron insuficientes para inhibir la generación de radicales libres con el Pirogalol.

Con respecto a las evaluaciones sobre el efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, los resultados indicaron una inhibición dosis-dependiente de la generación de anión superóxido. También en este caso, cuanto mayor fue la concentración de Peroxisomicina A<sub>1</sub>, mayor es la cantidad de SOD



necesaria para inhibir la generación del anión superóxido (Tablas 32, 33, 34 y 35).

Los resultados indican que tanto con la Peroxisomicina A<sub>1</sub> como con el Pirogalol, cuando están presentes las enzimas microsomales, se requiere de una menor concentración de SOD para inhibir la generación de radicales libres.

También se evaluó la inhibición de los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con la SOD, en presencia de los microsomas de rata Wistar. Las cantidades de SOD fueron las mismas a las usadas en presencia de los microsomas de *Macaca mulata*. Igualmente, no se realizaron las evaluaciones de la inhibición del anión superóxido generado por el Pirogalol con las dosis de 50, 100 y 150 U/mL de SOD.

En este caso, también se observó que existe un mayor grado de inhibición cuando están presentes los sistemas enzimáticos. Sin embargo, el grado de inhibición de los radicales libres producidos por el Pirogalol (Tabla 36) fue menor en las determinaciones realizadas con los microsomas de ratas Wistar al observado en los microsomas de macaco.

Por otra parte, en las evaluaciones realizadas sobre el efecto inhibitorio de la SOD en la generación de radicales libres con las diferentes concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub>, se observó que la inhibición fue muy semejante a lo observado con los microsomas del macaco, donde el proceso fue dosis-dependiente a la concentración de la SOD (Tablas 37, 38, 39 y 40). Igualmente, el grado de inhibición de la

generación de radicales libres en presencia de los microsomas de rata fue menor al observado con los microsomas de macaco.

En todos los experimentos anteriores, con todas las dosis de Peroxisomicina A<sub>1</sub> empleadas se observó que la generación de anión superóxido fue menor en los microsomas de macaco que en los de rata y, por lo tanto, la inhibición producida por las mismas concentraciones de SOD fue mayor en los microsomas de macaco. En ambos sistemas microsomales se logró la inhibición total con la concentración de 200 U/mL de SOD.

De esta manera, estos resultados también apoyan el supuesto de que el sistema enzimático microsomal pudiera actuar como un modulador en el proceso de generación de los radicales libres.

#### **4.7 PROCESO DE INHIBICION DE LA AUTOOXIDACION Y GENERACION DE RADICALES LIBRES CON LA CATALASA**

Después de que se determinó que la SOD inhibe el proceso de generación de radicales libres y que, por lo tanto, la Peroxisomicina A<sub>1</sub> es capaz de generar al anión superóxido, también se evaluó la posible inhibición de la generación de los radicales libres con la Catalasa, una enzima que cataliza el paso de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. Durante la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno por la SOD se produce el radical hidroxilo como un intermediario. Debido a esto, se ha considerado que la Catalasa es una medida indirecta de la

generación tanto del anión superóxido, como del radical hidroxilo, un intermediario altamente reactivo del oxígeno.

Las concentraciones de Catalasa utilizadas para la inhibición de la generación de radicales hidroxilo fueron 25, 50, 100 y 200 U/mL. Las concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub> y las condiciones experimentales para estas determinaciones, fueron las mismas a las usadas durante la evaluación del proceso de inhibición con la SOD.

Como primer paso se evaluó la posible inhibición de la generación de radicales libres de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol con la Catalasa, en ausencia de los sistemas enzimáticos aportados por los microsomas.

Los resultados obtenidos acerca del proceso de inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol indicaron que la Catalasa inhibe este proceso (Tabla 41), lo cual indica que el Pirogalol además de generar al anión superóxido, también es capaz de generar al radical hidroxilo <sup>(47)</sup>. No se realizaron las determinaciones con las dosis de 25, 50 y 100 U/mL de Catalasa, debido a que la dosis más alta, de 200 U/mL no fue capaz de inhibir la totalidad de los radicales libres.

