

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



## TESIS DOCTORAL

**Biotransformación metabólica e inhibición enzimática de los alcaloides  $\beta$ -carbolina presentes en alimentos y plantas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Hugo Guillén Fuerte**

Director

Tomás Herraiz Tomico

**Madrid, 2015**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**Facultad de Veterinaria**  
**Departamento de Nutrición, Bromatología, y**  
**Tecnología de Alimentos**

# **Biotransformación metabólica e inhibición enzimática de los alcaloides $\beta$ -carbolina presentes en alimentos y plantas**

Memoria que para optar al grado de Doctor presenta

**Hugo Guillén Fuerte**

Bajo la dirección del

**Dr. Tomás Herraiz Tomico**



**Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición**  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

Madrid 2015





MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICION (ICTAN)

**Tomás Herraiz Tomico, Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid e Investigador Científico de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC),**

**CERTIFICA:** Que la memoria científica titulada **Biotransformación metabólica e inhibición enzimática de los alcaloides  $\beta$ -carbolina presentes en alimentos y plantas**, que presenta D. Hugo Guillén Fuerte, Licenciado en Ciencias, para optar al grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Para que quede constancia de ello a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Madrid con fecha de 14 de Abril de dos mil quince.

Dr. Tomás Herraiz Tomico

SEDE CIUDAD UNIVERSITARIA:

C/ JOSÉ ANTONIO NOVÁIS, 10  
CIUDAD UNIVERSITARIA  
28040 MADRID, ESPAÑA  
TELS.: 91 544 56 07 – 91 549 23  
00  
FAX: 91 549 36 27

SEDE JUAN DE LA  
CIERVA:

C/JUAN DE LA CIERVA, 3  
28006 MADRID, ESPAÑA  
TELS.: 91 562 29 00  
FAX: 91 564 48 53



ALCANJE: La gestión y ejecución de proyectos y contratos de investigación en el área de ciencia y tecnología de alimentos y nutrición.



## ***Agradecimientos....***

Se torna difícil en tan poco espacio poder expresar la gratitud que siento por todas las personas que me han apoyado para poder desarrollar esta Tesis Doctoral, sin embargo quisiera mencionar a aquellos que especialmente tuvieron un papel importante durante este tiempo.

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Tomás Herraiz Tomico por haber depositado en mi persona la confianza para poder llevar a cabo la tarea de esta Tesis Doctoral, gracias por abrirme su laboratorio, permitir desarrollarme como profesional, y como persona mientras estuve a su cargo.

Quisiera hacer mención especial al Dr. Lorenzo de la Hoz Perales, Catedrático del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por haber aceptado ser mi tutor durante el programa de doctorado y la obtención del DEA, así como de este trabajo doctoral hasta su fallecimiento. Asimismo, a la Dra. Manuela Fernández Álvarez, profesora y Vicedecana de la misma Facultad, por su ayuda y orientación para la presentación de esta memoria para su defensa.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por la concesión de una beca del programa JAE-predocctoral, apoyado en parte con el Fondo Social Europeo (FSE), que me permitió desarrollar el trabajo experimental dentro del IFI-CSIC e ICTAN-CSIC. Dentro del mismo programa JAE, agradezco la concesión de una ayuda para estancias breves en centros de investigación de prestigio, que me permitió la estancia en la Universidad de Chile bajo la supervisión del Dr. Claudio Olea Azar. También agradezco la financiación de la investigación desarrollada a través de los proyectos AGL2006-02414 y AGL-2010-18448 (Plan Nacional de investigación) y del proyecto intramural 200470E658 (CSIC) concedidos al Dr. Tomás Herraiz.

Agradezco a la Directora del Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI) y a la Directora del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Centros Públicos de Investigación del CSIC, donde se ha realizado este trabajo, por las todas las facilidades prestadas durante su realización.

Al Dr. Claudio Olea Azar, profesor de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, Santiago de Chile, por abrirme las puertas de su laboratorio y de su grupo de trabajo (con Jeanette Rodríguez, Roberto Figueroa, Michel Lapier, Alejandra Morales, y Francisco Mura), los cuales durante la estancia predoctoral que realicé en Santiago de Chile, me hicieron sentir como si estuviera en casa.

A la Dra Marta Calvo, Dra. Marta Herraiz, Dr. Guillermo Santa María, Dra. Carmen Barba, Dra. Rosa María Martínez, a los técnicos Pepa y Julián; también a la Dra. R. Muñoz e investigadores y becarios del laboratorio de Microbiología (los pasados y los presentes), al Dr. Ignacio Garrido, Dr. Fernando Sánchez Patán y Javier Martínez Sigüero, todos ellos pertenecientes (o que han pertenecido en algún momento) al extinto Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI-CSIC), ahora Instituto de Ciencia Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), quiero expresarles las gracias por brindarme todo su apoyo cuando lo necesité.

Al Dr. Vicente Arán y a la Dra. Nadine Jagerovic, del vecino Instituto de Química Médica del CSIC, por la completa accesibilidad a sus respectivos grupos de trabajo y laboratorios, y por su apoyo.

No quisiera olvidarme de agradecer a mis compañeros de laboratorio: el Dr. Juan Galisteo, Francisco Javier Barroso, Marcos Lechón, Gemma Caballero, Diana González y Joaquín Craus, con los que he tenido la suerte de coincidir en el día a día del laboratorio. Quisiera también hacer especial mención al Dr. Felipe Reviriego, al Dr. José María Cumella y al Dr. Mario Hoyos por apoyarme especialmente en estos últimos años en los que más difícil se me ha hecho la finalización de esta Tesis al estar fuera de Madrid.

Por último no quiero olvidarme de mi familia: mi hermano y mi cuñada por darme siempre el apoyo necesario y escucharme en los momentos en los que lo necesitaba, y especialmente, sobre todo quiero agradecerélos a mis padres; que siempre han estado ahí, han sido mi guía y un ejemplo de esfuerzo y honradez tanto en el trabajo como en la vida misma, espero que este trabajo les llene de orgullo.

A todos muchas gracias por haber caminado conmigo en este apasionante viaje.

## ***Índice de abreviaturas (por orden alfabético)***

<b>ABTS<sup>•+</sup></b>	Catión radical ácido 2,2'-(azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>AHAs</b>	Aminas heterocíclicas aromáticas
<b>AHR</b>	Receptor de hidrocarburos arílicos
<b>AαC</b>	2-Amino-α-carbolina
<b>B[a]P</b>	Benzo[a]pireno
<b>Cit. P450</b>	Citocromo P450
<b>DAD</b>	Detector Array de Diodos
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>dhβc<sup>+</sup></b>	Catión dihidro-β-carbolinio
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DMPO</b>	5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
<b>EM</b>	Metabolizadores extensivos (citocromo P450 2D6)
<b>ESI</b>	Ionización electrospray
<b>FAD</b>	Flavin Adenin Dinucleótido
<b>FLD</b>	Detección fluorescente
<b>FMN</b>	Flavin Mononucleótido
<b>HPAs</b>	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración de compuesto que proporciona una inhibición del 50 %.
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de inhibición
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>MAO</b>	Monoaminoxidasa
<b>MPDP<sup>+</sup></b>	Catión 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>MPTP-OH</b>	4-(4'-hidroxifenil)-1-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>MPP<sup>+</sup></b>	Catión 1-metil-4-fenilpiridinio
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>m/z</b>	Relación masa/carga del ion
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>OH-βc</b>	Hidroxi-β-carbolina
<b>OH-thβc</b>	Hidroxi-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolina
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Radical anión superóxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>PD</b>	Enfermedad de Parkinson ( <i>Parkinson's disease</i> )
<b>PM</b>	Metabolizadores pobres o lentos (citocromo P450 2D6)
<b>pmol</b>	Picomol

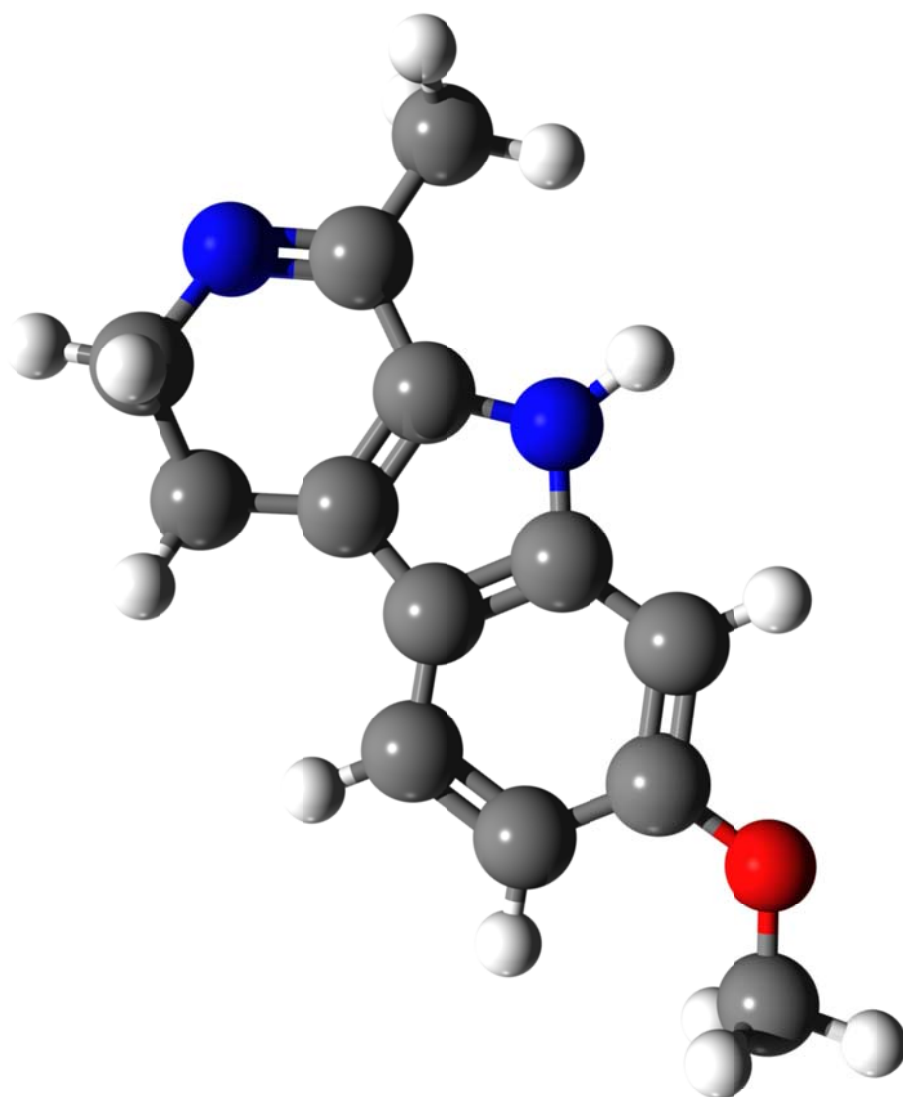
<b>Prot.</b>	Proteína
<b>PP</b>	4-Fenilpiridina
<b>PQ</b>	Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio)
<b>PTP</b>	4-Fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>REE</b>	Resonancia de Espín Electrónico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SOD</b>	Enzima superóxido dismutasa
<b>TBAB</b>	Bromuro de tetrabutilamonio
<b>TBAF</b>	Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio
<b>TBAP</b>	Fosfato de tetrabutilamonio
<b>th<math>\beta</math>c</b>	1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina
<b>th<math>\beta</math>c<sub>s</sub></b>	1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolinas
<b>tr</b>	Tiempo de retención
<b>UM</b>	Metabolizadores ultrarrápidos (citocromo P450 2D6)
<b>UV-VIS</b>	Absorción ultravioleta visible
<b>v (pmol/min pmol P450)</b>	Velocidad de reacción (picomoles por minuto y picomol de citocromo P450)
<b>V<sub>máx</sub></b>	Velocidad de reacción máxima
<b>1A1</b>	Citocromo P450 1A1 (familia 1, subfamilia A, polipéptido 1)
<b>1A2</b>	Citocromo P450 1A2 (familia 1, subfamilia A, polipéptido 2)
<b>2A6</b>	Citocromo P450 2A6 (familia 2, subfamilia A, polipéptido 6)
<b>2D6</b>	Citocromo P450 2D6 (familia 2, subfamilia D, polipéptido 6)
<b>2D6*1</b>	Citocromo P450 2D6 (familia 2, subfamilia D, polipéptido 6, alelo común 1)
<b>2D6*10</b>	Citocromo P450 2D6 (familia 2, subfamilia D, polipéptido 6, alelo "asiático" 10)
<b>2C9</b>	Citocromo P450 2C9 (familia 2, subfamilia C, polipéptido 9)
<b>2C19</b>	Citocromo P450 2C19 (familia 2, subfamilia C, polipéptido 19)
<b>2E1</b>	Citocromo P450 2E1 (familia 2, subfamilia E, polipéptido 1)
<b>3A4</b>	Citocromo P450 3A4 (familia 3, subfamilia A, polipéptido 4)
<b><math>\beta</math>c<sup>+</sup></b>	Catión $\beta$ -carbolinio
<b><math>\beta</math>c<sup>+</sup><sub>s</sub></b>	Cationes $\beta$ -carbolinio
<b><math>\beta</math>c</b>	$\beta$ -carbolina (9H-pirido-[3,4-b]indol)
<b><math>\beta</math>c<sub>s</sub></b>	$\beta$ -carbolinas
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar

# Índice

<b>1. Introducción General.</b> .....	1
1.1. Los alcaloides tetrahydro- $\beta$ -carbolina ( $th\beta c$ ) y $\beta$ -carbolina ( $\beta c$ ). .....	1
1.1.1. Las $th\beta c_s$ y $\beta c_s$ presentes en alimentos y plantas. ....	3
1.1.2. Actividad biológica y toxicológica de las $\beta$ -carbolinas. ....	10
1.2. Biotransformación metabólica. Enzimas citocromo P450.....	17
1.2.1. Isoformas del citocromo P450 y su interés farmacológico y toxicológico.....	20
1.3. Hipótesis y objetivos del trabajo.....	27
<b>2. Materiales y métodos.</b> .....	31
2.1. Biotransformación metabólica de $\beta$ -carbolinas y tetrahidropiridinas. ....	31
2.1.1. Reactivos y compuestos utilizados. ....	31
2.1.2. Enzimas citocromo P450, fracciones microsomales hepáticas y procedimientos experimentales empleados en los ensayos de biotransformación metabólica. ....	36
2.1.3. Tetrahydro- $\beta$ -carbolinas ( $th\beta c_s$ ). ....	38
2.1.4. N-Metiltetrahidropiridinas (MPTP) y N-metilfenilpiridinio (MPP <sup>+</sup> ). ....	39
2.1.5. $\beta$ -Carbolinas aromáticas ( $\beta c_s$ ) y metoxi- $\beta$ -carbolinas. ....	40
2.1.5.1. Biotransformación de las $\beta c_s$ aromáticas (norharmano y harmano). ....	40
2.1.5.2. Biotransformación de metoxi- $\beta$ -carbolinas (harmina y harmalina).....	41
2.1.6. Cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+_s$ ). ....	42
2.1.7. Análisis cromatográfico de los ensayos de biotransformación. ....	43
2.1.8. Cálculo de parámetros cinéticos $V_{max}$ y $K_m$ . ....	46
2.1.9. Reducción de los cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+_s$ ), cationes piridinio y quinonas. ....	46
2.1.9.1. Compuestos químicos y enzimas utilizados.....	46
2.1.9.2. Materiales e instrumentación. ....	47
2.1.9.3. Procedimientos experimentales. ....	47
2.2. Inhibición del citocromo P450 por $\beta$ -carbolinas y sustancias antioxidantes.....	52
2.2.1. Enzimas, reactivos y compuestos químicos utilizados.....	52
2.2.2. Ensayos de inhibición del citocromo P450.....	52
2.2.2.1. Inhibición de los citocromos P450 de la subfamilia 1A (P450 1A1 y 1A2).....	56
2.2.2.2. Inhibición del citocromo P450 2D6. ....	58
2.2.3. Análisis cromatográfico por RP-HPLC-DAD y FLD. ....	60
2.2.4. Análisis por RP-HPLC-DAD-MS.....	61
2.2.5. Cálculo de parámetros cinéticos $V_{max}$ , $K_m$ , $IC_{50}$ y $K_i$ .....	61
<b>3. Resultados.</b> .....	65
3.1. Biotransformación metabólica de $\beta$ -carbolinas y sus análogos funcionales. ....	65
3.1.1. Tetrahydro- $\beta$ -carbolinas ( $th\beta c_s$ ). ....	65
3.1.1.1. Biotransformación de $th\beta c_s$ por citocromos P450.....	66
3.1.1.2. Metabolismo de $th\beta c_s$ por microsomas hepáticos. ....	81
3.1.2. N-Metiltetrahidropiridinas (MPTP) y N-metil-4-fenilpiridinio (MPP <sup>+</sup> ). ....	89
3.1.2.1. Biotransformación del MPTP por citocromos P450.....	90
3.1.2.2. Metabolismo del MPTP por microsomas hepáticos. ....	94
3.1.2.3. Biotransformación de 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP <sup>+</sup> ) y 4-fenilpiridina (PP) por citocromos P450. ....	96

3.1.3. Las $\beta$ -carbolinas ( $\beta c_s$ ) aromáticas y las metoxi- $\beta$ -carbolinas. ....	99
3.1.3.1. Las $\beta c_s$ aromáticas. ....	99
3.1.3.1.1. Biotransformación metabólica de $\beta c_s$ aromáticas por citocromos P450. ....	99
3.1.3.1.2. Metabolismo de $\beta c_s$ aromáticas por microsomas hepáticos. ....	106
3.1.3.2. Las metoxi- $\beta c_s$ (harmina y harmalina). ....	110
3.1.3.2.1. Biotransformación de harmina por citocromos P450. ....	110
3.1.3.2.2. Metabolismo de harmina por microsomas hepáticos. ....	115
3.1.3.2.3. Biotransformación de harmalina por citocromos P450. ....	116
3.1.3.2.4. Metabolismo de harmalina por microsomas hepáticos. ....	121
3.1.4. Los cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+_s$ ). ....	125
3.1.4.1. Biotransformación de los cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+_s$ ) por citocromos P450. .	125
3.1.4.2. Metabolismo de los cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+_s$ ) por microsomas hepáticos..	132
3.1.5. Reducción de los cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+_s$ ) y piridinio. ....	137
3.1.5.1. Reducción de cationes $\beta c^+_s$ y piridinio. Voltametría cíclica y Resonancia de Espín Electrónico (REE). ....	138
3.1.5.2. Reducción de los cationes $\beta c^+_s$ , piridinio y quinonas. Estudios espectrofotométricos. ....	140
3.2. Inhibición del citocromo P450 por $\beta$ -carbolinas. ....	146
3.2.1. Inhibición de citocromos P450 de la subfamilia 1A (1A1 y 1A2) por $\beta$ -carbolinas y antioxidantes. ....	146
3.2.1.1. Biotransformación de fenacetina por el citocromo P450 1A1. Inhibición por $\beta$ -carbolinas y antioxidantes. ....	148
3.2.1.2. Biotransformación de fenacetina por el citocromo P450 1A2. Inhibición por $\beta$ -carbolinas y antioxidantes. ....	151
3.2.1.3. Biotransformación de benzo[a]pireno por citocromos P450 1A (1A1 y 1A2). Inhibición por $\beta$ -carbolinas y antioxidantes. ....	154
3.2.1.4. Biotransformación de 2-amino- $\alpha$ -carbolina por citocromos P450 1A (1A1 y 1A2). Inhibición por $\beta$ -carbolinas y antioxidantes. ....	158
3.2.2. Inhibición del citocromo P450 2D6 por $\beta$ -carbolinas. ....	163
4. <i>Discusión general.</i> ....	171
5. <i>Conclusiones.</i> ....	181
6. <i>Bibliografía.</i> ....	187
7. <i>Resumen/Summary</i> ....	207

# *Introducción*





## 1. Introducción General.

Los compuestos bioactivos de los alimentos y las plantas suscitan gran interés por sus indudables efectos en la salud humana. Entre otros, se mencionan habitualmente, las vitaminas, los polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos, los carotenoides y la fibra dietética. Esta Tesis surge del interés de nuestro laboratorio en un grupo distinto de compuestos bioactivos: los alcaloides indólicos  $\beta$ -carbolínicos. En estudios previos, el grupo de investigación ha puesto en evidencia la presencia de estos compuestos en alimentos y plantas, y ha investigado su actividad como antioxidantes e inhibidores enzimáticos. Hasta ahora, sin embargo, poco se conoce sobre su biotransformación y metabolismo. En esta memoria se aborda este aspecto y se describen los resultados obtenidos de una investigación dirigida a estudiar específicamente la biotransformación metabólica de los alcaloides indólicos  $\beta$ -carbolínicos presentes en alimentos y plantas.