En las evaluaciones realizadas del efecto inhibitorio de la Catalasa sobre los radicales libres generados por las diferentes concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub>, los resultados indicaron que la inhibición fue dependiente de la concentración de Catalasa usada (Tablas 42, 43, 44 y 45).

En comparación con los resultados obtenidos con la SOD, se observa que, las concentraciones requeridas de Catalasa requeridas fueron menores a las concentraciones de SOD.

Durante la inhibición de la generación del anión superóxido en ausencia de sistemas microsomales, las concentraciones de SOD necesarias para inhibir la totalidad de los radicales libres fueron de 400 U/mL, mientras que, con la Catalasa se produjo una inhibición total con la concentración de 50 U/mL. Este fenómeno pudiera indicar que, aunque entre los radicales libres producidos por la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, pudiera estar el radical hidroxilo, la producción de anión superóxido sería mayor.

Posteriormente, se evaluó la inhibición de la generación de radicales libres de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol con la Catalasa, en presencia de los microsomas de *Macaca mulata*.

Los resultados de la inhibición de los radicales libres generados por el Pirogalol muestran una inhibición total de la generación de radicales libres con la concentración de 200 U/mL de Catalasa (Tabla 46).

Si estos resultados se comparan con los obtenidos con la SOD en las mismas condiciones, se observa que la dosis de 200 U/mL de SOD no fue capaz de inhibir la totalidad de la generación del anión superóxido, mientras que esta misma dosis de Catalasa inhibió totalmente la generación de radicales libres. Así, es probable que el Pirogalol también genere una mayor proporción de anión superóxido que de radical hidroxilo, en presencia de los microsomas de macaco.

Por otra parte, también se observa que, en presencia de los microsomas de macaco, las mismas dosis de Catalasa producen una mayor inhibición de los radicales libres que en ausencia de los microsomas.

Al evaluar el efecto inhibitorio de la Catalasa en los radicales libres generados por las diferentes concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub>, los resultados indicaron una inhibición dosis-dependiente, donde la inhibición fue total con todas las dosis de Catalasa utilizadas.

Al igual que con el Pirogalol, en el caso de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> se observa que la Catalasa es capaz de inhibir la totalidad de los radicales libres y, por lo tanto, pudiera suponerse también que existe una mayor generación de anión superóxido que de radical hidroxilo (pues la Catalasa es usada para inhibir indirectamente la generación del anión superóxido y de radical hidroxilo).

En forma semejante, se observa que las mismas dosis de Catalasa producen una mayor inhibición en presencia de los microsomas que en ausencia de éstos, hecho que, corrobora la hipótesis de que las enzimas microsomales ejercen una acción moduladora en la generación de radicales libres.

Finalmente, se evaluó el efecto inhibitorio producido por la Catalasa en los radicales libres generados por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> y el Pirogalol, en presencia de los microsomas de rata Wistar.

Los resultados obtenidos con el Pirogalol en los microsomas de rata Wistar indican que la Catalasa inhibe la generación de los radicales libres. Si estos resultados se comparan con los resultados obtenidos con la SOD, se presenta el mismo fenómeno observado en los casos anteriores, la proporción de la inhibición es mayor con la Catalasa.

Los resultados obtenidos de la inhibición de los radicales libres generados por las diferentes concentraciones de Peroxisomicina A<sub>1</sub> con la Catalasa en presencia de los microsomas de rata Wistar, también muestran que la inhibición es dosis-dependiente a la concentración de la enzima utilizada y que la proporción de la inhibición es mayor con la Catalasa que con la SOD.

Por otra parte, al comparar los resultados obtenidos con los microsomas de las ratas con los microsomas de macaco, se observa que las mismas dosis de Catalasa inhiben una menor proporción de los radicales libres en los microsomas de ratas.