### 1.1. Los alcaloides tetrahydro- $\beta$ -carbolina (th $\beta$ c) y $\beta$ -carbolina ( $\beta$ c).

Las carbolinas conforman un grupo de heterociclos indólicos isómeros clasificados como pirido[*b*]indoles, que dependiendo de la posición del átomo de nitrógeno en el anillo de piridina, se clasifican como  $\alpha$ -carbolinas,  $\beta$ -carbolinas,  $\gamma$ -carbolinas y  $\delta$ -carbolinas (véase **Figura 1.1**). Las  $\beta$ -carbolinas simples contienen un anillo tricíclico pirido[3,4-*b*]indol provisto de cierta diversidad molecular debida a los distintos sustituyentes que se incorporan en el anillo bencénico del indol y en el de la piridina. Dependiendo del grado de saturación del anillo de piridina se dan varias subclases: tetrahydro- $\beta$ -carbolinas (th $\beta$ c<sub>s</sub>), dihydro- $\beta$ -carbolinas (dh $\beta$ c<sub>s</sub>) y  $\beta$ -carbolinas aromáticas ( $\beta$ c<sub>s</sub>). En la naturaleza aparecen principalmente los derivados del tipo  $\beta$ -carbolina, si bien las  $\alpha$ -carbolinas y  $\gamma$ -carbolinas con sustituyentes amino se han identificado como mutágenos y carcinógenos en carnes y pescados cocinados. A éstas se las conoce como aminas heterocíclicas aromáticas (AHAs) y aparecen como compuestos minoritarios junto a las  $\beta$ -carbolinas<sup>1</sup>.

Los alcaloides th $\beta$ c<sub>s</sub> y  $\beta$ c<sub>s</sub> aparecen en plantas y productos naturales<sup>2</sup> y poseen amplia actividad biológica y farmacológica. Se han aislado y sintetizado moléculas de este tipo con propiedades neuroactivas, antimicrobianas, antioxidantes, citotóxicas o anticancerosas. Ejemplos de ello son la reserpina (extraída de *Rauwolfia serpentina*)<sup>3</sup> o la ajmalicina (extraído de *Catharanthus roseus*) que son antihipertensivos, la yohimbina (extraída de *Pausinystalia johimbe*)<sup>4</sup> que es un estimulante contra la disfunción sexual; la harmina, harmalina y la tetrahydroharmina (extraídos de *Peganum harmala* y *Banisteriopsis caapi*)<sup>5</sup> que son sustancias psicoactivas presentes en la *Ayahuasca* (una bebida alucinógena utilizada por las tribus del Amazonas en sus ritos ceremoniales), y las bromo- $\beta$ -carbolinas (eudistominas y eudistomidinas) extraídas de organismos marinos, que tienen propiedades anticancerosas y antivirales<sup>6 7</sup>.

## LAS CARBOLINAS

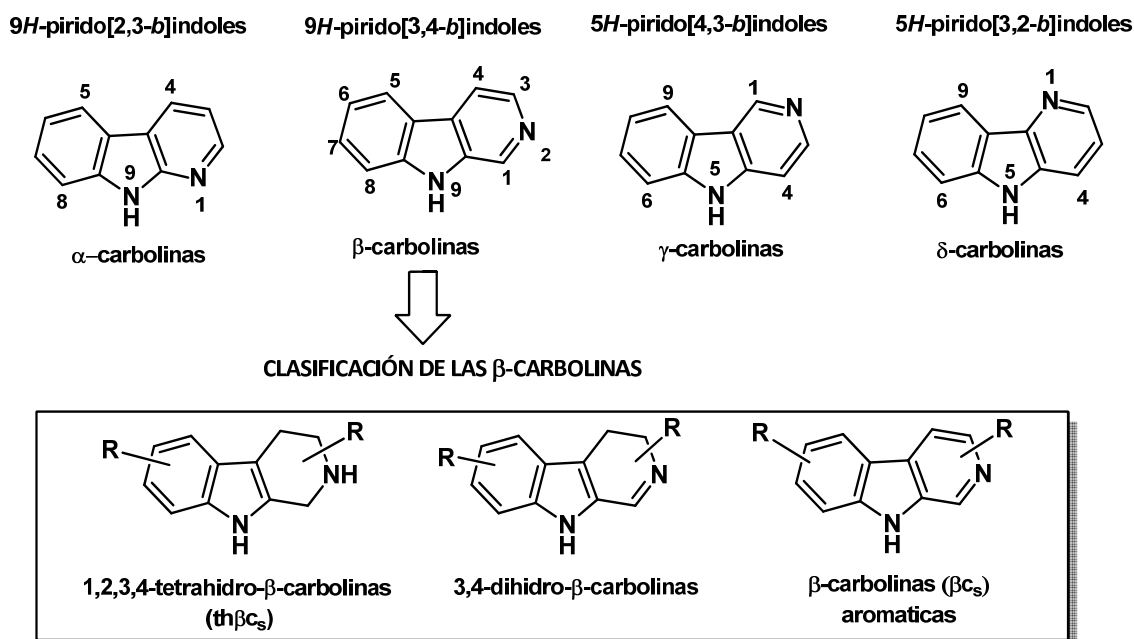


Figura 1.1 Estructura de las carbolinas (pirido[b]indoles) y subclases de  $\beta$ -carbolinas.

Se han encontrado moléculas de th $\beta$ C<sub>s</sub> y  $\beta$ C<sub>s</sub> en los fluidos y tejidos biológicos de mamíferos, incluido humanos<sup>8 9 10</sup>. Estos resultados han estimulado las especulaciones sobre el papel de estos alcaloides *in vivo*. Se cree que podrían actuar como neuromoduladores debido a sus efectos sobre la enzima monoaminoxidasa (MAO), la inhibición de la captación de neurotransmisores y por su interacción con varios receptores del sistema nervioso central como los receptores de serotonina, benzodiacepina e imidazolina<sup>11</sup>. Por otra parte, las  $\beta$ -carbolinas han atraído la atención desde un punto de vista toxicológico por ser comutágenos, afectar a la supervivencia neuronal<sup>12 13 14</sup> y dar lugar a neurotoxinas<sup>10 15</sup>.

Investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio y en otros, han revelado que estos compuestos se encuentran habitualmente en alimentos de diversa índole, origen y procesamiento<sup>16 17 18 19 20 21 22 23</sup>. Algunos de estos alcaloides, aparecen también en muestras ambientales tales como el humo del tabaco<sup>24</sup>. Las th $\beta$ C<sub>s</sub> y las  $\beta$ C<sub>s</sub> se absorben y se acumulan en los tejidos biológicos<sup>10</sup>, por lo que su procedencia exógena (xenobióticos) debida a la ingesta de alimentos y plantas puede contribuir significativamente a la presencia de estos alcaloides *in vivo* y de paso a su posible actividad biológica<sup>25</sup>.

Las  $\beta$ -carbolinas se forman mediante la denominada reacción de Pictet-Spengler que ocurre entre indoletilaminas (triptamina y/o derivados de triptófano) y compuestos carbonílicos (aldehídos o  $\alpha$ -cetoácidos)<sup>26</sup>. El mecanismo transcurre mediante la formación de un intermedio imina (base de Schiff), que tras protonarse a un catión imonio se cicla probablemente a través de especies espiroindolenina, para dar lugar a la th $\beta$ C correspondiente (véase **Figura 1.2**). Cada molécula de th $\beta$ C formada depende específicamente de los precursores implicados. Desde triptófano se forman los ácidos tetrahidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico (th $\beta$ C-3-COOH), a partir de triptamina se forman th $\beta$ C<sub>s</sub> y desde serotonina (5-hidroxitriptamina), 6-hidroxitetrahidro- $\beta$ -carbolinas (6-OH-

th $\beta$ c<sub>s</sub>). Los  $\alpha$ -cetoácidos y aldehídos distintos del formaldehído proporcionan th $\beta$ c<sub>s</sub> con un carbono quiral en C-1 (dos enantiómeros), mientras que se producen dos diastereoisómeros (*cis* y *trans*) en las th $\beta$ c-3-COOH-1,3-disustituidas (1*S*,3*S* y 1*R*,3*S*) provenientes del L-triptófano<sup>20 27</sup>. La oxidación (deshidrogenación) de th $\beta$ c<sub>s</sub> proporciona las correspondientes dh $\beta$ c<sub>s</sub> y  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas<sup>21</sup>.

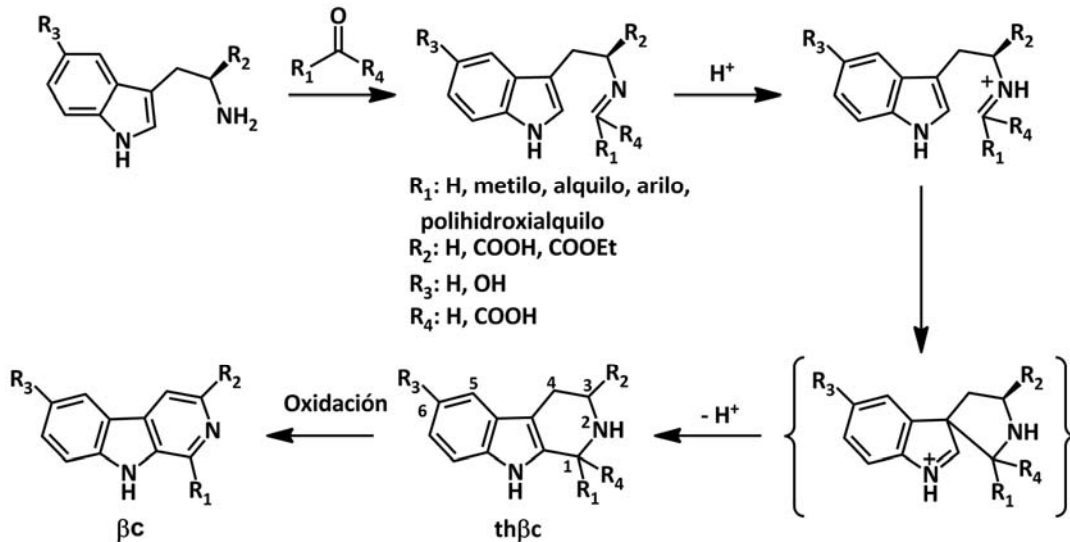


Figura 1.2 Esquema de reacción de formación de th $\beta$ c<sub>s</sub> y  $\beta$ c<sub>s</sub> (Reacción de Pictet-Spengler)<sup>25 26</sup>.

### 1.1.1. Las th $\beta$ c<sub>s</sub> y $\beta$ c<sub>s</sub> presentes en alimentos y plantas.

La reacción de ciclocondensación (representada en la Figura 1.2) entre indolalquilaminas (triptamina, triptófano y sus derivados) y compuestos carbonílicos (aldehídos y  $\alpha$ -cetoácidos) se produce con relativa facilidad en alimentos cuando coinciden los correspondientes precursores y se dan medios ligeramente ácidos<sup>19</sup>. Ambos precursores son comunes en alimentos y por tanto la reacción entre ellos es previsible. En la Tabla 1.1 se incluyen las principales th $\beta$ c<sub>s</sub> encontradas en alimentos. Se han identificado compuestos provenientes del triptófano como los ácidos tetrahydro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílicos (th $\beta$ c-3-COOH) (compuestos **1a**, **1b**, **1c**, **1e**, **1f**, **1g**, **1h**)<sup>24 18 20</sup>, el ester etílico de th $\beta$ c-3-COOH<sup>28</sup> (compuesto **1d**), compuestos poliol-th $\beta$ c<sub>s</sub><sup>29 30 31</sup> (compuesto **5a y 5b**) y th $\beta$ c<sub>s</sub> fenólicas (compuesto **6**)<sup>32</sup>; se han identificado compuestos procedentes de triptamina como las th $\beta$ c<sub>s</sub> **2a-2d** y de serotonina como las 6-hidroxi-th $\beta$ c<sub>s</sub> **3a y 3b**. La reacción de th $\beta$ c con nitrito genera *N*-nitroso-th $\beta$ c<sub>s</sub><sup>33 34</sup> (compuestos **4a y 4b**). La presencia de th $\beta$ c<sub>s</sub> en alimentos viene determinada por factores de tipo biológico, químico y tecnológico entre los que se encuentran la presencia de precursores, pH, temperatura, ahumado, tiempo de almacenamiento, utilización de oxidantes o conservantes, presencia de microorganismos en el medio y procesos de fermentación<sup>25</sup>.

La Tabla 1.2 resume los intervalos de concentración de las th $\beta$ c<sub>s</sub> descritas en alimentos. La presencia de los ácidos th $\beta$ c-3-COOHs (**1a-1c**) es frecuente en alimentos muy diversos. Por su abundancia, son las principales th $\beta$ c<sub>s</sub> y aparecen en concentraciones de varios mg/kg (mg/L) y en algunos casos como en la salsa de soja llegan a alcanzar cientos de mg/kg. La presencia de estas th $\beta$ c<sub>s</sub> se ha descrito en alimentos de origen vegetal (frutas y productos procesados de frutas como zumos,

mermeladas y purés)<sup>19 35</sup>; de origen animal (pescados, carnes cocinadas y embutidos)<sup>21</sup>; alimentos ahumados (queso, pescado, carnes)<sup>36 37</sup>; alimentos fermentados (chocolate o cacao)<sup>38</sup> y en bebidas alcohólicas, salsas y vinagres<sup>16 18 39</sup>. El éster etílico **1d** (en sus diastereoisómeros 1*S*,3*S* y 1*R*,3*S*) se ha detectado en bebidas alcohólicas fermentadas alcanzando 0.5 mg/L<sup>28</sup>. Los ácidos tetrahydro-β-carbolina-1,3-dicarboxílicos (**1e**, **1f**) se han detectado en bebidas alcohólicas y salsas<sup>40</sup>. El ácido 1-pentahidroxipentil-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolina-3-carboxílico (**5a**, **5b**) se ha encontrado en zumos y mermeladas comerciales, alcanzando hasta 6.5 μg/g<sup>29</sup>. Trazas de compuestos *N*-nitroso-thβc-3-COOHs (**4a,4b** en **Tabla 1.1**) se han detectado en alimentos tratados con nitrito<sup>33</sup>. Junto a las thβc-3-COOHs provenientes del triptófano, también aparecen moléculas de thβc<sub>s</sub> provenientes de otros precursores indólicos como la triptamina y serotonina (**compuestos 2 y 3** en la **Tabla 1.1**). En nuestro laboratorio se ha descrito la presencia de 1-metil-thβc (**2b**) y de 6-hidroxi-1-metil-thβc (**3b**) en frutas y zumos<sup>35</sup>, o en chocolate<sup>38</sup>. La presencia de una u otra thβc depende del precursor indolamina predominante. La existencia de thβc<sub>s</sub> (**2a**, **2b** en la **Tabla 1.1**) se ha descrito también en embutidos curados y ahumados<sup>36 41</sup>, al igual que en algunos vinos y salsas.

Tras analizar los intervalos de concentración de las thβc<sub>s</sub> en alimentos (**Tabla 1.2**), queda claro que estos compuestos muestran una gran variabilidad entre alimentos e incluso alta variabilidad entre diferentes muestras comerciales de un mismo alimento. Por ello, la exposición humana a las thβc<sub>s</sub> a través de la dieta es, sin duda, muy variable pero se estima que ésta puede alcanzar fácilmente varios mg/persona/día<sup>25</sup>.

Las thβc<sub>s</sub> producidas por reacción de Pictet-Spengler se pueden oxidar para dar βc<sub>s</sub> aromáticas (véase **Figura 1.2**). Un ejemplo de ello, es la formación de norharmano y harmano (**compuestos 7 y 8** en la **Tabla 1.4**) en alimentos sometidos a procesos que conllevan oxidación<sup>24</sup>. A pesar de su particular interés desde el punto de vista de su actividad, la presencia de βc<sub>s</sub> aromáticas en alimentos ha recibido poca atención, posiblemente debido a dificultades analíticas y a su baja concentración relativa (μg/L o ng/g). Un resumen de la presencia de estas sustancias en alimentos se presenta en la **Tabla 1.3**<sup>24</sup>. Se detectan concentraciones relativamente altas de βc<sub>s</sub> aromáticas en salsa de soja y otras salsas, en general. El harmano aparece en productos de fermentación como bebidas alcohólicas, vinos y vinagres. El norharmano y harmano aparecen en alimentos procesados y horneados como pan, pan tostado, cereales y galletas. Ambas βc<sub>s</sub> aparecen en carnes y pescados muy hechos (niveles hasta 160 ng/g) pero no se detectan en las mismas muestras no cocinadas<sup>24</sup>. Es destacable la abundancia de estas βc<sub>s</sub> en café hervido (café listo para tomar) con independencia de la variedad o del tipo (instantáneo, molido, descafeinado)<sup>23 42</sup>, siendo comparativamente el producto con mayor concentración relativa. La concentración en frutas y derivados como los zumos es relativamente baja; sin embargo, una excepción interesante son las uvas pasas<sup>43</sup>. Por último, cabe destacar que las βc<sub>s</sub> aromáticas aparecen en alta proporción relativa en el humo del tabaco<sup>24</sup> por lo que el tabaquismo es un importante factor de exposición a estas sustancias.

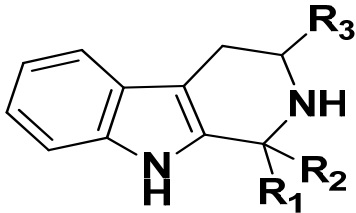
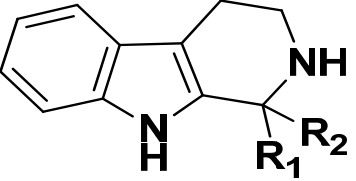
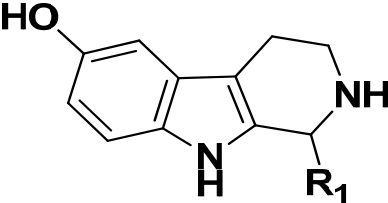
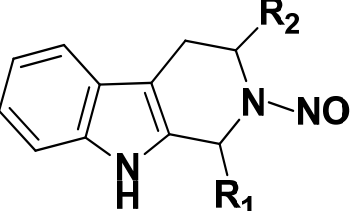
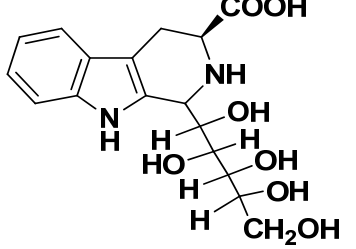
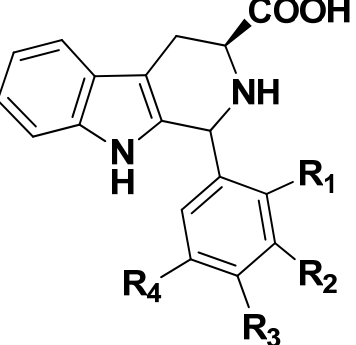
Estructura	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Compuesto
	H	H	COOH	<b>1a</b>
	CH <sub>3</sub>	H	COOH	<b>1b (1S,3S) 1c (1R,3S)</b>
	CH <sub>3</sub>	H	COOEt	<b>1d (1S,3S y 1R,3S)</b>
	COOH	H	COOH	<b>1e</b>
	COOH	CH <sub>3</sub>	COOH	<b>1f</b>
	CH <sub>2</sub> OH	H	COOH	<b>1g</b>
	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	H	COOH	<b>1h</b>
		H	H	
CH <sub>3</sub>		H		<b>2b</b>
COOH		H	-	<b>2c</b>
COOH		CH <sub>3</sub>		<b>2d</b>
	H	H		<b>3a</b>
	CH <sub>3</sub>	H	-	<b>3b</b>
	H	COOH		<b>4a</b>
	CH <sub>3</sub>	COOH	-	<b>4b</b>
	-	-	-	<b>5a (cis)</b>
				<b>5b (trans)</b>
	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> = H, OH, OCH <sub>3</sub>			<b>6</b>

Tabla 1.1 Principales thβc<sub>s</sub> identificadas en alimentos<sup>25</sup>.

Alimento	Tetrahydro- $\beta$ -carbolinas (th $\beta$ c <sub>s</sub> )												
	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g	2a	2b	3b	4a	4b	5a,b
Vino	< 0.65	0.3-13.7	< 4.0	0.003-0.53	> 0.01	> 0.01	< 0,01	0.0004-0.001	0.008-0.10	< 0.0002			
Cerveza	< 0.8	0.3-13.1	0.08-3.9	< 0.010	> 0.01	> 0.01	< 0.07	< 0.012	0.003-0.10	0.04-0.08			
Bebidas destiladas	< 0.04	< 0.8	< 0.2	< 0.028				0.009-0.012	0.0003				
Licores	< 0.23	< 5.7	< 1.6	< 0.054						< 0.002			
Bebidas refrescantes	< 0.09	< 0.35	< 0.07										
Sidra	< 0.02	0.05-0.14	0.01-0.04										
Fruta	<0.05	< 6.6	< 1.8						< 1.9	< 3.9			
Zumos de fruta	0.01-1.45	0.04-9.1	0.03-2.5						< 0.4	< 3.7			< 3.85
Mermeladas	0.06-0.42	0.1-2	0.02-0.7										< 0.37
Purés de frutas	0.03-0.11	0.03-1.18	0.01-0.36										< 6.5
Pescado (crudo)	< 2.5												
Pescado cocinado	0.03-6.4	0-0.16											
Pescado ahumando	0.03-12.2	< 0.01					< 0.04						
Carne (cruda)	< 0.01												
Carne cocinada	< 0.05	< 0.05										<0.05	
Carne ahumada	< 0.7						< 0.03						
Embutidos	< 1.8	< 2.9	< 0.6				< 0.5	< 0.8	< 9.9				
Embutidos ahumados	0.09-15.8	< 16.6	< 4				< 0.5	< 22.6	< 29		0.04-0.34		
Salsa de soja	2.1-69.6	72-360.5	20-87.6		> 10	> 10	0.2-5.1		>0.01		0.03	< 0.25	
Salsas y condimentos	0.03-3.18	0.6-24	0.15-5.6		> 10	> 10		> 0.01	>0.01				< 2.3
Vinagre	0.01-0.12	3.9-7.5	0.84-2.06		> 0.01	> 0.01							
Pan	0.12-2.51	0.03-0.32	0.01-0.21										
Harina	0.13-2.5	0.018	0.005										
Yogur	0.01-0.02	0.04-0.11	0.01-0.02										
Chocolate	0.1-0.7	0.5-2	0.2-0.9						< 0.21	0.4-4.0			
Queso	< 0.87	< 2.06	< 0.5							< 0.028			
Queso Ahumando	0.07-6.1						< 0.035						

**Tabla 1.2** Concentración (mg/L,  $\mu$ g/g) de las th $\beta$ c<sub>s</sub> en alimentos<sup>25</sup>. Compuestos como en la **Tabla 1.1**.

Muestra	Norharmano (7)		Harmano (8)	
	x	Rango	x	Rango
Zumo de fruta	0.8	n.d.-5.5	0.59	n.d.-1.8
Mermelada	0.27	n.d.-1.07	0.08	n.d.-0.41
Vino <sup>1</sup>	0.16	n.d.-0.56	1.35	n.d.-8.04
Vino blanco <sup>1</sup>	0.17	n.d.-0.34	0.97	0.16-2.26
Vino tinto <sup>1</sup>	0.16	n.d.-0.56	1.5	0.3-0.8
Vino espumoso <sup>1</sup>	n.d.	-	0.52	0.23-0.82
Vino de Jerez <sup>1</sup>	0.62	n.d.-1.4	6.6	n.d.-19
Vino de Oporto <sup>1</sup>	0.3	n.d.-0.6	12.7	2.2-39.2
Destilados <sup>1</sup>	0.73	n.d.-3.1	0.95	n.d.-5.3
Bebidas alcohólicas <sup>1</sup>	0.36	n.d.-3.1	3.4	n.d.-39.2
Vinagre <sup>1</sup>	0.88	n.d.-3.5	5.8	n.d.-14.3
Salsa de soja <sup>1</sup>	44.0	32-52	187.6	162.3-200.6
Condimentos	12.6	3.4-24.7	12.7	0.24-52.1
Harina	n.d.	-	0.2	n.d.-0.8
Pan	22.1	n.d.-65.4	0.94	n.d.-2.07
Pan tostado	91.0	41.7-164.2	n.d.	
Galletas	16.5	7.7-34	2.14	0.4-4.6
Cereales	46.5	n.d.-187.4	20.1	n.d.-91.7
Sopas de Pescado/carne	28.2	2.6-83.9	3.73	0.5-11.0
Carne (cruda)	-		-	
Carne cocinada <sup>3</sup>	0.19	n.d.-0.4	n.d.	
Carne muy hecha <sup>3</sup>	82.3	36.4-128.1	26.4	20.7-32.1
Pescado (crudo)	-		-	
Pescado cocinado <sup>3</sup>	24.7	6.4-48.11	2.02	0.7-4.3
Salchichas	2.31	n.d.-7.4	1.24	n.d.-3.7
Pescado ahumado	1.3	n.d.-4.5	0.04	n.d.-0.2
Chocolate	6.8	4.14-10.9	9.18	5.7-16.55
Frutos secos	5.2	n.d.-13.7	1.7	n.d.-6.9
Café instantáneo <sup>2</sup>	2100	1400-3500	420	270-680
Café <sup>2</sup>	1430	1000-2380	335	230-550
Café expreso <sup>1</sup>	91.4	23.6-165.9	22.38	5.06-40.86
Humo de cigarrillo <sup>4</sup>	1242.8	152-1966	500.8	55-814

**Tabla 1.3** Concentración (ng/g) de las  $\beta$ c<sub>3</sub> aromáticas harmano y norharmano encontradas en alimentos<sup>24 25</sup>.

<sup>1</sup> Expresado en  $\mu$ g/L.

<sup>2</sup> Expresado en nanogramos de  $\beta$ -carbolina en café por gramo de café usado para hacer café filtrado o café instantáneo.

<sup>3</sup> Carne cocinada (filetes de vaca o cerdo) o pescado (merluza, salmón, pez espada) cocinado al punto o muy hecho.

<sup>4</sup> Expresado como nanogramos de  $\beta$ -carbolina por cigarrillo obtenido en corriente de humo burbujeado en una solución de ácido/metanol.

n.d.: menor del límite de detección (0.03 ng/g).

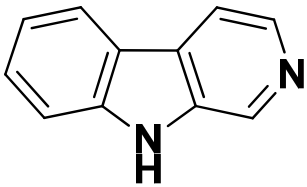
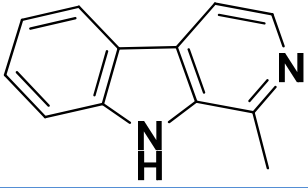
compuesto	Estructura	Nombre
7		Norharmano ( $\beta$ -carbolina) (9H-pirido[3,4-b]indol)
8		Harmano (1-metil- $\beta$ -carbolina) (1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol)

Tabla 1.4. Principales  $\beta_c$  aromáticas identificadas en alimentos<sup>25</sup>

Partes de la planta	harmalol	harmol	harmalina	harmina	tetrahydroharmina
Semilla	6.03 $\pm$ 0.39	0.03 $\pm$ 0.007	56.0 $\pm$ 2.28	43.2 $\pm$ 2.0	1.1 $\pm$ 0.2
Fruto verde	4.17 $\pm$ 1.14	-	4.55 $\pm$ 0.02	6.14 $\pm$ 1.2	-
Cáscaras	-	-	0.54 $\pm$ 0.09	0.77 $\pm$ 0.1	-
Tallo	0.09 $\pm$ 0.09	0.10 $\pm$ 0.09	-	2.02 $\pm$ 0.32	-
Hojas	-	-	-	1.04 $\pm$ 0.06	-
Flores	-	-	-	-	-
Raíces	2.03 $\pm$ 0.43	14.1 $\pm$ 2.2	-	20,68 $\pm$ 2.5	-

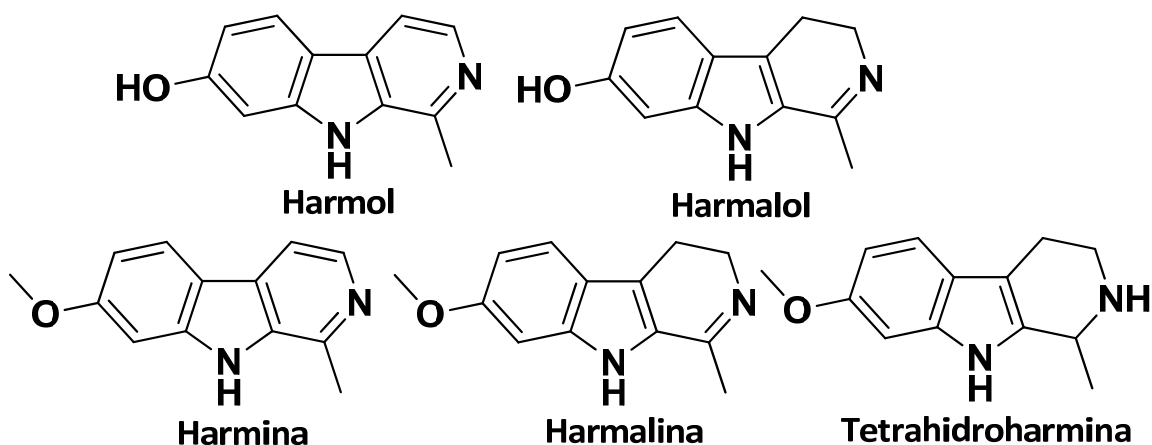


Tabla 1.5 Concentración y estructura de  $\beta_c$  (mg/g  $\pm$  SEM) determinadas en *Peganum harmala*<sup>44</sup>

Aunque la concentración de las  $\beta_c$  aromáticas en alimentos es relativamente baja y generalmente inferior a la de las  $th\beta_c$ , la ingesta habitual de alimentos que contienen estos compuestos y la exposición continuada a contaminantes ambientales (tabaquismo) suponen un aumento sustancial de la exposición humana a estas sustancias. El café hervido, alimentos muy cocinados y procesados, salsas (como salsa de soja), vinagres, bebidas alcohólicas fermentadas, frutas secas (uvas pasas) y el humo del tabaco, constituyen las principales fuentes exógenas de  $\beta_c$  aromáticas. Se ha estimado que la ingesta puede llegar a ser de cientos o miles de  $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$ <sup>24</sup>.

Antes que en alimentos, los alcaloides del tipo  $\beta$ -carbolina se han descrito y estudiado tradicionalmente en distintas especies de plantas<sup>2</sup>. En éstas, abundan los compuestos con sustitución aromática en el C-7 (metoxilo e hidroxilo) frente a los sustituidos en C-6, detectados en alimentos. Dos especies han recibido particular atención: *Peganum harmala* y *Banisteriopsis caapi*. La planta *P. harmala* es típica de la zona mediterránea, medio Oriente y Asia, y se usa como especia, condimento, o remedio medicinal contra diversos problemas de salud como catarros, asma, artritis reumatoide, dolor o fiebre, entre otras. Sus semillas mezcladas con incienso se queman para conseguir un aromatizante en algunos ritos religiosos en Asia. Por su parte, la liana sudamericana *B. caapi* es común en la selva amazónica y se utiliza para la preparación de la *Ayahuasca*, una bebida con propiedades alucinógenas ingerida por las tribus indígenas en rituales. En ambas plantas se han aislado e identificado las  $\beta$ -carbolinas harmina (7-metoxi- $\beta$ -carbolina), harmalina (7-metoxi-3,4-dihidro- $\beta$ -carbolina), harmalol (7-hidroxi-3,4-dihidro- $\beta$ -carbolina), harmol (7-hidroxi- $\beta$ -carbolina) y tetrahydroharmina (7-metoxitetrahydro- $\beta$ -carbolina)<sup>44 45</sup> (véase **Tabla 1.5**). Estos alcaloides presentan una variada farmacología y se estudian con distintos propósitos como por ejemplo por sus propiedades antitumorales y vasorrelajantes. Actualmente también se usan como drogas recreativas debido a sus propiedades psicoactivas y esto ha producido casos graves de toxicidad en humanos, incluyendo parálisis, euforia, hipotermia, alucinaciones, problemas digestivos y bradicardia<sup>46</sup>. En la **Tabla 1.5** se recogen las concentraciones de los alcaloides encontradas en distintas partes de la planta *Peganum harmala* recolectada en la provincia de Toledo (España)<sup>44</sup>. La harmalina y la harmina aparecen en las semillas y raíces y alcanzan hasta el 10% en peso. Tanto los compuestos aislados como los extractos crudos de la planta son potentes inhibidores de la enzima monoaminoxidasa A (MAO-A) lo que podría explicar su bioactividad, incluido efectos antidepresivos, y contribuir a su toxicidad<sup>25 44 46</sup>.

### 1.1.2. Actividad biológica y toxicológica de las $\beta$ -carbolinas.

En muestras biológicas de animales y de humanos se han encontrado diversas moléculas de  $\beta$ -carbolina (**Tabla 1.6**). Su procedencia en éstas podría deberse tanto a la ingesta de estos compuestos como xenobióticos como a su propia formación endógena. Tras su administración en animales, estos compuestos se absorben y se acumulan en distintos órganos, incluido el cerebro<sup>10 47 48 49 50 51 52 53</sup>. Poseen un amplio espectro de actividades biológicas entre las que se incluyen propiedades neuroactivas, antitrombóticas, antimicrobianas, antiparasitarias, antivirales y antitumorales<sup>54 55 56 57 58 59 60</sup>. Su farmacología es variada y actúan a varios niveles, siendo una diana importante el sistema nervioso central (SNC) ya que atraviesan la barrera hematoencefálica<sup>47</sup> y son neuromoduladores<sup>49 57</sup>. Algunas  $\beta$ -carbolinas como norharmano, harmano, harmina y harmalina, poseen propiedades psicoactivas y son potenciadores de la acción de indoles psicoactivos como la *N,N*-dimetiltryptamina<sup>61</sup>. Son inhibidores de la enzima monoaminoxidasa (MAO)<sup>62</sup> y de las enzimas kinasas<sup>63 64</sup>, inhiben la captación de serotonina y se unen a los receptores de serotonina<sup>65</sup>, benzodicepina-GABA e imidazolina<sup>8 9 49 57</sup>. Por otro lado, se las ha relacionado con el alcoholismo<sup>66</sup> y se evalúan como agentes atenuantes de drogodependencias<sup>67</sup>. Modifican los parámetros cardiovasculares en animales, ejerciendo efectos hipotensores<sup>68</sup>; alteran la temperatura corporal<sup>69</sup>, modulan la ingesta de alimentos<sup>57</sup> e inducen la secreción de insulina<sup>70</sup>. Las  $\beta$ -carbolinas aromáticas producen efectos ansiolíticos y antidepresivos<sup>71 72</sup>. Estas acciones se relacionan con la inhibición de la enzima MAO<sup>62 73 74</sup> y con la interacción con receptores de imidazolina. De hecho, estas sustancias modulan los niveles de monoaminas *in vivo*<sup>69 75</sup> e inducen un aumento de los niveles extracelulares de los neurotransmisores dopamina y serotonina. La enzima MAO se encarga del metabolismo y regulación de los niveles de neurotransmisores y monoaminas *in vivo* y está relacionada con patologías tales como adicción, depresión y la enfermedad de Parkinson (PD)<sup>76 77 78</sup>. En nuestro laboratorio, se ha estudiado la actividad de las  $\text{th}\beta\text{c}_5$  y  $\beta\text{c}_5$  aisladas de alimentos, humo del tabaco y plantas medicinales sobre esta enzima, demostrándose que varios de estos compuestos son potentes inhibidores<sup>79 80</sup>. Así, las  $\beta\text{c}_5$  aromáticas son inhibidores reversibles de la isoenzimas, MAO-A (harmano, norharmano, harmalina, harmina) y MAO-B (norharmano)<sup>74</sup>. Las  $\text{th}\beta\text{c}_5$  son inhibidores de la MAO-A aunque más débiles que las  $\beta\text{c}_5$  aromáticas<sup>79</sup>.

Las  $\text{th}\beta\text{c}_5$  presentes en alimentos y muestras biológicas son sustancias antioxidantes y secuestradores de radicales libres<sup>35 81 82</sup> e inhiben la agregación de plaquetas<sup>83</sup>. Por otro lado, algunas  $\beta$ -carbolinas son potentes neuroprotectores<sup>84 85</sup> y son secuestradores de radicales hidroxilo<sup>86</sup>. La capacidad antioxidante de las  $\text{th}\beta\text{c}_5$  contra el radical ABTS<sup>+</sup> (ensayo de capacidad antioxidante total) es mayor que la del ácido ascórbico y trolox (una forma soluble en agua de la vitamina E). Las  $\text{th}\beta\text{c}_5$  contienen un anillo indólico que da lugar a un catión radical indolilo o un radical neutro a través de la transferencia de electrones posibilitando su acción como secuestradores de radicales. Los radicales indolilo evolucionan y son oxidados a  $\beta\text{c}_5$  aromáticas<sup>81 87</sup>. La actividad antioxidante de las  $\text{th}\beta\text{c}_5$  es similar a la actividad antioxidante de la melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina)<sup>88 89</sup>, un indol ampliamente caracterizado como un potente antioxidante<sup>90 87</sup> y que ha demostrado ser eficaz en distintas patologías. Por otro lado, algunas  $\text{th}\beta\text{c}_5$  como las  $\text{th}\beta\text{c}_5$  fenólicas producidas a partir de los aldehídos fenólicos (**compuesto 6 en Tabla 1.1**) se han propuesto como un nuevo tipo prometedor de antioxidantes duales: fenólicos e indólicos<sup>32 91</sup>.

Las  $\beta$ -carbolinas pueden ejercer efectos tóxicos. Las  $\text{th}\beta\text{c}_s$  reaccionan con el nitrito presente en alimentos o en el propio organismo (cavidad bucal o estómago) y pueden formar  $N$ -nitroso- $\text{th}\beta\text{c}_s$  y otros compuestos mutagénicos<sup>92 93 94 95 34</sup>. En presencia de aminas aromáticas, tales como anilina o toluidina, las  $\beta\text{c}_s$  aromáticas son comutagénos<sup>96 97 98 12</sup>. Esta acción tóxica se relaciona con su interacción e intercalación en el ADN, su acción como fotosensibilizadores<sup>98 99 100</sup> o su actividad como inhibidores de la topoisomerasa I<sup>101</sup> y está influida por la interacción de estos compuestos con el sistema de enzimas del citocromo P450<sup>96</sup>.

Se les ha prestado mucha atención como posibles neurotoxinas<sup>52 102 103</sup>. Las  $\text{th}\beta\text{c}_s$  y  $\beta\text{c}_s$ , endógenas o de naturaleza xenobiótica, se activan *in vivo*, particularmente en el SNC, formando cationes  $N$ -metil- $\beta$ -carbolinio ( $\beta\text{c}_s^+$ ), que son sustancias tóxicas inhibitoras de la cadena respiratoria celular (véase **Figura 1.3**)<sup>104 105</sup>. En base a esto, algunos autores consideran que las  $\beta$ -carbolinas podrían ser posibles protoxinas relacionadas con las enfermedades neurodegenerativas<sup>106</sup>. La bioactivación de  $\text{th}\beta\text{c}_s$  y  $\beta\text{c}_s$  ocurre con la participación de enzimas  $N$ -metiltransferasas que catalizan la  $N$ -metilación de los heteroátomos de nitrógeno en posición 2 y 9<sup>107</sup> con la ayuda del cofactor S-adenosil metionina (**Figura 1.4**). Recientemente se ha descrito otra ruta alternativa de bioactivación catalizada por hemoperoxidasas que oxidan  $\text{th}\beta\text{c}_s$  a cationes  $\beta\text{c}_s^+$ <sup>108 109</sup>.