Como ya se ha mencionado (Pág. 112), en este trabajo de tesis se ha observado que las enzimas microsomales presentes en los macacos son más activas que las presentes en las ratas y, si estas enzimas tuvieran un efecto modulador en la producción de radicales libres, posiblemente retardando el proceso, entonces sería lógico que las mismas dosis de Catalasa tengan un menor efecto, en los microsomas de las ratas.

Los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis y su posterior discusión nos llevan a aceptar las hipótesis planteadas:

La Peroxisomicina A<sub>1</sub> interacciona con el sistema enzimático microsomal y genera radicales libres como parte de su mecanismo de toxicidad celular.

La Peroxisomicina A<sub>1</sub> es capaz de autooxidarse y generar radicales libres, aún en ausencia de sistemas enzimáticos y este proceso también puede formar parte de su mecanismo de acción.

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

Con este trabajo de tesis se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- La Peroxisomicina A<sub>1</sub> interacciona con las monooxigenasas de función mixta presentes en el sistema enzimático microsomal.
- La interacción de la Peroxisomicina A<sub>1</sub> con las enzimas microsomales presenta diferencias interespecie.
- En los microsomas de *Macaca mulata*, la Peroxisomicina A<sub>1</sub> interacciona con todas las enzimas microsomas evaluadas.
- La Peroxisomicina A<sub>1</sub> es capaz de autooxidarse y generar radicales libres.



- La Peroxisomicina A<sub>1</sub> también genera radicales libres en presencia de los sistemas enzimáticos microsomales.
- La generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> es mayor en ausencia de las enzimas microsomales hepáticas, por lo tanto, estas enzimas ejercen una acción moduladora en la generación de estos radicales libres.
- La SOD inhibe la generación de los radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, tanto en ausencia como en presencia de los sistemas enzimáticos microsomales, lo que indica que el anión superóxido es uno de los radicales que se producen.
- La Catalasa inhibe la generación de los radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub>, lo que indica que, además del anión superóxido, se genera también el radical hidroxilo.
- La generación de radicales libres por la Peroxisomicina A<sub>1</sub> es mayor en presencia de los microsomas de rata Wistar que en los de *Macaca mulata*, lo que indica que existen diferencias interespecie entre la rata y el macaco en la capacidad de generar radicales libres.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lerma-Ortiz, Mayra. (1997). "De la alquimia a la farmacología." *Revista Médica de Arte y Cultura*. Tomo I, 13.
- 2.- Smith, C.M. and Reynard, A.M. (1993). "Farmacología." *Médica Panamericana* (Ed.), 22.
- 3.- Katzung, B.G. (1994). "Farmacología Básica y Clínica." 5a. edición. *Manual Moderno* (Ed.), 61.
- 4.- Velázquez, L. (1987). "Farmacología y su proyección a la Clínica." 15a. edición. *Oteo* (Ed.). 25-31.
- 5.- Mannering, G.J. (1981) "Hepatic Cytochrome P-450-linked Drug-metabolizing Systems." En "Concepts in Drug Metabolism." Jenner, P. and Testa, B. (Ed.) *Marcel Dekker Inc.* 53-57.
- 6.- Kalant, H. and Roschlau, W.H.E. (1989). "Principles of Medical Pharmacology." 5a. edición. *B.C. Dekker Inc.* (Ed.) 35-37.
- 7.- Kappus, H. (1986). "Overview of Enzyme Systems Involved in Bioreduction of Drugs and Redox Cycling." *Biochem. Pharmacol.* 35, 1-6.
- 8.- Bus, J.S. and Gibson, J.E. (1984). "Role of Activated Oxygen In Chemical Toxicity." En "Drug Metabolism and Drug