Las  $\text{th}\beta\text{c}_s$  y los cationes  $\beta\text{c}_s^+$  se consideran análogos con un puente de nitrógeno adicional, respectivamente, de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y del catión  $\text{MPP}^+$  (1-metil-4-fenilpiridinio), que son potentes neurotoxinas (**Figura 1.3**). A finales de 1970, se diagnosticó la enfermedad de Parkinson en consumidores de meperidina (una droga de síntesis con efectos similares a la heroína) que contenía 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) como contaminante<sup>110</sup>. Más tarde, se demostró que el MPTP destruye las células dopaminérgicas de la sustancia negra (productoras de dopamina), y que es el causante de parkinsonismo irreversible en seres humanos, primates no humanos y roedores. El MPTP cruza la barrera hematoencefálica y se metaboliza por la enzima MAO-B, que cataliza su conversión en catión 1-metil-2,3-dihidro-4-fenilpiridinio ( $\text{MPDP}^+$ )<sup>111</sup>. El  $\text{MPDP}^+$  se oxida para dar lugar a 1-metil-4-fenilpiridinio ( $\text{MPP}^+$ ) que se capta selectivamente por las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT). Dentro de las células dopaminérgicas, el  $\text{MPP}^+$  se concentra en la matriz mitocondrial inhibiendo la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo I, produciendo el cese de la fosforilación oxidativa, agotamiento del ATP, aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), disfunción mitocondrial y la muerte neuronal por apoptosis<sup>112</sup>.

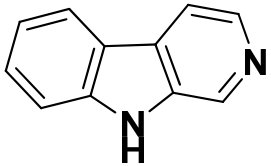
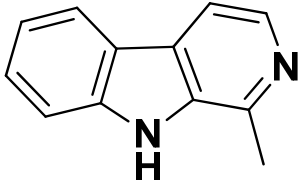
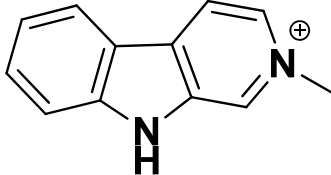
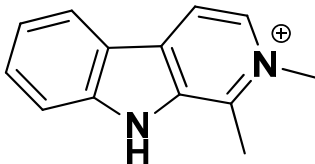
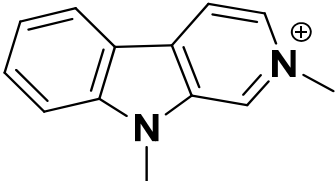
Tras el descubrimiento del MPTP, se ha considerado la posibilidad de que la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas puedan iniciarse en sujetos predispuestos genéticamente por la acción de toxinas medioambientales o endógenas. De hecho, sustancias químicas tales como la rotenona, 6-hidroxi-dopamina, y varios pesticidas (paraquat, diquat) generan parkinsonismo en animales de laboratorio<sup>113 114</sup>. En el mismo sentido, algunas  $\beta\text{c}_s$  podrían llegar a ser neurotoxinas con propiedades análogas al MPTP/ $\text{MPP}^+$ <sup>115</sup> (**Figura 1.3**). Así, el  $\text{MPP}^+$  y los cationes  $\beta\text{c}_s^+$  tienen varias propiedades funcionales y toxicológicas similares. Ambos son ligandos del transportador de dopamina DAT, inhiben la captación de dopamina<sup>116</sup>, inhiben la respiración mitocondrial a nivel del complejo I<sup>117</sup>, producen aumento de ROS, son tóxicos en cultivos de células

neuronales al inducir apoptosis<sup>106</sup> y producen neurotoxicidad en ratones y ratas generando bradiquinesia, reducción del contenido de dopamina en el cuerpo estriado y en el cerebro medio, y disminución de la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa<sup>102 118</sup>.

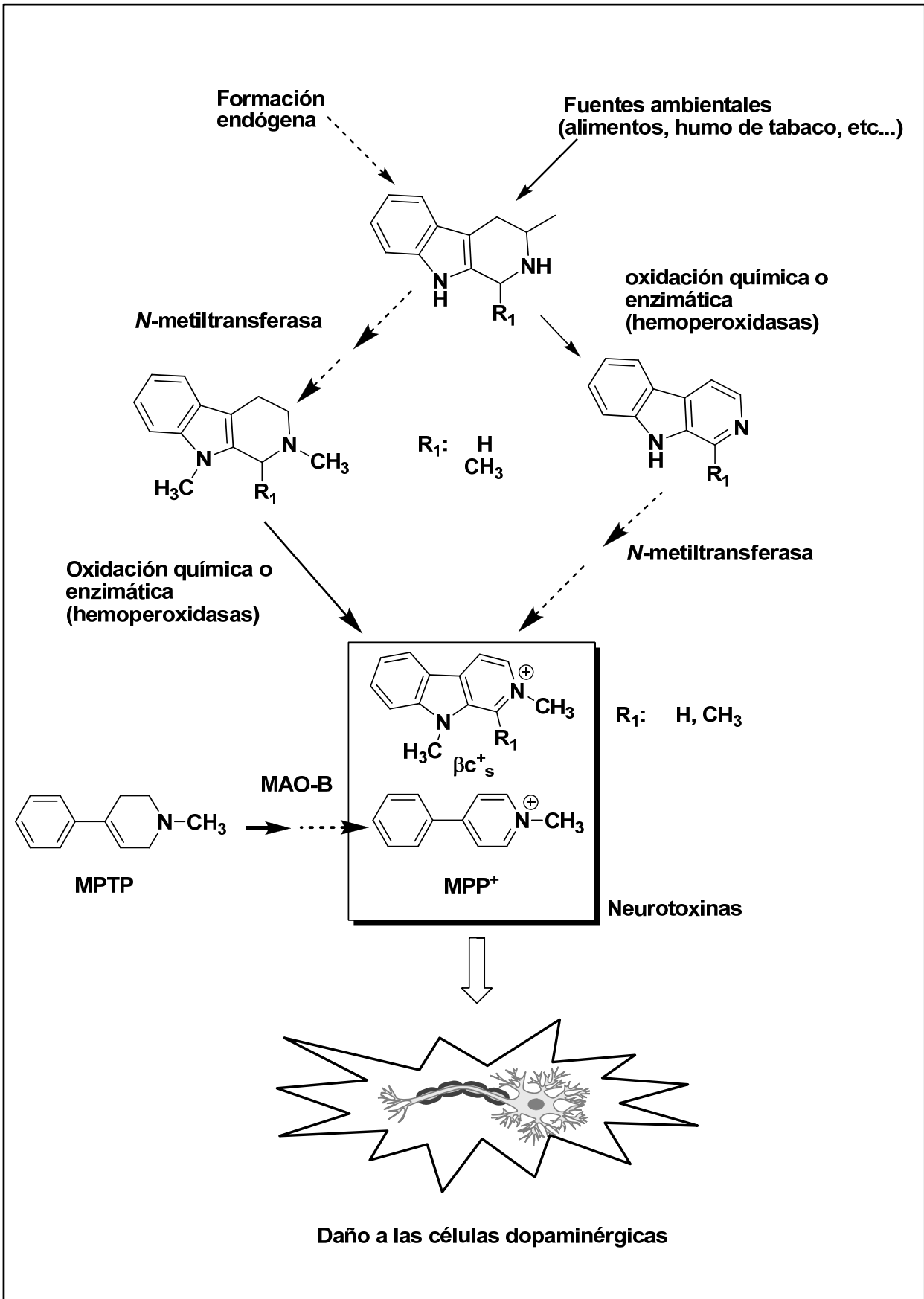
Al contrario que el MPTP, los alcaloides del tipo  $\beta$ -carbolina sí se encuentran en la naturaleza (alimentos, plantas, tabaco) y se han detectado en el cerebro humano<sup>104</sup>. Por esta razón, se ha sugerido la posibilidad de que aun siendo menos tóxicas y selectivas que el MPTP, las  $\beta$ -carbolicas puedan llegar a producir neurotoxicidad a largo plazo en sujetos predispuestos genéticamente. Resultados recientes indican que los cationes cuaternarios  $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+_s$ ) con dos metilos en los nitrógenos de la  $\beta$ -carbolina (2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+_s$ ) son potentes neurotoxinas<sup>104 119</sup> (**Figura 1.4**). El catión 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+_s$  es un potente inhibidor mitocondrial y sus efectos neurotóxicos se asemejan a los producidos por el MPP<sup>+</sup> aunque con menor selectividad por las células dopaminérgicas<sup>15</sup>. Es interesante señalar que los compuestos catiónicos  $\beta c^+_s$  se han encontrado en cerebro humano post-mortem (**Tabla 1.6**) y sus niveles en los enfermos de Parkinson fueron superiores a la media<sup>102 120 121</sup>.

En suma, los efectos biológicos y toxicológicos de las th $\beta c_s$  y las  $\beta c_s$  dependen en primer lugar de la actividad específica de cada una de estas sustancias, pero también de su absorción, metabolismo y biotransformación<sup>97 122</sup>. Se han descrito enzimas como el citocromo P450 2D6 y varias hemoperoxidasas que participan en el metabolismo y biotransformación del MPTP y de las *N*-metil-th $\beta c_s$ <sup>108 109 123</sup>. De hecho, la posible implicación de estas sustancias en neurotoxicidad y su relación con el polimorfismo genético y la inducción de los citocromos P-450 son temas de creciente interés científico<sup>104 123 124 125</sup>.

$\beta$ -carbolinas	Nombre	Muestra biológica
	<b>thβc</b> 1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolina	Orina y plasma humano, plaquetas y cerebro de rata
	<b>1-CH<sub>3</sub>-thβc</b> 1-metil-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolina	Orina, plasma y plaquetas humanos, cerebro de rata
	<b>2-CH<sub>3</sub>-thβc</b> 2-metil-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolina	Cerebro de rata
	<b>6-OH-thβc</b> 6-hidroxi-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolina	Orina humana, cerebro de rata y plaquetas
	<b>6-OH-1-CH<sub>3</sub>-thβc</b> 6-hidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolina	Orina humana, cerebro rata
	<b>6-OCH<sub>3</sub>-thβc (pinolina)</b> 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolina	Glándula pineal y retina. Cerebro de rata, y glándula adrenal
	<b>MTCA</b> ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolina-3-carboxílico	Orina humana y cristalino, cerebro de rata
	<b>THCA</b> ácido 1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolina-3-carboxílico	Orina humana

$\beta$ -carbolinas	Nombre	Muestra biológica
	<b>norharmano</b> $\beta$ -carbolina	Orina, plasma, y cerebro humano y de rata. Hígado, riñón, bazo, corazón y pulmón de rata
	<b>harmano</b> 1-metil- $\beta$ -carbolina	Orina, plasma, plaquetas y cerebro, humano y cerebro de rata
	<b>2-CH<sub>3</sub>-<math>\beta</math>c<sup>+</sup></b> catión 2-metil- $\beta$ -carbolinio	Cerebro humano post-mortem y fluido cerebroespinal
	<b>1,2-di-CH<sub>3</sub>-<math>\beta</math>c<sup>+</sup></b> catión 1,2-dimetil- $\beta$ -carbolinio	Cerebro humano post-mortem y fluido cerebroespinal
	<b>2,9-di-CH<sub>3</sub>-<math>\beta</math>c<sup>+</sup></b> catión 2,9-dimetil- $\beta$ -carbolinio	Cerebro humano post-mortem y fluido cerebroespinal

**Tabla 1.6** Alcaloides th $\beta$ c y  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas detectados en muestras biológicas<sup>8 9 48 57 72 73 104 122 123 123 126</sup>.



**Figura 1.3** Esquema de formación de los cationes β-carbolino (βc<sup>+</sup>) y su similitud con las neurotoxinas 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>) y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)<sup>25 104 108 127</sup>.

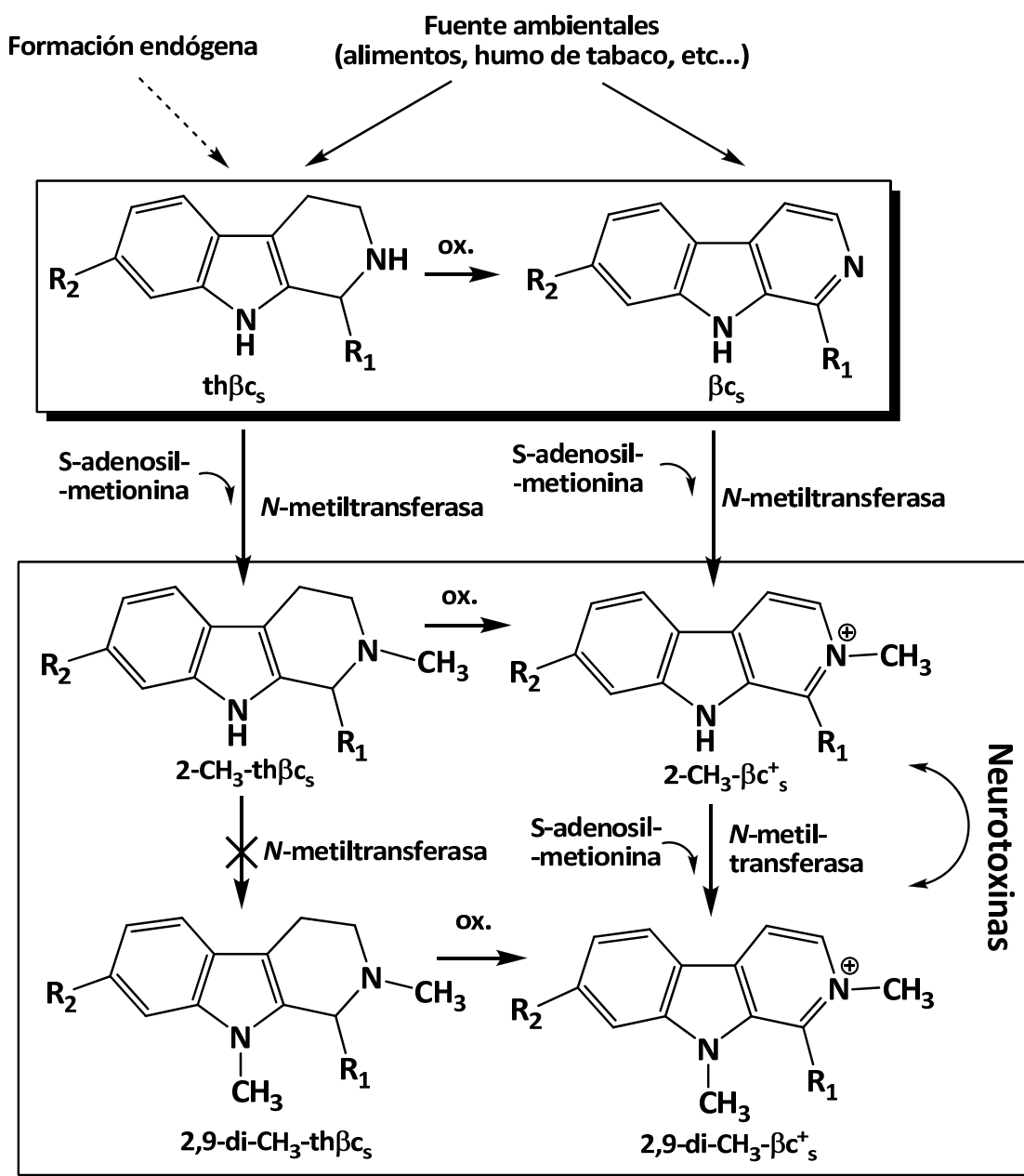


Figura 1.4 Esquema propuesto de la formación de thβc<sub>5</sub> metiladas en posición C-2 y C-9 que pueden convertirse en neurotoxinas <sup>104 105 109 128</sup>.

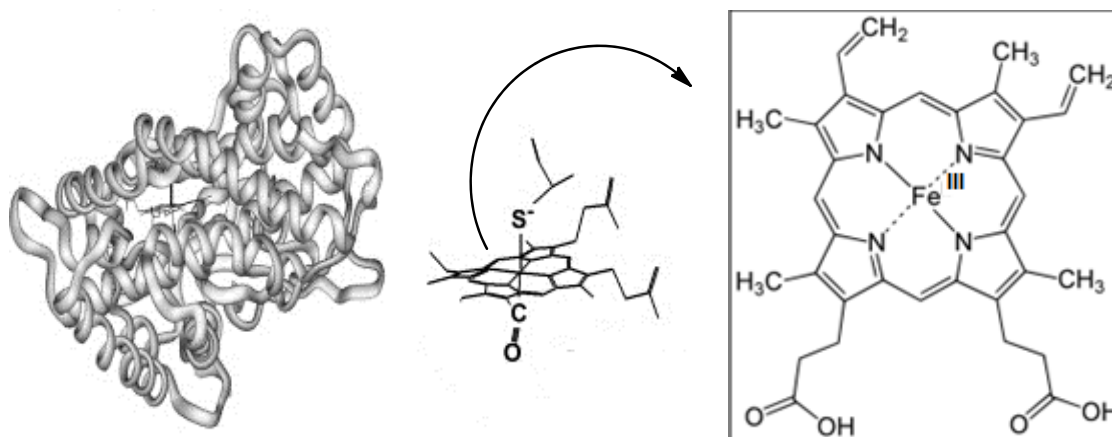
## 1.2. Biotransformación metabólica. Enzimas citocromo P450.

El conjunto de procesos enzimáticos a los que se ven sometidos los xenobióticos en el organismo humano se conocen como reacciones de biotransformación o de metabolización. La biotransformación metabólica de xenobióticos se clasifica en reacciones de funcionalización (enzimas de Fase I) y reacciones de conjugación (enzimas de Fase II). Las reacciones enzimáticas de Fase I son reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis que aumentan la polaridad de la molécula al introducir nuevos grupos funcionales propicios para la actuación de las enzimas transferasas de Fase II que catalizan la conjugación con los ácidos glucurónico, acético o sulfúrico y facilitan la excreción del xenobiótico<sup>129</sup>.

El sistema enzimático más importante del metabolismo de Fase I es el sistema de monooxigenasas del citocromo P450<sup>129</sup>. Son un conjunto de hemoproteínas<sup>130 131</sup> (contienen el grupo prostético hemo) que se ocupan del metabolismo de compuestos exógenos lipófilos como fármacos, drogas y carcinógenos químicos, y de distintos compuestos endógenos como esteroides, vitaminas lipófilas y ácidos grasos. El citocromo P450 interviene en la detoxificación de xenobióticos pero también en su activación a nuevas especies activas o reactivas (carcinógenos). La regulación, expresión y actividad de estas enzimas depende de numerosas variables y viene determinada por diversos polimorfismos genéticos.

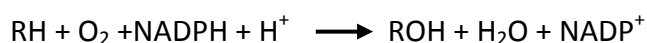
La superfamilia citocromo P450 se divide en familias y subfamilias que se basan en la homología de la secuencia de aminoácidos. Las proteínas con más de un 40 % de homología se incluyen en diferentes familias designadas por números (1, 2, 3... 11). Las proteínas con más de un 55% de homología se agrupan en subfamilias, que se designan por letras mayúsculas (A, B, C...)<sup>132</sup>. Cada subfamilia citocromo P450 comprende uno o más genes o polipéptidos individuales que difieren en más de un 3 % en la secuencia y que se designan por un nuevo número arábico (1, 2, 3) añadido a continuación). Así por ejemplo, el citocromo P450 2D6 (pertenece a la familia 2, a la subfamilia D, al gen individual o polipéptido 6). En humanos hay descritos 18 familias y 26 subfamilias de citocromos P450. Cada polipéptido individual puede presentar variantes alélicas en las que varían un número muy reducido de aminoácidos, y que se indican por un asterisco y un número (ejemplo P450 2D6\*1).

Los citocromos P450 tienen un peso molecular que oscila entre 50 y 60 KDa y en su estructura tridimensional hay regiones flexibles y dinámicas que permiten al centro activo adaptarse a la unión de sustratos de distinto tamaño, forma y polaridad. La proteína contiene una combinación de regiones de  $\alpha$ -hélice y láminas  $\beta$  en la región que rodea al grupo prostético hemo. La enzima permanece anclada a la membrana endoplasmática a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo *N*-terminal situándose la mayor parte de la proteína en la cara citosólica de la membrana<sup>133</sup>. La zona proteica más conservada se encuentra cercana al grupo hemo, reflejando una característica común de los citocromos P450 como es la transferencia de electrones y protones y la activación del oxígeno. El *loop* que fija al grupo prostético hemo contiene la secuencia de aminoácidos (Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-Gly-X-X-X)<sup>132</sup>. El aminoácido cisteína interacciona con el hierro del hemo, que a su vez está unido a los cuatro nitrógenos de la protoporfirina IX mientras que la sexta coordinación queda para la unión al O<sub>2</sub>, CO o H<sub>2</sub>O (véase **Figura 1.5**).



**Figura 1.5** Esquema en 3D del citocromo P450 y de la estructura planar de su centro activo del citocromo P450, donde se puede ver la unión del átomo de hierro (III) al anillo de protoporfirina IX y al SH de la cisteína de la cadena polipeptídica (Cys).

Por tanto, los citocromos P450 son hemoproteínas catalíticas en las que el átomo de hierro del hemo está coordinado al grupo SH de una cisteína próxima de la cadena polipeptídica (véase **Figura 1.5**). Esta característica es la responsable de la banda Soret (absorción a 450 nm) del complejo Fe(II)-CO típica de estas enzimas. Estas enzimas se consideran monooxigenasas de función mixta al oxidar sustratos con oxígeno molecular en el que un átomo de oxígeno se reduce a agua y el otro se incorpora al sustrato en un proceso en el que los electrones necesarios los aporta el cofactor NADPH.



Los pasos del ciclo catalítico<sup>131</sup> (véase **Figura 1.6**) se puede resumir en:

- ① **Unión del sustrato a la enzima en su estado férrico**; como consecuencia de ello se origina un complejo enzima sustrato y cambios en el estado de *spin*, en el potencial redox y en el máximo de absorbancia de la hemoproteína.
- ② **Reducción del complejo** hemoproteína-sustrato **al estado ferroso** (el Fe<sup>3+</sup> del grupo hemo se reduce a Fe<sup>2+</sup>) gracias al aporte de un electrón desde el NADPH a través de una proteína, la citocromo P450 reductasa.
- ③ **Unión del oxígeno molecular** al complejo hemoproteína-sustrato (el Fe<sup>2+</sup> del grupo hemo se oxida de nuevo a Fe<sup>3+</sup>) y forma un complejo de coordinación con el radical superóxido formado.
- ④ **Aporte de un segundo electrón** con la formación de una especie radical activada de oxígeno (anión peroxiférrico).
- ⑤ **Formación de la especie ferril oxidante**. El complejo hidroperóxido férrico sufre una ruptura heterolítica para dar una molécula de agua y la formación de una especie ferril oxidante (porfirina-Fe=O) que es la responsable de las oxidaciones catalizadas por el citocromo P450 al coger un electrón o un átomo de hidrógeno del sustrato.
- ⑥ **Liberación del sustrato oxidado (ej. sustrato hidroxilado)** y reducción del átomo de oxígeno coordinado al centro catalítico de la enzima, dando como resultado una

molécula de agua coordinada al centro catalítico que también aumenta su estado de oxidación a  $\text{Fe}^{3+}$  de nuevo.

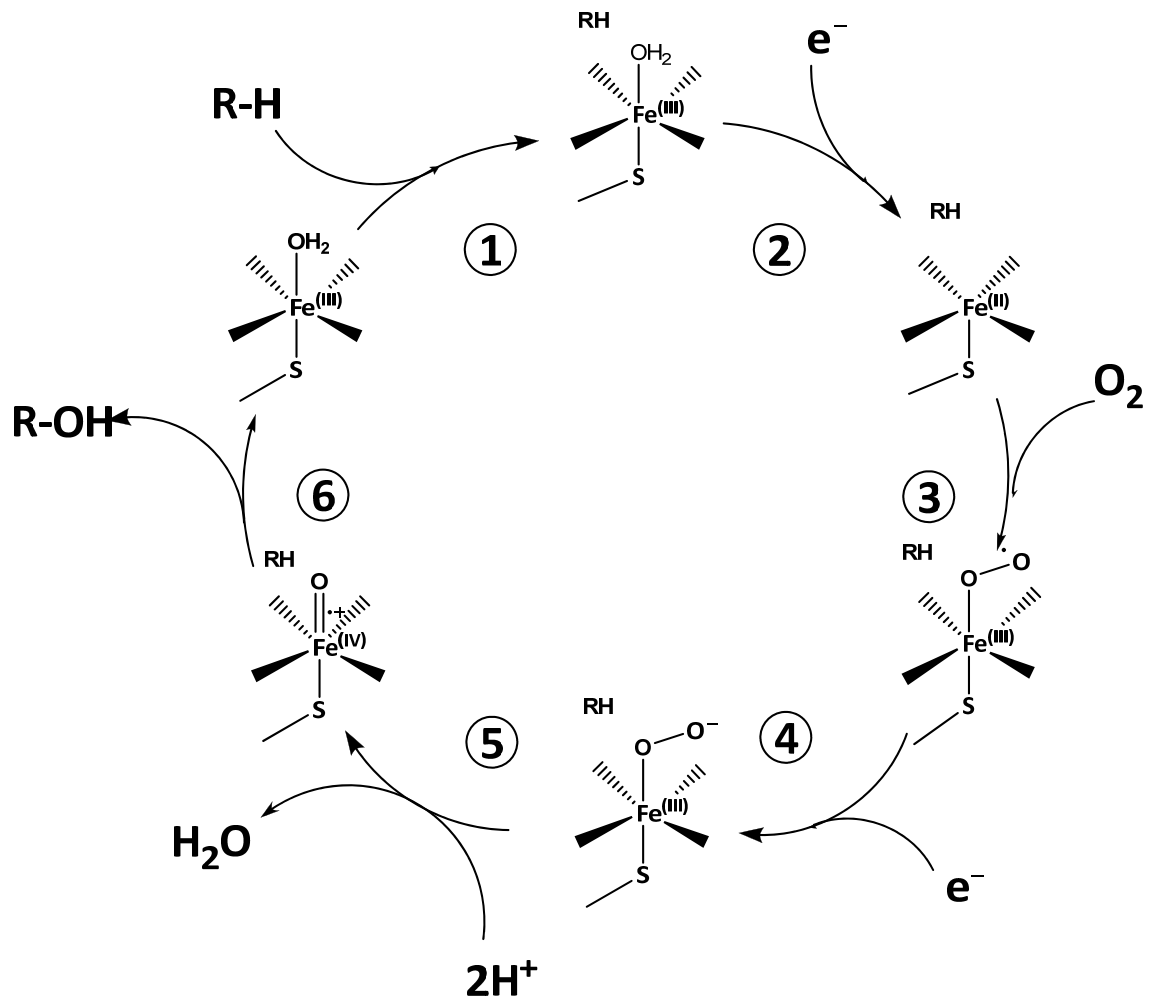
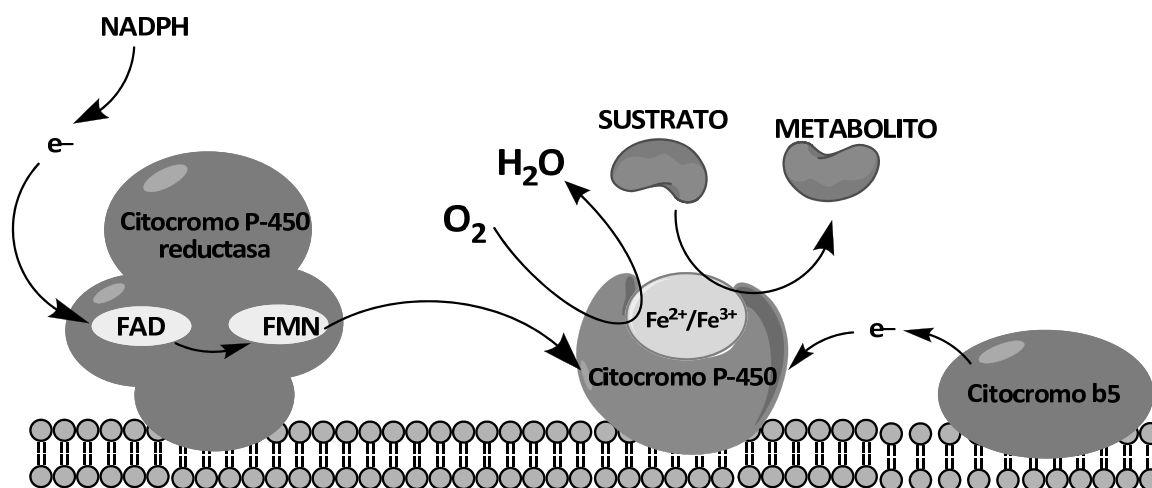


Figura 1.6 Ciclo catalítico del citocromo P450<sup>131</sup>.

La reacción catalítica requiere un dador de electrones (compañero redox) que transfiera electrones al citocromo P450 para llevar a cabo la activación del oxígeno molecular (véase **Figura 1.6**)<sup>134</sup>. Este proceso se lleva a cabo mediante la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa. Esta enzima es una flavoproteína que contiene FAD (flavina adenina dinucleotido) y FMN (flavina mononucleótido) y transfiere dos electrones en pasos sucesivos desde el cofactor NADPH al átomo de hierro de la protoporfirina IX (**Figura 1.7**). Esta reductasa puede actuar al margen de los citocromos P450 y reducir otras proteínas y sustratos. Por ejemplo, participa en la reducción de quinonas y del paraquat y en la consiguiente formación del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) responsable de la toxicidad de estas sustancias<sup>129</sup>.



**Figura 1.7** Cadena de donación de electrones necesaria para se produzca el ciclo catalítico representado en la figura anterior. El donador de electrones es el NADPH mediante la enzima citocromo P450 reductasa que contiene FMN (flavina mononucleótido) y FAD (flavina adenina dinucleótido) o el citocromo b5. La membrana es el retículo endoplasmático.

Los citocromos P450 tienen una gran versatilidad funcional que se refleja tanto en la variedad de procesos que catalizan como en el número y diversidad de sustratos que utilizan. Existen numerosas isoformas (**Tabla 1.7**) que se han adaptado al metabolismo de grupos de compuestos relacionados<sup>135</sup>. Esta versatilidad se traduce en un elevado número de reacciones catalizadas<sup>136</sup>, entre las que se encuentran: hidroxilación de carbonos alifáticos y aromáticos, epoxidación, oxidación de heteroátomos (*N*-oxidación, *S*-oxidación), formación de *N*-óxidos e hidroxilaminas, reacciones de desalquilación (*O*-desmetilación, *N*-desmetilación), deshalogenaciones, reacciones de oxidación de dobles enlaces, reacciones de deshidrogenación y oxidación aromática, e incluso ruptura de enlaces C-C (incluyendo reacciones de descarboxilación)<sup>137</sup>.

### 1.2.1. Isoformas del citocromo P450 y su interés farmacológico y toxicológico.

Tras el descubrimiento y el aislamiento de varios citocromos P450 en fracciones hepáticas, el interés científico sobre estas enzimas creció considerablemente al descubrirse que un pequeño grupo de ellas se ocupa del metabolismo de la mayoría de los fármacos y tóxicos químicos<sup>138</sup> (véase **Figura 1.8**). Tras la secuenciación del genoma humano se han identificado un total de cincuenta y siete genes y cuarenta y siete pseudogenes (genes defectivos que no originan proteína) correspondientes a citocromos P450 pertenecientes a 18 familias y 42 subfamilias<sup>139</sup>. Aunque una mayoría se expresa principalmente en el hígado, también se han descrito citocromos P450 en tejidos extrahepáticos<sup>140</sup> (riñón, cerebro, pulmón, intestino, corazón)<sup>132</sup>. En la célula, se localizan principalmente en el retículo endoplasmático y residualmente en las mitocondrias<sup>141</sup>. Aun no se conoce bien el papel biológico de muchos citocromos P450 o las reacciones metabólicas que desempeñan<sup>142</sup> (véase **Tabla 1.7**). Entre los que sí se conoce su actividad, catorce de ellos participan en la síntesis de esteroides, cuatro en el metabolismo de las vitaminas A y D, cinco en el metabolismo de eicosanoides, cuatro metabolizan ácidos grasos y quince participan en las reacciones de biotransformación de xenobióticos y fármacos. Estos últimos se encuadran entre las familias 1, 2 y 3 y subfamilias A-F. Más concretamente, los citocromos P450, 3A4, 2C9, 2D6, 2C19, 2E1, 3A4

y 1A2 participan en el metabolismo de hasta un 90 % de los fármacos existentes y los citocromos P450<sub>s</sub> 1A1, 1A2, 1B1, 2A6 y 2E1 intervienen en la biotransformación y activación de carcinógenos químicos<sup>143</sup>.

Esteroles	Xenobióticos	Ácidos grasos	Eicosanoides	Vitaminas	Desconocido
1B1	1A1	2J2	4F2	24	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	26A1	2R1
7B1	2A6	4B1	4F8	26B1	2S1
8B1	2A13	4F12	5A1	27B1	2U1
11A1	2B6		8A1		2W1
11B1	2C8				2A43
11B2	2C9				4A22
17	2C18				4F11
19	2C19				4F22
21A2	2D6				4V2
27A1	2E1				4X1
39A1	2F1				4Z1
46A1	3A4				20
51A1	3A5				26C1
	3A7				27C1

Tabla 1.7 Clasificación de los distintos citocromos P450 humanos en función del tipo de sustrato típico de metabolización<sup>130 144 141</sup>.

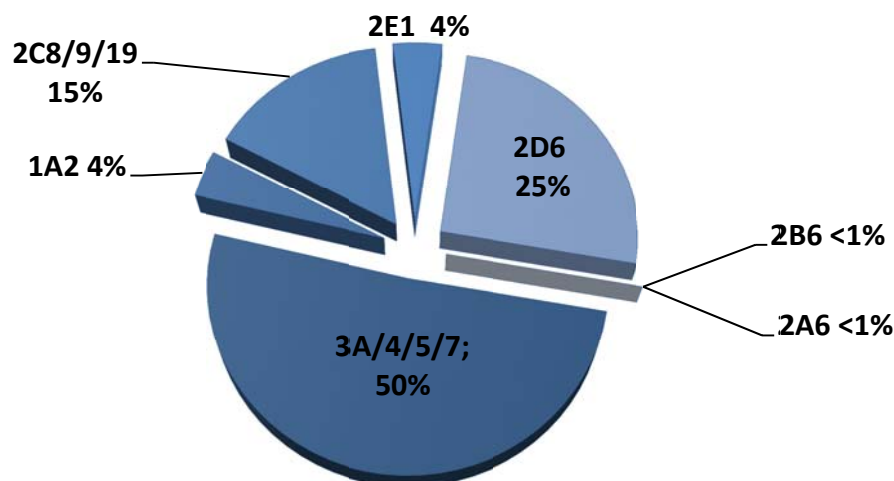


Figura 1.8 Metabolización de fármacos por distintos citocromos P450 en el hígado<sup>145</sup>.

Los citocromos P450 utilizan sustratos muy variados. Se han realizado numerosos intentos para establecer las características físico-químicas, estructurales, y electrónicas que gobiernan la selectividad y afinidad de sustrato por cada tipo de citocromo P450. El citocromo P450 1A1 tiene afinidad por hidrocarburos planares y sus dioles, el P450 1A2 tiene tendencia por aminas y amidas planas, el P450 2C9 por moléculas ácidas (no ionizadas), el P450 2D6 por moléculas básicas ionizadas, el P450 2A6 y el P450 2E1 por moléculas de pequeño tamaño y el citocromo P450 3A4 por moléculas de mayor tamaño<sup>146 147</sup>.

La actividad específica de cada citocromo P450 en el organismo humano depende de su nivel de expresión genética y de su actividad enzimática<sup>141</sup>. Influyen factores de tipo genético, fisiopatológico o ambiental (dieta, medicamentos, exposición a sustancias tóxicas)<sup>148</sup>. Algunos citocromos P450 son constitutivos (por ejemplo el 2D6) mientras que otros se inducen por sustancias químicas (por ejemplo 1A1, 2E1 y 3A4)<sup>149 150</sup>. En estos últimos, la regulación ocurre a nivel de transcripción del gen y se produce mediante receptores nucleares activados por ligandos (caso de los citocromos P450 de la subfamilias 2 y 3) o mediante los receptores de hidrocarburos alicíclicos (AHR) (caso del P450 1A)<sup>150</sup>. Por ejemplo, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA<sub>s</sub>) como el benzo[*a*]pireno o las dioxinas interaccionan con el receptor AHR, translocándose al núcleo, donde forman un complejo con la proteína ARNT y se unen a secuencias específicas del DNA, promoviendo la transcripción del citocromo P450 1A1 (proceso de inducción).

Algunos citocromos P450 se caracterizan por su polimorfismo genético que se traduce en la existencia de distintas variantes genéticas de la misma enzima<sup>151</sup>. Estas variantes pueden tener alterada su actividad catalítica, produciéndose diferencias apreciables entre individuos o grupos étnicos. El primer polimorfismo genético descrito fue el del citocromo P450 2D6<sup>152</sup>. Tras la caracterización del gen 2D6, se comprobó que existe un fenotipo denominado de metabolizadores pobres o lentos (PM) que se da hasta en el 7 % de la población del Norte de Europa<sup>153</sup>. Actualmente se conocen más de 70 variantes alélicas de la enzima 2D6; de los cuales el fenotipo PM corresponde a 4 variantes alélicas<sup>154 155</sup>. Estas variantes proporcionan enzimas poco estables (baja vida media) o con reducida actividad catalítica. Junto al fenotipo PM, existen metabolizadores extensivos (EM) que tienen un metabolismo normal de 2D6 y metabolizadores ultrarrápidos (UM) que se caracterizan por tener varias copias del gen 2D6. La relación del grado de metabolismo por 2D6 entre UM y PM puede llegar a ser del orden de 10000, lo cual indica la magnitud de esta variabilidad genética y su posible efecto<sup>141</sup>. Además del citocromo P450 2D6, el polimorfismo genético también se da en otros citocromos como 2D9 y 2C9. Estos polimorfismos generan diferentes fenotipos en determinados individuos o grupos étnicos con variaciones significativas del metabolismo y la eficacia terapéutica o toxicidad de fármacos y/o xenobióticos<sup>156</sup>.

Al margen del polimorfismo genético, una característica común de los citocromos P450 es la notable variabilidad en la expresión y contenido de enzima entre individuos<sup>141</sup>. En individuos sanos no es raro encontrar una variación en el contenido total de citocromos P450 de hasta 3 veces. Cuando se consideran únicamente citocromos P450 individuales (ej. familias 1,2,3), la variación del contenido entre individuos puede llegar a ser de entre 5 a 10 veces; en algunos casos, como para el citocromo P450 1A2, puede llegar a 40 veces<sup>157 158</sup>. En términos comparativos, cuando se trata de citocromos con alto grado de polimorfismo (ej. 2D6 y 2C19) esta variación puede alcanzar las 10000 veces<sup>141</sup>. Por otro lado, otra circunstancia que influye en esta variabilidad es la inducción por exposición a agentes químicos. Entre las enzimas que son inducibles se encuentran los citocromos P450<sub>s</sub> 1A1, 1A2, 2C, 3A4 y 2E1.