- Toxicity." Mitchell, J.R. and Horning, M.G. (Ed.). Raven Press, New York, 21-32.
- 9.- Mason, R.P. and Chignell, C.F. (1982). "Free Radicals in Pharmacology and Toxicology Selected Topics." *Pharmacological Reviews* 32(4), 189-210.
- 10.- Kappus, H. and Sies, H. (1981). "Toxic Drug Effects Associated with Oxygen Metabolism: Redox Cycling and Lipid Peroxidation." *Experientia* 37(12), 1233-1241.
- 11.- Clark, I.A.; William B.C. and Hunt, N.H. (1985) "Free Radicals Induced Pathology." *Medicinal Research Reviews* 5 (3), 297-332.
- 12.- Trush, M.A.; Mimnaugh, E.G. and Gram, T.E. (1982). "Activation of Pharmacologic Agents to Radical Intermediates. Implications for the Role of Free Radicals in Drug Action and Toxicity." *Biochemical Pharmacology* 31 (21), 3335-3346.
- 13.- Deby, C. and Goutier, R. (1990). "New Perspectives on the Biochemistry of Superoxide Anion and the efficiency Of Superoxide Dismutases." *Biochemical Pharmacology* 39 (3), 399-405.
- 14.- Clavijero, F.X. (1920). "Introducción a la historia de la antigua Baja California." México, D.F., Porrúa S.A., 31-32.
- 15.- Castillo Nájera, F. (1982). "Contribución al estudio de la parálisis tóxica. Un envenenamiento colectivo con Tullidora." Memoria del V Congreso Mexicano, Dirección de Talleres Gráficos, Vol.1, 240.

- 16.- Del Pozo, E. (1965). "Los efectos paralizantes de la Tullidora. Estudios clínicos y experimentales." *Gaceta Médica de México* 95, 163.
- 17.- Escobar, A. y Nieto, D. (1965). "Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*." Estudio experimental. *Gaceta Médica de México* 95, 179.
- 18.- Padrón Poyou, F. (1951). "Estudio clínico experimental por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora)." *Neuropath. Appl. Neurob.* 9, 121.
- 19.- Puertolas, M.; Nava, O.; Medina, H.; López, F. y Oyervides, J. (1984). Polirradiculitis por *Karwinskia humboldtiana*." *Rev. Med. I.M.S.S. (México)*, 22, 25.
- 20.- Bermúdez, M.V.; González Spencer, D.; Guerrero, M.; Waksman, N. and Piñeyro, A. (1986). "Experimental Intoxication with Fruit and Purified Toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*)." *Toxicon.* 42, 1091.
- 21.- Dreyer, D.; Arai, I.; Bashman, C.; Anderson, W.; Smith, R. and Daves, D. (1975). "Toxins Causing non Inflammatory Paralytic Neuropathy. Isolation and Estructure Elucidation." *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4985-4990.
- 22.- Waksman, N. and Martínez, L. (1989). "Chemical and Toxicological Screening in genus *Karwinskia*." (México). *Rev. Latinoamer. Quím.* 20/1, 27-29.
- 23.- Waksman, N. and Ramírez Durón, R. (1988). "Chemical and Toxicological Investigation of *Karwinskia parvifolia*." International Congress on Natural Products Research. Park City, Utah, U.S.A., July 1988.

- 24.- Rivas, V.; Torres, R. and Waksman de Torres, N. (1990). "Dimeric Anthracenones from *Karwinskia* species." *Planta Med.* 56, 562.
- 25.- Bermúdez, M.V. (1989). "Toxicidad aguda de la *Karwinskia humboldtiana* en diferentes especies de animales." Disertación doctoral. U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León.
- 26.- Garza, L.; Nsieh, G.C.; Acosta, D.; Torres, O. and Piñeyro, A. (1992). "Toxicity assessment of Toxins T-514 and T-544 of Buckthorn (*K. humboldtiana*) in Primary Skin and Liver Cell Cultures." *Toxicology* 73, 259-267.
- 27.- Piñeyro, A.; Martínez, L. and González, R. (1994). "In vitro selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines." *Toxicology* 92, 217-227.
- 28.- Piñeyro, A. (1995). Europaischen Patentblatt 95/48 (29.11.95) Patentnummer: 0467407.
- 29.- Piñeyro, A. (1996). Bioscience patent "Pharmaceutically acceptable anthracene compounds" Number: 5578646.
- 30.- Patente japonesa No. 2651758.
- 31.- Sepúlveda, J.; Van der Klei, I.; Keizer, I.; Piñeyro, A.; Harder, W. and Veenhuis, M. (1992). "Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeast." *FEMS Microbiology Letter* 91, 207-212.
- 32.- Moreno, M.; Vargas, R.; Esquivel, D.; Waksman, N. and Piñeyro, A. (1995). "Effect of Peroxisomicine and Related Anthracenones on Catalase Activity." *Planta Med.* 61, 337-340.