Las enzimas citocromo P450 determinan la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos (y tóxicos) en general, y de los fármacos en particular<sup>148</sup>. En muchos casos son responsables de interacciones indeseables entre fármacos, y entre éstos y otros

preparados como las plantas medicinales y/o los alimentos<sup>141 151</sup>. Estas interacciones pueden afectar a la eficacia terapéutica y generar toxicidad y se producen por la inducción de los citocromos P450, su inhibición, por la alteración de rutas primarias del metabolismo en favor de otras rutas secundarias, o la estimulación de la actividad catalítica. Debido a su importancia, las agencias reguladoras de medicamentos exigen conocer estos efectos y actualmente desaconsejan el uso de fármacos que sean inductores o inhibidores de otros citocromos o que se metabolicen exclusivamente por enzimas polimórficas como por ejemplo el citocromo P450 2D6.

Hay que destacar el papel de los citocromos P450 en toxicología<sup>141</sup>. Varios citocromos P450 (1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2E1, 3A4) participan en el metabolismo de carcinógenos químicos y también en su activación toxicológica a través de la formación de nuevas especies reactivas. Por otro lado, algunos citocromos P450 (1A1, 1A2, 3A4, 2E1) son inducibles por estas mismas sustancias químicas. Existen evidencias que relacionan el metabolismo de tóxicos por los citocromos P450 con diversas alteraciones patológicas<sup>141</sup>. No obstante, la mayoría de los estudios en este campo se han hecho en animales de laboratorio por lo que su traslación a humanos no es inmediata. También se han realizado estudios epidemiológicos sobre la relación existente entre citocromos P450 y cáncer<sup>141</sup>. El citocromo P450 1A1, que se induce por el humo del tabaco a través del receptor de hidrocarburos arílicos, se ha correlacionado con la aparición del cáncer de pulmón<sup>159</sup>. El citocromo P450 2A6 se ha correlacionado con el cáncer de pulmón debido a su participación en la activación de las *N*-nitrosaminas del humo del tabaco<sup>160</sup>. Por su parte, la actividad del citocromo P450 1A2 se ha correlacionado con la incidencia del cáncer de colon<sup>141 157 161</sup>. Esta última asociación se considera plausible debido a la participación de este citocromo en la activación de las aminas heterocíclicas aromáticas carcinogénicas<sup>162</sup>.

La participación de los citocromos P450 en los procesos toxicológicos de activación de carcinógenos (caso de los citocromos P450 1A1, 1A2 y 2A6) ha llevado a distintos investigadores a proponer el uso de sustancias quimioprotectoras que inhiban estos citocromos con el fin de prevenir estos procesos<sup>163 164 165 166</sup>. Algunas de las sustancias propuestas hasta ahora son antioxidantes y productos fitoquímicos presentes en alimentos y plantas<sup>166 167</sup>. En el último apartado de esta memoria se aborda este aspecto.



## *Hipótesis y objetivos*



### 1.3. Hipótesis y objetivos del trabajo.

El sistema de citocromos P450 humano es vital para la biotransformación y el metabolismo de las sustancias bioactivas xenobióticas, incluido los fármacos y compuestos tóxicos. La actividad biológica o toxicidad de las  $th\beta c_s$  y las  $\beta c_s$  que aparecen en los alimentos, las plantas y en los tejidos biológicos, así como la de sus análogos tóxicos, las *N*-metiltetrahidropiridinas y los cationes *N*-metilpiridinio, podría depender en gran medida de su comportamiento metabólico ante los citocromos P450. Puede presuponerse que estos compuestos siguen rutas de desactivación (detoxificación) o de activación (toxicidad) a nuevos metabolitos, que en la mayoría de los casos son aún desconocidos. El principal propósito de esta Tesis fue investigar el efecto de las enzimas del sistema citocromo P450 en el metabolismo y la biotransformación de compuestos  $\beta$ -carbolínicos así como en el de compuestos tóxicos análogos derivados de tetrahidropiridina y piridina. El estudio se aplica a distintos compuestos entre los que se encuentran: tetrahidro- $\beta$ -carbolinas ( $th\beta c_s$ ),  $\beta$ -carbolinas aromáticas ( $\beta c_s$ ), tetrahidropiridinas, *N*-metilpiridinas y cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta c_s^+$ ). Los objetivos concretos son:

1. Determinar y establecer las enzimas citocromo P450 que participan en la biotransformación y metabolismo de las  $\beta$ -carbolinas y de sus análogos, tetrahidropiridinas y cationes piridinio.
2. Determinar los metabolitos formados y la eficacia de biotransformación con el fin de determinar las rutas de detoxificación y/o de activación (toxicidad) de estos compuestos.
3. Evaluar la reducción de los cationes  $\beta c_s^+$  por la enzima citocromo P450 reductasa y su participación en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).
4. Determinar la capacidad de inhibición de las  $\beta$ -carbolinas sobre el citocromo P450 2D6.
5. Determinar la capacidad de inhibición de las  $\beta$ -carbolinas sobre los citocromos P450 de la subfamilia 1A (P450 1A1 y P450 1A2) y su comparación con sustancias antioxidantes.

Para ello, se han realizado las siguientes aproximaciones experimentales:

1. Estudios de biotransformación metabólica con enzimas citocromo P450 humanas recombinantes.
2. Estudios de biotransformación metabólica en presencia de inhibidores químicos selectivos.
3. Estudios metabólicos con microsomas hepáticos. Los resultados se comparan con los obtenidos con las enzimas individuales.
4. Estudios de reducción enzimática de los cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta c_s^+$ ) y de sus análogos tóxicos por la enzima citocromo P450 reductasa (dador de electrones del citocromo P450).

5. Estudios de inhibición de los citocromos P450 2D6, 1A1 y 1A2 por  $\beta$ -carbolicinas y por sustancias antioxidantes.

# *Material es y métodos*





## 2. Materiales y métodos.

### 2.1. Biotransformación metabólica de $\beta$ -carbolinas y tetrahidropiridinas.

#### 2.1.1. Reactivos y compuestos utilizados.

En los estudios de la biotransformación metabólica de  $\beta$ -carbolinas y de sus análogos de tetrahidropiridina se utilizaron tetrahidro- $\beta$ -carbolinas (th $\beta$ c<sub>s</sub>), tetrahidropiridinas y piridinas,  $\beta$ -carbolinas aromáticas ( $\beta$ c<sub>s</sub>), 7-metoxi- $\beta$ -carbolinas y cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta$ c<sup>+</sup><sub>s</sub>). Las estructuras se recogen en la **Tabla 2.1**. En general, estos compuestos fueron de procedencia comercial o se habían obtenido con anterioridad a esta memoria siguiendo procedimientos clásicos descritos en la literatura (véase **Figura 2.1** y **Figura 2.2**). La pureza de los compuestos fue mayor del 95 % por HPLC.

Las th $\beta$ c<sub>s</sub> ácido 1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico (THCA), ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico (MTCA), 1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina (th $\beta$ c o triptolina), y 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina (pinolina) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Las th $\beta$ c<sub>s</sub> metiladas o sustituidas, 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina (1-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c), la tetrahidroharmina (1-metil-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina), tetrahidronorharmina (7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina), 2-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina (2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c) y 1,2-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina (1,2-di-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c), se habían obtenido previamente en el laboratorio mediante la reacción clásica de ciclación de Pictet-Spengler<sup>26 56 99 168 169 170 171 172</sup> a partir de las correspondientes indolaminas y aldehídos en medio ácido (ej. ácido sulfúrico 0.05 N) (véase la **Figura 2.1**).

Los compuestos de tetrahidropiridina y piridina, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina hidrocloreto (MPTP), 1-metil-4-fenilpiridinio yoduro (MPP<sup>+</sup>), 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio, perclorato (MPDP<sup>+</sup>), 4-fenilpiridina (PP) y 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, hidrocloreto (PTP) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El compuesto 4-(4'-hidroxifenil)-1-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP-OH) se había preparado anteriormente a partir de la condensación de fenol con 1-metil-4-piperidona<sup>123 173</sup>.

Las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas, norharmano ( $\beta$ -carbolina) y harmano (1-metil- $\beta$ -carbolina) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Estos mismos compuestos y los compuestos 6-metoxi- $\beta$ -carbolinas aromáticas, también, se obtuvieron con anterioridad a partir de los correspondientes ácidos tetrahidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílicos (**Figura 2.1**) mediante oxidación con dicromato potásico, siguiendo métodos clásicos<sup>99 172</sup>.

Las 7-metoxi- $\beta$ -carbolinas, harmalina y harmina y los compuestos fenólicos, harmol y harmalol se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Para eliminar restos de harmina, la harmalina se purificó por cromatografía en columna de C<sub>18</sub> eluyendo con una mezcla de agua (pH 5.5) y acetonitrilo<sup>174</sup>.

Las 6-hidroxi- $\beta$ -carbolinas (6-hidroxinorharmano y 6-hidroxiharmano) se habían obtenido con anterioridad a partir de las correspondientes 6-metoxi- $\beta$ -carbolinas mediante reacciones de hidrólisis (*O*-desmetilación) con tribromuro de boro en diclorometano o en ácido bromhídrico concentrado<sup>175 176 177 178</sup> (**Figura 2.2**). Los

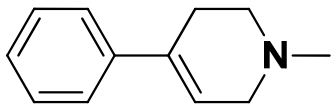
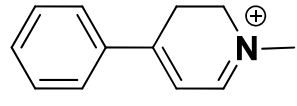
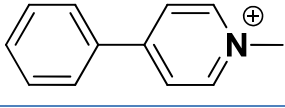
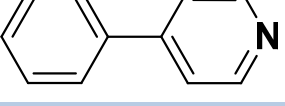
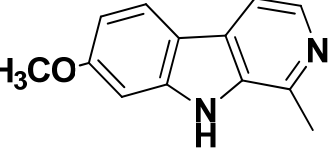
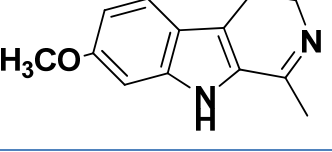
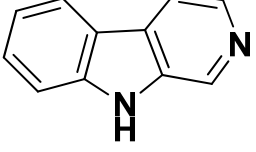
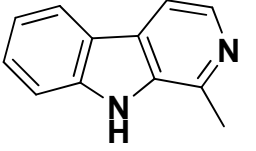
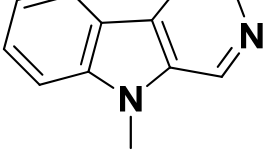
compuestos  $\beta$ -carbolina-2-óxido (norharmano-2-óxido y harmano-2-óxido) se habían obtenido a partir de las correspondientes  $\beta$ -carbolinas mediante oxidación con ácido metacloroperbenzoico (MCPBA)<sup>175</sup>. La 3-hidroxi- $\beta$ -carbolina (3-hidroxinorharmano) se había preparado desde la  $\beta$ -carbolina-3-carboxilato de etilo, que a través de la correspondientes hidrazida y azida siguiendo la reacción de Curtius da 3-amino- $\beta$ -carbolina<sup>179</sup>, que se trata con nitrito sódico en ácido sulfúrico<sup>180</sup>, para dar el compuesto 3-hidroxi- $\beta$ -carbolina<sup>175</sup>.

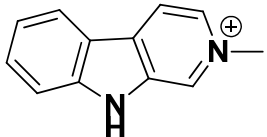
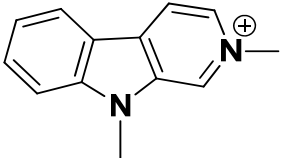
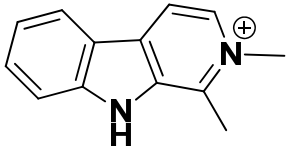
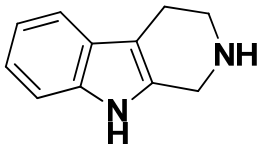
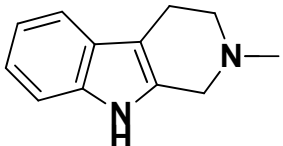
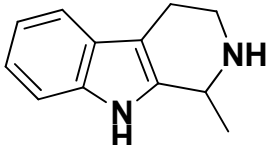
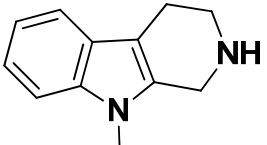
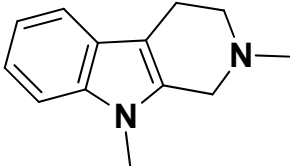
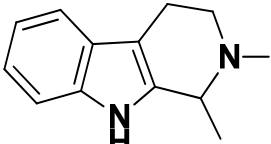
Los cationes  $\beta c^+_s$  (2-metil- $\beta$ -carbolinio, 1,2-dimetil- $\beta$ -carbolinio y 2,9-dimetil- $\beta$ -carbolinio) se habían obtenido previamente a partir de las correspondientes  $\beta$ -carbolinas por procedimientos clásicos de *N*-metilación con MeI/acetona que proporcionan los  $\beta c^+_s$  como yoduros (**Figura 2.2**)<sup>99 106 176 181</sup>, y el compuesto 3,4-dihidro-2-metil- $\beta$ -carbolinio (3,4-dh $\beta c^+$ ) por oxidación de la 2-metil-th $\beta c^{108}$ .

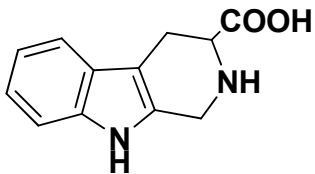
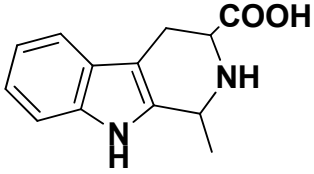
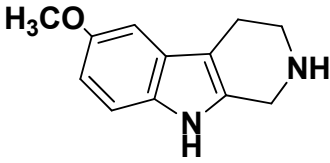
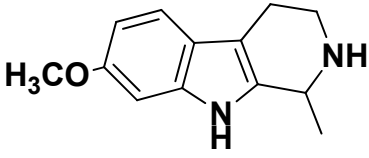
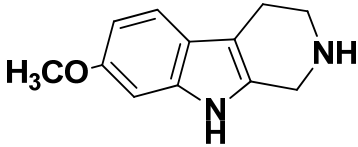
Por su parte, las 2-metiltetrahidro- $\beta$ -carbolinas (2-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina, 1,2-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina y 2,9-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina) se habían obtenido a partir de las correspondientes cationes  $\beta c^+_s$  mediante reducción clásica con borohidruro sódico/etanol<sup>182</sup> (**Figura 2.2**) o también mediante la correspondiente reacción de Pictet-Spengler (**Figura 2.1**). La 9-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina se había sintetizado desde la 1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina por *N*-metilación con yoduro de metilo tras la protección del *N*(2) y posterior desprotección.

Varias hidroxitetrahidro- $\beta$ -carbolinas se obtuvieron en el laboratorio con anterioridad a esta memoria: el compuesto 6-hidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina fue obtenido por ciclocondensación (reacción de Pictet-Spengler) desde serotonina y acetaldehído (**Figura 2.1**); la 6-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina desde serotonina y formaldehído; la 6-hidroxi-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina desde 5-hidroxi-*N*- $\omega$ -metiltriptamina y formaldehído y la 7-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina desde 6-metoxitriptamina y formaldehído, mediante hidrólisis posterior del grupo metoxi con tribromuro de boro en diclorometano. Algunos de estos compuestos también se obtuvieron por reacción de *O*-desmetilación desde las correspondientes *O*-metoxi-th $\beta c_s$  (**Figura 2.1** y **Figura 2.2**). La 7-hidroxi-1,2-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina se obtuvo previamente a partir de harmina por reacción de *N*-metilación con ICH<sub>3</sub>, reducción con NaBH<sub>4</sub> y *O*-desmetilación con BBr<sub>3</sub> (**Figura 2.2**).



Estructura	Nombre
<b>Derivados tetrahidropiridina y piridina</b>	
	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)
	catión 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio (MPDP <sup>+</sup> )
	catión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP <sup>+</sup> )
	4-fenilpiridina (PP)
<b><math>\beta</math>-carbolinas aromáticas (<math>\beta_c</math>) y metoxi-<math>\beta</math>-carbolinas</b>	
	1-metil-7-metoxi- $\beta$ -carbolina (harmina)
	1-metil-7-metoxi-3,4-dihidro- $\beta$ -carbolina. (harmalina)
	$\beta$ -carbolina (norharmano)
	1-metil- $\beta$ -carbolina (harmano)
	9-metil- $\beta$ -carbolina

Cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+_s$ )	
	catión 2-metil- $\beta$ -carbolinio ( <b>2-CH<sub>3</sub>-<math>\beta c^+</math></b> )
	catión 2,9-dimetil- $\beta$ -carbolinio ( <b>2,9-di-CH<sub>3</sub>-<math>\beta c^+</math></b> )
	catión 1,2-dimetil- $\beta$ -carbolinio ( <b>1,2-di-CH<sub>3</sub>-<math>\beta c^+</math></b> )
tetrahidro- $\beta$ -carbolinas simples ( $th\beta c_s$ )	
	1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina ( <b>th<math>\beta c</math></b> o triptolina)
	2-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina ( <b>2-CH<sub>3</sub>-th<math>\beta c</math></b> )
	1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina ( <b>1-CH<sub>3</sub>-th<math>\beta c</math></b> )
	9-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina ( <b>9-CH<sub>3</sub>-th<math>\beta c</math></b> )
	2,9-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina ( <b>2,9-di-CH<sub>3</sub>-th<math>\beta c</math></b> )
	1,2-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina ( <b>1,2-di-CH<sub>3</sub>-th<math>\beta c</math></b> )

	ácido 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico <b>(THCA)</b>
	ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico <b>(MTCA)</b>
<b>metoxitetrahydro-<math>\beta</math>-carbolidas</b>	
	6-metoxi-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolina <b>(pinolina)</b>
	1-metil-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolina <b>(tetrahydroharmina)</b>
	7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolina <b>(tetrahydronorharmina)</b>

**Tabla 2.1** Compuestos evaluados en los estudios de biotransformación metabólica por citocromos P450.

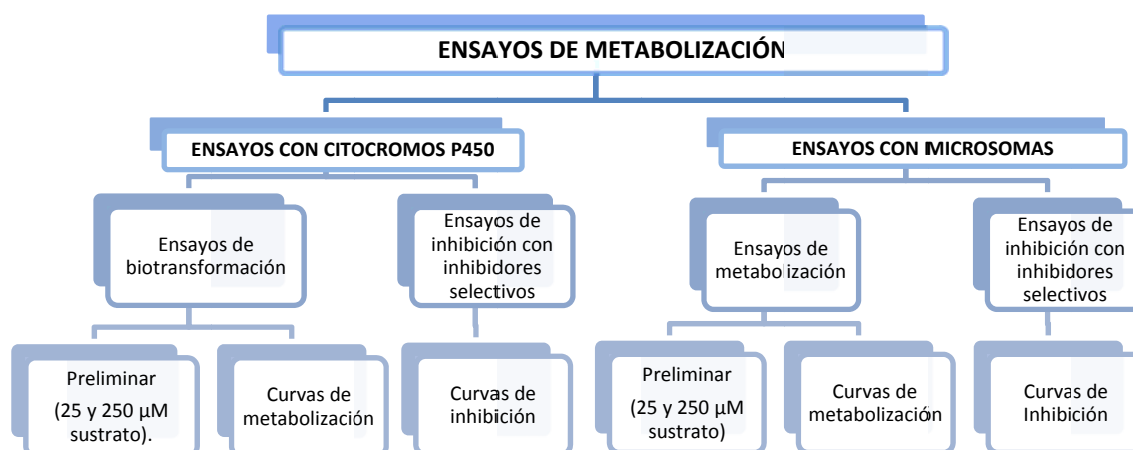
### 2.1.2. Enzimas citocromo P450, fracciones microsomaes hepáticas y procedimientos experimentales empleados en los ensayos de biotransformación metabólica.

Las enzimas citocromo P450 humanas recombinantes se obtuvieron de BD Gentest (Woburn, MA, USA) (**Tabla 2.2**). Estas enzimas se preparan como fracciones microsomaes junto con la enzima NADPH-citocromo P450 óxidoreductasa y en algunos casos el citocromo b5, y se expresan en cultivos de células de insecto (BTI-TN-5B1-4) infectadas con un baculovirus (*Autographa californica*) que contiene el fragmento de expresión genómica cDNA humano correspondiente a la enzima citocromo P450 y a la enzima citocromo P450 reductasa. Estos citocromos necesitan del cofactor-dador de electrones NADPH ( $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotido fosfato), que se obtuvo de Sigma-Aldrich. Por otro lado, en los estudios realizados para comparar los efectos del polimorfismo genético del citocromo P450 2D6 sobre la biotransformación de th $\beta$ c<sub>s</sub>, se utilizaron las enzimas citocromo P450 2D6\*1 (variante común) y citocromo P450 2D6\*10 (variante alélica asiática) de BD Gentest<sup>123</sup>. En los estudios de biotransformación se utilizaron inhibidores químicos selectivos de cada enzima (**Tabla 2.2**), que se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Citocromos P450	Inhibidores selectivos
1A1	$\alpha$ -naftoflavona
1A2	$\alpha$ -naftoflavona
2A6	tranilcipromina
2C9	fluvoxamina
2C19	fluvoxamina
2D6*1	quinidina
2E1	4-metilpirazol
3A4	ketoconazol

**Tabla 2.2** Enzimas citocromo P450 humanas y sus correspondientes inhibidores selectivos<sup>141 183</sup>.

Por otro lado, además de las enzimas citocromo P450 humanas recombinantes (**Tabla 2.2**), se utilizaron fracciones subcelulares de microsomas hepáticos humanos que contienen todos los citocromo P450 humanos nativos y que se obtuvieron comercialmente de BD Gentest. En general, el procedimiento experimental realizado para cada sustrato sigue el diagrama de la **Figura 2.3**.



**Figura 2.3** Esquema de trabajo utilizado en los ensayos de metabolización y biotransformación de  $\beta$ -carbolicinas.

Para cada sustrato se realizan ensayos de biotransformación metabólica con enzimas citocromo P450 y con fracciones subcelulares hepáticas, y ensayos de inhibición selectiva. Para los ensayos de biotransformación metabólica se realizan ensayos de biotransformación preliminares con los distintos citocromos a la misma concentración de enzima (pmoles de P450/mL) y a dos concentraciones de sustrato (25 y 250  $\mu$ M). Estos ensayos proporcionan información sobre los compuestos que sufren biotransformación, las enzimas implicadas y los metabolitos producidos. A continuación se construyen las curvas de metabolización para los citocromos más representativas del metabolismo oxidativo del compuesto en cuestión considerando un rango de concentraciones del sustrato adecuado y a una concentración óptima de enzima. Finalmente se realizan estudios de inhibición con inhibidores selectivos (véase **Tabla 2.2**) de las enzimas más representativas del metabolismo para confirmar su participación en la biotransformación metabólica.

A continuación se describen los procedimientos realizados agrupados por compuestos:

### 2.1.3. Tetrahidro- $\beta$ -carbolinas (th $\beta$ c<sub>s</sub>).

#### a) Ensayos con citocromos P450.

Se realizaron ensayos de biotransformación metabólica en tubos eppendorf (volumen final de reacción: 0.2 mL), que contenía tampón fosfato 100 mM (pH=7.40) (para las enzimas citocromo P450: 1A1, 1A2, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) o tampón TRIS-HCl 100 mM (pH=7.40) (para las enzimas 2A6 y 2C9), más la th $\beta$ c objeto de estudio (es decir, THCA, MTCA, 1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina, 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina, 2-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina, 1,2-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina, 2,9-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina, 9-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina, pinolina, tetrahidroharmina o tetrahidronorharmina) en concentraciones de 25 o 250  $\mu$ M, y el citocromo P450 humano correspondiente (véase **Tabla 2.2**) (35 pmoles cit. P450/mL). Las muestras se preincubaron 3 minutos a 37°C, y se añadió NADPH (1 mM) para iniciar la reacción de biotransformación enzimática, incubándolas seguidamente durante 25 minutos en un baño de agua a 37°C. La reacción se paró añadiendo 50  $\mu$ L de una mezcla de ácido perclórico-metanol (1:1) (volumen final de 0.25 mL), y se centrifugaron los tubos a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos a 5°C. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado, e incluyeron controles sin NADPH y sin enzima. Las muestras se inyectaron en HPLC-MS y HPLC para identificar y cuantificar los metabolitos (véase más adelante).

Tras el cribado inicial, se construyeron las curvas de metabolización de las th $\beta$ c<sub>s</sub> con los citocromos que resultaron ser más significados (generalmente el P450 2D6 o el P450 2C19), siguiendo el mismo protocolo anterior pero utilizando un rango variable de concentraciones de sustrato (0-500  $\mu$ M) a una concentración adecuada de enzima. Estas curvas se utilizaron para el cálculo de las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_m$  y la relación  $V_{max}/K_m$  tras el ajuste a cinéticas de Michaelis-Menten<sup>184</sup>.

Los estudios comparativos de la biotransformación de th $\beta$ c<sub>s</sub> entre variantes polimórficas del citocromo P450 2D6, se realizaron siguiendo el mismo procedimiento anterior pero utilizando las enzimas citocromo P450 2D6\*1 (variante común) y 2D6\*10 (variante asiática) en una concentración de 70 pmoles cit. P450/mL y 250  $\mu$ M de la th $\beta$ c.

Los ensayos de inhibición selectiva de la biotransformación se realizaron siguiendo el mismo protocolo anterior pero añadiendo, además, los correspondientes inhibidores selectivos de los citocromos implicados en la biotransformación (véase **Tabla 2.2**). Se llevaron a cabo estudios de inhibición en presencia de quinidina (0-0.5  $\mu$ M) (inhibidor del citocromo P450 2D6) y de fluvoxamina (0-20  $\mu$ M) (inhibidor del citocromo P450 2C19).

#### b) Ensayos de metabolización con microsomas hepáticos.

Se realizaron ensayos de biotransformación metabólica en tubos eppendorf (volumen final de reacción: 0.2 mL), que contenía tampón fosfato 100 mM (pH=7.40), la th $\beta$ c correspondiente (25 o 250  $\mu$ M) y microsomas hepáticos humanos (168 o 232 pmoles cit. P450/mL según el sustrato). Las muestras se preincubaron 3 minutos a

37°C, y se añadió NADPH (1 mM), incubándolas seguidamente durante 25 minutos en un baño de agua a 37°C. A continuación se añadió 50 µL de una mezcla (1:1) de ácido perclórico-metanol (volumen final: 0,25 mL) y se centrifugaron los tubos a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos a 5°C. Las muestras se inyectaron en HPLC-MS y HPLC para identificar y cuantificar los metabolitos producidos. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado e incluyeron controles sin NADPH y sin fracción microsomal.

A continuación se construyeron curvas de metabolización de las thβc<sub>s</sub> por microsomas hepáticos en un intervalo de concentraciones de sustrato (0-500 µM). Estas curvas se utilizaron para calcular las constantes cinéticas V<sub>max</sub> y K<sub>m</sub> y la relación V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub> tras su ajuste a cinéticas de Michaelis-Menten.

Siguiendo el protocolo anterior se realizaron ensayos de inhibición de la biotransformación de thβc<sub>s</sub> en presencia de quinidina, un inhibidor selectivo quinidina (0-5 µM).

#### **2.1.4. N-Metiltetrahidropiridinas (MPTP) y N-metilfenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>).**

##### **a) Ensayos con citocromos P450.**

Se realizaron ensayos de biotransformación metabólica en tubos eppendorf (volumen final de reacción: 0.2 mL), que contenía tampón fosfato 100 mM (pH=7.40) (para los citocromo P450: 1A1, 1A2, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) o tampón TRIS-HCl 100 mM (pH=7.40) (para P450 2A6 y P450 2C9), más 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) o la piridina correspondiente (catión 1-metil-4-fenilpiridinio -MPP<sup>+</sup>- o 4-fenilpiridina) (25 o 250 µM), y el citocromo P450 humano correspondiente (35 pmoles cit. P450/mL). Tras añadir la enzima, las muestras se preincubaron 3 minutos a 37°C, y se añadió NADPH (1 mM), incubándolas a continuación durante 25 minutos en un baño de agua a 37°C. La reacción se paró añadiendo 50 µL de una mezcla (1:1) de ácido perclórico-metanol (volumen final: 0.25 mL) y se centrifugaron los tubos a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos a 5°C. Las muestras se inyectaron en HPLC-MS y HPLC para identificar y cuantificar los metabolitos producidos. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado, incluyendo controles sin NADPH y sin enzima.

A continuación se construyeron las curvas de metabolización del MPTP por el citocromo P450 2D6 siguiendo el mismo protocolo anterior pero utilizando un rango variable de concentraciones de sustrato (0-500 µM). Estas curvas permitieron el cálculo de los parámetros cinéticos V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>, y V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub> tras los correspondientes ajustes a cinéticas de Michaelis-Menten.

Los ensayos de inhibición se realizaron siguiendo el mismo protocolo anterior pero añadiendo, además, los correspondientes inhibidores selectivos de los citocromos implicados (véase **Tabla 2.2**). En este caso, se llevaron a cabo ensayos en presencia de quinidina (0-0.6 µM), fluvoxamina (0-20 µM), o α-naftoflavona (0-5 µM) utilizando sustrato MPTP (100 o 250 µM).

## **b) Ensayos de metabolización con microsomas hepáticos.**

Se realizaron ensayos de biotransformación metabólica en tubos eppendorf (volumen final de reacción: 0.2 mL), que contenía tampón fosfato 100 mM (pH=7.40), el sustrato MPTP (25 o 250  $\mu$ M), y microsomas hepáticos humanos (232 pmoles cit. P450/mL). Las muestras se preincubaron 3 minutos a 37°C, y se añadió NADPH (1 mM), incubándolas a continuación durante 25 minutos en un baño de agua a 37°C. La reacción se paró añadiendo 50  $\mu$ L de una mezcla (1:1) de ácido perclórico-metanol (volumen final: 0.25 mL) y se centrifugaron los tubos a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos a 5°C. Las muestras se inyectaron en HPLC-MS y HPLC para identificar y cuantificar los metabolitos producidos. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado e incluyeron controles sin NADPH y sin fracción microsomal.

A continuación se construyeron las curvas de metabolización por microsomas hepáticos utilizando un intervalo de concentraciones del sustrato MPTP (0-500  $\mu$ M). Estas se utilizaron para calcular las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_m$  y la relación  $V_{max}/K_m$  tras el ajuste a cinéticas de Michaelis-Menten.

Los ensayos de inhibición de la biotransformación por microsomas se realizaron siguiendo el mismo protocolo anterior a una concentración fija de sustrato, e incluyendo además el inhibidor quinidina (0-5  $\mu$ M).

### **2.1.5. $\beta$ -Carbolinas aromáticas ( $\beta_c$ ) y metoxi- $\beta$ -carbolinas.**

#### **2.1.5.1 Biotransformación de las $\beta_c$ aromáticas (norharmano y harmano).**

##### **a) Ensayos con citocromos P450.**

Se realizaron ensayos de biotransformación metabólica en tubos eppendorf (volumen final de reacción: 0.2 mL), que contenía tampón fosfato 100 mM (pH=7.40) (para los citocromo P450: 1A1, 1A2, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) o tampón TRIS-HCl 100 mM (pH=7.40) (para 2A6 y 2C9), más la  $\beta_c$  aromática (norharmano o harmano) (25 o 250  $\mu$ M), y el citocromo P450 humano correspondiente (35 pmoles cit. P450/mL). Tras añadir el citocromo P450, las muestras se preincubaron 3 minutos a 37°C y se añadió NADPH (1 mM) para iniciar la reacción de biotransformación, incubándolas a continuación durante 25 minutos en un baño de agua a 37°C. La reacción se paró añadiendo 50  $\mu$ L de una mezcla (1:1) de ácido perclórico-metanol (volumen final de 0,25 mL) y se centrifugaron los tubos a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos a 5°C. Las muestras se inyectaron en HPLC-MS y HPLC para identificar y cuantificar los metabolitos producidos. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado, e incluyeron controles sin NADPH y sin enzima.

A continuación se construyeron curvas de metabolización de las  $\beta_c$  por los citocromos P450 1A1, 1A2, 2D6, 2C19 y 2E1. Para ello, se siguió el mismo protocolo anterior, fijando la concentración de enzima y utilizando un intervalo de concentraciones de sustrato (0-500  $\mu$ M). Estas curvas se utilizaron para el cálculo de las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_m$  y la relación  $V_{max}/K_m$  tras el ajuste de los datos a cinéticas de Michaelis-Menten.

Los estudios de inhibición se realizaron siguiendo el mismo protocolo anterior pero añadiendo los correspondientes inhibidores selectivos de los citocromos implicados en la biotransformación de  $\beta_c$ s (véase **Tabla 2.2**). En este caso, se llevaron a cabo estudios de la inhibición del P450 1A2 en presencia de  $\alpha$ -naftoflavona (0-1  $\mu$ M), del citocromo P450 2E1 en presencia de 4-metilpirazol (0-100  $\mu$ M) y del citocromo P450 2D6 en presencia de quinidina (0-300 nM).

#### **b) Ensayos de metabolización con microsomas hepáticos.**

Se realizaron ensayos de biotransformación metabólica en tubos eppendorf (volumen final de reacción: 0.2 mL), que contenían tampón fosfato 100 mM (pH=7.40), el sustrato  $\beta_c$  aromática (norharmano o harmano) en un intervalo de concentraciones de 0-500  $\mu$ M, y microsomas hepáticos humanos (168 pmoles cit. P450/mL). Las muestras se preincubaron 3 minutos a 37°C y se añadió NADPH (1 mM), incubándolas a continuación durante 25 minutos en un baño de agua a 37°C. La reacción se paró añadiendo 50  $\mu$ L de una mezcla (1:1) de ácido perclórico-metanol (volumen final: 0.25 mL) y se centrifugaron los tubos 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos a 5°C. Las muestras se inyectaron en HPLC-MS y HPLC para identificar y cuantificar los metabolitos producidos. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado e incluyeron controles sin NADPH y sin fracción microsomal.

A continuación se construyeron las curvas de metabolización de las  $\beta_c$ s aromáticas (norharmano y harmano) utilizando un intervalo de concentraciones del sustrato que se utilizaron para calcular las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_m$  y la relación  $V_{max}/K_m$  tras el conveniente ajuste a cinéticas de Michaelis-Menten.

Los ensayos de inhibición en presencia de inhibidores selectivos se realizaron siguiendo el protocolo anterior, incluyendo, además, el inhibidor correspondiente ( $\alpha$ -naftoflavona, 4-metilpirazol o quinidina).

#### **2.1.5.2. Biotransformación de metoxi- $\beta$ -carbolinas (harmina y harmalina).**

##### **a) Ensayos con citocromos P450.**

Se realizaron ensayos de biotransformación metabólica en tubos eppendorf (volumen final de reacción: 0.2 mL), que contenía tampón fosfato 100 mM (pH=7.40) (para los citocromo P450: 1A1, 1A2, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) o tampón TRIS-HCl 100 mM (pH=7.40) (para P450 2A6 y P450 2C9), más harmina o harmalina (25 o 250  $\mu$ M) como sustrato, y el citocromo P450 humano correspondiente (35 pmoles cit. P450/mL). Tras añadir el citocromo P450, las muestras se preincubaron 3 minutos a 37°C y se añadió NADPH (1 mM) para iniciar la reacción de biotransformación enzimática, incubándolas seguidamente durante 25 minutos en un baño de agua a 37°C. La reacción se paró añadiendo 50  $\mu$ L de una mezcla (1:1) de ácido perclórico-metanol (volumen final: 0.25 mL) y se centrifugaron los tubos a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos a 5°C. Las muestras se inyectaron en HPLC-MS y HPLC para identificar y cuantificar los metabolitos producidos. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado e incluyeron controles sin NADPH y sin enzima.

Las curvas de metabolización de las metoxi- $\beta$ c<sub>s</sub>, harmina y harmalina se construyeron para los citocromos P450 1A1, 1A2, 2C19, 2D6 y 3A4, siguiendo el mismo protocolo experimental anterior, pero utilizando un intervalo de concentraciones de sustrato (0-500  $\mu$ M), y ajustando la cantidad de enzima (17.5-35 pmoles cit. P450/mL). Estas curvas se utilizaron para el cálculo de las constantes cinéticas  $V_{\max}$  y  $K_m$  y la relación  $V_{\max}/K_m$  tras el ajuste de los datos a cinéticas de Michaelis-Menten.

Los estudios de inhibición de la biotransformación se realizaron siguiendo el mismo protocolo anterior pero añadiendo los correspondientes inhibidores selectivos de los citocromos implicados. Se llevaron a cabo estudios de inhibición de los citocromo P450 1A1 y 1A2 en presencia de  $\alpha$ -naftoflavona (0-5  $\mu$ M), del citocromo P450 2D6 por quinidina (0-1  $\mu$ M), de los citocromos P450 2C9 y 2C19 por fluvoxamina (0-50  $\mu$ M) y del citocromo P450 3A4 por ketoconazol (0-1  $\mu$ M).

### **b) Ensayos de metabolización con microsomas hepáticos.**

Se realizaron ensayos de biotransformación metabólica en tubos eppendorf (volumen final de reacción: 0.2 mL), que contenían tampón fosfato 100 mM (pH=7.40), el sustrato metoxi- $\beta$ -carbolina (harmina y harmalina) (25 o 250  $\mu$ M), y microsomas hepáticos humanos (231 pmoles cit. P450/mL). Las muestras se preincubaron 3 minutos a 37°C, y se añadió NADPH (1 mM) para iniciar la reacción enzimática, incubándolas seguidamente durante 25 minutos en un baño de agua a 37°C. La reacción se paró añadiendo 50  $\mu$ L de una mezcla (1:1) de ácido perclórico-metanol (volumen final: 0.25 mL) y se centrifugaron los tubos a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos a 5°C. Las muestras se inyectaron en HPLC-MS y HPLC para identificar y cuantificar los metabolitos. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado e incluyeron controles sin NADPH y sin fracción microsomal.

A continuación se construyeron curvas de metabolización de las metoxi- $\beta$ c<sub>s</sub>, harmina y harmalina en un intervalo de concentraciones de la  $\beta$ c (0-500  $\mu$ M) utilizando el mismo protocolo anterior. Estas curvas se utilizaron para calcular las constantes cinéticas  $V_{\max}$  y  $K_m$  y la relación  $V_{\max}/K_m$  tras su ajuste a cinéticas de Michaelis-Menten.

Los ensayos de inhibición de la biotransformación por microsomas en presencia de inhibidores selectivos se realizaron siguiendo el mismo protocolo anterior, incluyendo además el inhibidor correspondiente:  $\alpha$ -naftoflavona, quinidina, o ketoconazol.

### **2.1.6. Cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta$ c<sup>+</sup><sub>s</sub>).**

#### **a) Ensayos con citocromos P450.**

Se realizaron ensayos de biotransformación metabólica en tubos eppendorf (volumen final de reacción: 0.2 mL), que contenían tampón fosfato 100 mM (pH=7.40) (para los citocromo P450: 1A1, 1A2, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) o tampón TRIS-HCl 100 mM (pH=7.40) (para 2A6 y 2C9), más el sustrato  $\beta$ -carbolinio ( $\beta$ c<sup>+</sup><sub>s</sub>) correspondiente (2-metil- $\beta$ -carbolinio, 2,9-dimetil- $\beta$ -carbolinio o 1,2-dimetil- $\beta$ -carbolinio) (25 o 250  $\mu$ M), y el citocromo P450 correspondiente (35 pmoles cit. P450/mL). Tras añadir el citocromo P450, las muestras se preincubaron 3 minutos a 37°C, y se añadió NADPH (1 mM) para

iniciar la reacción enzimática, incubándolas seguidamente durante 25 minutos en un baño de agua a 37°C. La reacción se paró con 50 µL de una mezcla (1:1) de ácido perclórico-metanol (volumen final: 0.25 mL) y se centrifugaron los tubos a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos a 5°C. Las muestras se inyectaron en HPLC-MS y HPLC para identificar y cuantificar los metabolitos producidos. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado e incluyeron controles sin NADPH y sin enzima.