- 33.- Komiyama, T.; Kikuchi, T. and Sugiura, Y. (1982). "Generation of Hydroxyl Radical by Anticancer Quinone Drugs, Carbazilquinone, Mitomycin C, Aclacinomycin A and Adriamycin, in the presence of NADPH-Cytochrome P-450 Reductase." *Biochem. Pharmacol.* 31(22), 3651-3656.
- 34.- Sinha, B.K.; Katky, A.G.; Batist, G.; Cowan, K.H. and Myers, C.E. (1987). "Differential formation of hidroxyl radicals by Adriamycin in sensitive and resistant MCF-7 human breast tumor cells: implications for the mechanism of action." *Biochemistry* 26(13), 3776-3781.
- 35.- Kharasch, E.D. and Novak, R.F. (1981). "Anthracenediona Activation by NADPH Cytochrome P-450 Reductase; Comparision with Anthracyclines." *Biochem. Pharmacol.* 30(20), 2881-2884.
- 36.- Dodd N.j.F. and Tulsii, M. (1984). "Free Radicals formation from Antracycline Antitumour Agents and Model Systems." *Biochemical Pharmacology* 33(3) 379-385.
- 37.- Lowry, O.H.; Rosebrough, H.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin reagent." *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 38.- Guerrero, M.; Pifleyro. A. and Waksman, N. (1987). "Extractions and Quantification of Toxins from *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora)." *Toxicon.* 25, 565-568.
- 39.- Estabrook, R.W. (1984). "Cytochrome P-450 and Oxygenation Reactions: A Status Report." En "Drug Metabolism and Drug Toxicity." Mitchell, J.R. and Horning, M.G. (Ed.). Raven Press, New York, 1-17.

- 40.- Omura, T. and Sato, R. (1964). "The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes." *J. Biol. Chem.* 239 (7), 2370-2385.
- 41.- Lake, B.G. (1987). "Preparation and Characterization of Microsomal Fractions for Studies on Xenobiotic Metabolism." En "Biochemical toxicology, a practical approach" Snell, K. and Mullock, B. (Ed.) IRL Press, Oxford, Washington, D.C. 183-215.
- 42.- Gilbert, D. (1972). "Determination of Protohaem in Liver Microsomes." *Biochem. Pharmacol.* 21, 2933-2936.
- 43.- Bond, E.J. and de Matteis (1969). "Biochemical changes in rat liver after administration of carbon disulphide, with particular reference to microsomal changes." *Biochem. Pharmacol.* 18, 2531-2549.
- 44.- Phillips, A.H. and Langdon, R.G. (1962). "Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: Isolation, characterization, and kinetics studies." *J. Biol. Chem.* 237, 2652-2660.
- 45.- Peterson, J.A.; Ebel, R.E. and O'Keefe, D.H. (1978). "Dual-wavelength stopped-flow spectrophotometric measurement of NADPH-cytochrome P-450 reductase." *Methods Enzymol.* 52, 221-226.
- 46.- Vermilion, J.L. and Coon, M.J. (1978). "Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase: Spectral characterization of oxidation-reduction states." *J. Biol. Chem.* 253, 2694-2704.

- 47.- Salvemini, D.; de Nucci, G.; Sneddon, J.M. and Vane, J.R. (1989). "Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation." *Br. J. Pharmacol.* 97, 1145-1150.