A continuación se construyeron curvas de metabolización de los cationes  $\beta c^+$  por los citocromos P450 1A1 y 2D6 para lo cual se siguió el mismo protocolo anterior pero utilizando un intervalo de concentraciones del sustrato  $\beta c^+$  (0-500 µM). Estas curvas permitieron el cálculo de las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_m$  y la relación  $V_{max}/K_m$  tras el ajuste a cinéticas de Michaelis-Menten.

Los ensayos en presencia de inhibidores selectivos se realizaron siguiendo el mismo protocolo experimental anterior fijando la concentración de sustrato (100 µM) e incluyendo el correspondiente inhibidor (véase **Tabla 2.2**).

#### **b) Ensayos de metabolización con microsomas hepáticos.**

Se realizaron ensayos de biotransformación metabólica en tubos eppendorf (volumen final de reacción: 0.2 mL), que contenían tampón fosfato 100 mM (pH=7.40), el sustrato  $\beta$ -carbolinio correspondiente (25 o 250 µM), y microsomas hepáticos humanos (175 pmoles cit. P450/mL). Las muestras se preincubaron 3 minutos a 37°C y se añadió NADPH (1 mM), incubándolas seguidamente durante 25 min en un baño de agua a 37°C. La reacción se paró con 50 µL de una mezcla (1:1) de ácido perclórico-metanol (volumen final de 0.25 mL) y se centrifugaron los tubos a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos a 5°C. Las muestras se inyectaron en HPLC-MS y HPLC para identificar y cuantificar los metabolitos producidos. Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado e incluyeron controles sin NADPH y sin microsomas.

Los ensayos de inhibición en presencia de inhibidores selectivos se realizaron siguiendo el mismo protocolo anterior utilizando una concentración fija del cation  $\beta c^+$  (250 µM) e incluyendo el inhibidor correspondiente ( $\alpha$ -naftoflavona, quinidina o ketoconazol).

#### **2.1.7. Análisis cromatográfico de los ensayos de biotransformación.**

##### **a) Análisis por RP-HPLC-DAD-fluorescencia de los metabolitos.**

Los medios de incubación anteriores se analizaron mediante RP-HPLC con detección de UV-DAD y fluorescencia. Para ello, se utilizó un aparato de HPLC Hewlett Packard 1050 con una bomba cuaternaria e inyección manual acoplado a un detector de diodos en serie (DAD) 1100 y a un detector de fluorescencia (FLD) 1046 (Agilent Technologies). La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna Novapak  $C_{18}$  (3.9 x 150 mm, 4 µm) (Waters, Milford, MA, USA), con un flujo de 1 mL/min, temperatura de 40 °C y volumen de inyección de 20 µL.

Según los sustratos y metabolitos a analizar, se utilizaron dos condiciones cromatográficas distintas:

–Sistema 1) Eluyente A: tampón fosfato amónico 50 mM, pH=3.00; eluyente B: 20% del eluyente A en acetonitrilo. Gradiente de elución programado desde 100 % de A (0 % B) hasta 32 % de B en 8 minutos, alcanzando el 90 % de B a los 18 minutos (ensayos con th $\beta$ c<sub>s</sub>,  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas, harmina y cationes  $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup>).

–Sistema 2) Eluyente A: tampón fosfato amónico 50 mM, pH=5.50; eluyente B: 20% del eluyente A en acetonitrilo. Gradiente de elución programado desde 100 % de A (0 % B) hasta 32 % de B en 8 minutos alcanzando el 90 % de B a los 18 minutos (ensayos con MPTP, 2-metil-th $\beta$ c<sub>s</sub> y harmalina).

La detección cromatográfica se realizó mediante UV-DAD adquiriendo los espectros correspondientes y registrando cromatogramas a distintas longitudes de onda (243, 254, 265, 280 y 355 nm) y por fluorescencia a distintas longitudes de onda de excitación y de emisión según los compuestos y metabolitos a analizar: th $\beta$ c<sub>s</sub> (excitación a 270 nm y emisión a 343 nm) y  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas (excitación a 300 nm y emisión a 433 nm)<sup>22</sup>.

Los metabolitos se identificaron mediante los correspondientes espectros de absorción de los picos cromatográficos, la coelución con estándares y la comparación con datos de la literatura. Estos resultados se confirmaron mediante RP-HPLC-acoplada a espectrometría de masas. Los metabolitos analizados fueron:

a) En los ensayos de biotransformación de th $\beta$ c<sub>s</sub> se cuantificaron los compuestos 6-hidroxitetrahydro- $\beta$ -carbolinas y 7-hidroxitetrahydro- $\beta$ -carbolinas por absorbancia a 280 nm y fluorescencia a 270 nm (excitación) y 343 nm (emisión). En los ensayos con 2-metiltetrahydro- $\beta$ -carbolinas se cuantificaron 6-hidroxi-2-metiltetrahydro- $\beta$ -carbolinas, 7-hidroxi-2-metiltetrahydro- $\beta$ -carbolinas y tetrahydro- $\beta$ -carbolinas (th $\beta$ c<sub>s</sub>) por absorbancia a 280 nm y fluorescencia a 270 nm (excitación) y 343 nm (emisión) y cationes 2-metil-3,4-dihidro- $\beta$ -carbolinio por absorbancia a 355 nm<sup>109 123</sup>.

b) En los ensayos con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), se cuantificaron los metabolitos: PTP (4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) por absorbancia a 243 nm y fluorescencia a 243 nm (excitación) y 310 nm (emisión), MPTP-OH (4-(4'-hidroxifenil)-1-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) por absorbancia a 254 nm, MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridinio) por absorbancia a 280 nm y por fluorescencia a 295 nm (excitación) y a 375 nm (emisión) y el MPDP<sup>+</sup> (catión 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio) por absorbancia a 355 nm<sup>123 127</sup>. Los compuestos PP (4-fenilpiridina) y 4-fenilpiridina-N-óxido se analizaron a 280 nm.

c) En los ensayos de biotransformación de  $\beta$ -carbolinas aromáticas ( $\beta$ c<sub>s</sub>) se analizaron los compuestos 6-hidroxi- $\beta$ -carbolina a 265 nm, 3-hidroxi- $\beta$ -carbolina a 243 nm y  $\beta$ -carbolina-2-óxido a 254 nm de absorción<sup>175</sup>.

d) En los ensayos con harmalina se analizaron: harmalol (355 nm) y harmina (254 nm). En los experimentos con harmina se determinaron: harmol (243 nm), 6-hidroxiharmina (243 nm), harmina-2-óxido (243 nm) y 3-hidroxiharmina (243 nm).

e) En los ensayos con cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup>) se analizaron los cationes 6-hidroxi  $\beta$ -carbolinio a 265 nm y los cationes 3-hidroxi  $\beta$ -carbolinio a 243 nm.

La concentración de los metabolitos se determinó aplicando los factores de respuesta obtenidos con rectas de calibrado utilizando patrones (intervalo de concentración 0-50  $\mu\text{M}$  en las mismas condiciones cromatográficas y de detección en las que se realizaron los ensayos enzimáticos). Los datos cuantitativos se dan como la velocidad de formación de metabolito en el medio de incubación en función de la concentración de enzima y del tiempo de incubación (pmoles de metabolito generado/minuto y pmol de citocromo P450).

### **b) Análisis por RP-HPLC-DAD-MS**

Los medios de incubación se analizaron mediante RP-HPLC acoplada a un detector de espectrometría de masas (RP-HPLC-MS). Para ello se utilizaron dos equipos distintos:

- a) Un cromatógrafo RP-HPLC-MS de la serie 1100 (Hewlett Packard) equipado con un inyector automático, un detector de DAD y un analizador de masas cuadrupolo.
- b) Un cromatógrafo HPLC 1200 con un detector DAD, acoplado a un detector cuadrupolo de masas 6110 (Agilent Technologies) equipado con un inyector manual.

Para la separación cromatográfica se utilizaron dos columnas distintas:

- a) Columna Zorbax SB-C<sub>18</sub> (2.1 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (Agilent). Eluyente A: ácido fórmico (0.1 o 0.5 %) y eluyente B: ácido fórmico (0.1 o 0.5 %) en acetonitrilo. El gradiente de elución fue: 70 % B en 30 min; flujo de 0.25 mL/minuto y temperatura de 40°C.
- b) Columna Novapak C18 (3.9 mm x 150 mm, 4  $\mu\text{m}$ ) (Waters). Eluyente A: ácido acético (0.5 %) y eluyente B: ácido acético (0.5%): acetonitrilo (20:80). Gradiente: 60 % B en 15 min; flujo de 0.7 mL/min y temperatura de 40 °C.

El detector de masas trabajó en ionización por electrospray (ESI), generalmente en modo positivo. La temperatura del gas de secado fue de 350 °C con un flujo de 10 L/min, siendo la presión del nebulizador de 40 psi, y el voltaje del capilar es de 4000 V. El voltaje de fragmentación del espectrómetro de masas fue variable desde 60-200 V dependiendo de los compuestos a analizar y adquirió datos en un rango de masas de 50 a 600 u. La identidad de los picos cromatográficos se estableció mediante los correspondientes espectros de masas, fragmentación a distintos voltajes y coelución con estándares de referencia.

### 2.1.8. Cálculo de parámetros cinéticos $V_{max}$ y $K_m$ .

Los resultados se dan como datos de velocidad de formación ( $v$ ) de los metabolitos en función del tiempo de incubación y de la concentración de enzima (pmoles de metabolito formado/min pmol citocromo P450). La representación de  $v$  en función de la concentración de sustrato se ajustó a cinéticas de Michaelis-Menten por regresión no lineal y se calcularon los parámetros cinéticos de  $V_{max}$  y  $K_m$ , así como la relación  $V_{max}/K_m$  que informa sobre la eficacia global de la biotransformación. En los ensayos en presencia de inhibidores se calculó el porcentaje (%) de inhibición en función de la concentración de inhibidor, permitiendo el cálculo de los valores de  $IC_{50}$  (concentración de inhibidor necesaria para conseguir una inhibición de la biotransformación del 50 % o también concentración de inhibidor a la cual la velocidad de reacción disminuye a la mitad). Para el ajuste de los datos, obtención de los datos cinéticos y la representación gráfica se utilizó el programa informático GraphPad Prism 4.0. (San Diego, California, USA).

### 2.1.9. Reducción de los cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+_s$ ), cationes piridinio y quinonas.

#### 2.1.9.1. Compuestos químicos y enzimas utilizados.

En la **Tabla 2.3** se recogen las estructuras de los compuestos utilizados en este apartado. El paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio), 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>), menadiona y la *p*-benzoquinona se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Los compuestos catiónicos  $\beta c^+$  (2-metil- $\beta$ -carbolinio, 1,2-dimetil- $\beta$ -carbolinio, 2,9-dimetil- $\beta$ -carbolinio y 1,2,9-trimetil- $\beta$ -carbolinio) se habían obtenido con anterioridad en nuestro laboratorio mediante la reacción de los correspondientes  $\beta c_s$  aromáticas con  $ICH_3$  en acetona y se obtuvo una pureza mayor del 95 % por HPLC.

Se utilizaron las siguientes enzimas: a) *p*-nitrobenzoato reductasa (pnb) clonada desde *Lactobacillus plantarum*<sup>185</sup>. Esta enzima es una flavoproteína que utiliza NADPH y NADH y es capaz de reducir grupos nitro y quinonas (328  $\mu$ g proteína/mL); b) microsomas con NADPH-citocromo P450 reductasa recombinante humana (10 mg proteína/mL) de BD Gentest (BD Biosciences; Woburn, MA, USA); c) enzima NADPH-citocromo P450 reductasa recombinante humana purificada (2.2 mg proteína/mL) obtenida de Gentest™. Los cofactores y sustratos: NADPH ( $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotido fosfato), citocromo C, citocromo C acetilado, así con la enzima superóxido dismutasa (SOD) se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

### 2.1.9.2. Materiales e instrumentación.

Los estudios de voltametría cíclica y de resonancia de espín electrónico (REE) se realizaron durante una estancia predoctoral en el grupo del Dr. Claudio Olea Azar en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (Santiago de Chile), dada su experiencia en ese campo<sup>186 187</sup>. El análisis electroquímico se realizó utilizando un equipo Metrohm 797 VA, pudiendo completar estudios de voltametría cíclica y voltametría de pulso diferencial. Como electrodo auxiliar se utilizó un electrodo de platino, como electrodo de referencia un electrodo de vidrio con diafragma esmerilado de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) y como electrodo de trabajo el electrodo de disco rotatorio de oro. La resonancia de espín electrónico (REE) se realizó en un aparato Bruker ECS 116 Microwave Bridge X-Band con cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo. Para los estudios de voltametría y REE, se prepararon disoluciones 10 mM de los compuestos objeto de estudio en DMSO y tampón fosfato. Los compuestos TBAF (hexafluorofosfato de tetrabutilamonio), TBAP (fosfato de tetrabutilamonio), y TBAB (bromuro de tetrabutilamonio) y DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido) se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Los estudios espectrofotométricos de ultravioleta-visible (UV-VIS) se realizaron utilizando un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800 de alta resolución con controlador de temperatura y carril para seis cubetas (rango de longitud de onda de 190 a 1100 nm y ancho de banda de  $\leq 1.8$  nm).

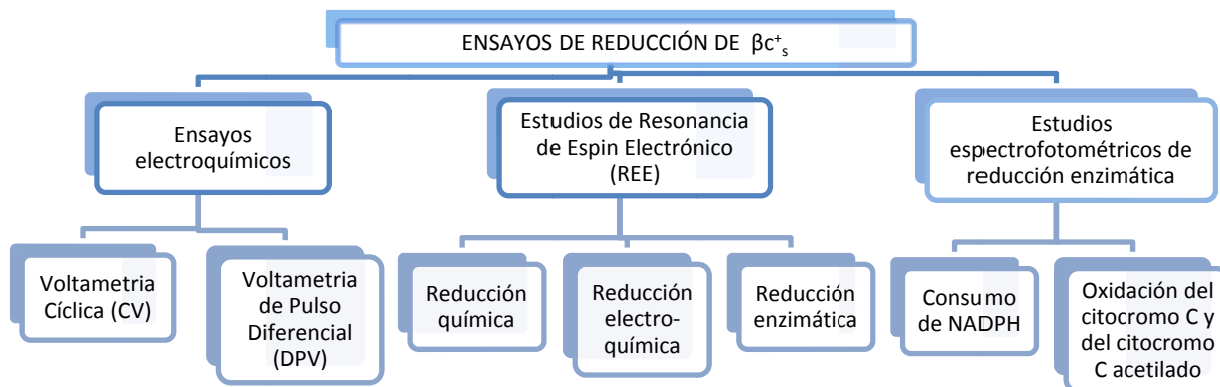
### 2.1.9.3. Procedimientos experimentales.

Se llevaron a cabo estudios de voltametría y de resonancia de espín electrónico (REE) y estudios de reducción enzimática mediante espectrofotometría. Un esquema del protocolo de trabajo se recoge en la **Figura 2.4**.

- a) Estudios voltamétricos y de REE (Resonancia de Espín Electrónico)<sup>187 188</sup>.

El estudio voltamétrico se realizó con los compuestos disueltos en DMSO o en tampón fosfato (pH=7) en concentración de 1 mM. Se utilizó cloruro de tetrabutilamonio como electrolito de soporte para el DMSO y KCl en el tampón fosfato y se realizó un barrido de potencial eléctrico de + 0.5 V hasta -1.5 V<sup>186</sup>. Para los ensayos con REE, se realizaron varios tipos de experiencias: a) reducción química: Los compuestos objeto de estudio (1 mM) disueltos en DMSO se redujeron con un agente reductor (*terc*-butóxido de sodio o ditionito sódico) en atmósfera inerte, registrándose el espectro REE para observar la generación de radicales estables; b) reducción electroquímica: a los compuestos objeto de estudio disueltos en DMSO (1 mM) se les aplicó un potencial electroquímico de reducción similar al observado en las voltametrías cíclicas durante 60 minutos<sup>186</sup>. A continuación se midió la señal REE dejando acumular la señal durante 45 minutos; c) reducción enzimática: a un medio de tampón fosfato 100 mM (pH 7.4), que contenía el catión  $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+$ ) objeto de estudio, MPP<sup>+</sup> o Paraquat (500  $\mu$ M), la enzima NADPH-P450 reductasa (0.15 mg proteína/mL) y la trampa de radicales DMPO (5 mM) (nitrona que capta los radicales libres O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y OH<sup>•</sup>) se le añadió el cofactor NADPH (1 mM) y se incubó 50 minutos en baño a 37°C, registrándose a continuación el espectro REE durante 30 min. Los ensayos

enzimáticos acompañados de medidas de REE con la técnica “spin trapping” como el realizado aquí permiten captar la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>189 190 191 192</sup>.



**Figura 2.4** Esquema general de los ensayos de reducción realizados en este apartado.

#### b) Estudios espectrofotométricos.

Se realizaron estudios espectrofotométricos para determinar el consumo del cofactor NADPH por la enzima reductasa cuando se encuentran en presencia o ausencia de los cationes  $\beta c^+_s$ , cationes piridinio y de las quinonas estudiadas. Estos estudios indican si los compuestos son reducidos enzimáticamente, facilitando a su vez la oxidación del NADPH. En otro tipo de ensayos, se estudió la reducción de la proteína citocromo C por la enzima citocromo P450 reductasa en presencia y en ausencia de los compuestos evaluados y de la enzima superóxido dismutasa (SOD)<sup>193</sup>. En este tipo de ensayos, los resultados indican si el compuesto evaluado genera anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) por reducción enzimática. En otros ensayos se sustituyó el citocromo C por uno acetilado (que no puede ser reducido por la enzima citocromo P450 reductasa y si por  $O_2^{\bullet-}$ ) para comprobar la reducción sólo producida por el anión superóxido generado en el medio<sup>194</sup>. A continuación se describen con detalle los ensayos realizados:

## b.1) Estudios basados en la oxidación del NADPH:

- Reducción con *p*-nitrobenzoato reductasa (pnb)<sup>185</sup>. En cubetas de cuarzo se añadieron: tampón fosfato 50 mM (pH=7.4), el sustrato objeto de estudio (cationes  $\beta\text{c}^+_s$ , menadiona, *p*-benzoquinona o paraquat) (100  $\mu\text{M}$  de concentración, a excepción de la menadiona que fue 50  $\mu\text{M}$ ), y la enzima pnb (5  $\mu\text{g}$  de proteína/mL). Simultáneamente en otra cubeta se añadieron los mismos reactivos excepto el sustrato que se reemplazó por el tampón. En ambas cubetas, la reacción se inició con la adición de NADPH (300  $\mu\text{M}$ ) (volumen final de la mezcla 500  $\mu\text{L}$ ), y se evaluó la oxidación del NADPH midiendo la absorbancia a 340 nm, comparando la cubetas con presencia y ausencia del sustrato. La temperatura del compartimiento de cubetas fue 25 °C; el barrido de longitud de onda fue de 200 a 600 nm y la velocidad de barrido de 2400 nm/min. Para los cálculos del consumo (oxidación) de NADPH se utilizó el  $\epsilon$  (absorbancia 340 nm) del NADPH como 6220  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .
- Reducción con microsomas que contienen la enzima citocromo P450 reductasa. En cubetas de cuarzo se añadieron: tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), el sustrato objeto de estudio (cationes  $\beta\text{c}^+_s$ , menadiona, *p*-benzoquinona o paraquat) (concentración de 100  $\mu\text{M}$ , exceptuando menadiona que fue 50  $\mu\text{M}$ ), y microsomas con la enzima reductasa recombinante (20  $\mu\text{g}$  prot./mL). Simultáneamente, en otra cubeta se añadieron los mismos reactivos menos el sustrato, que se reemplazó por tampón. La reacción se inició con la adición de NADPH (300  $\mu\text{M}$ ) (volumen final de la mezcla 500  $\mu\text{L}$ ), y se midió la absorbancia a 340 nm para determinar la oxidación de NADPH, comparando las cubetas en presencia y en ausencia de sustrato. La temperatura del compartimiento de cubetas fue de 25 °C, el barrido de longitud de onda de 200 a 600 nm y la velocidad de barrido de 2400 nm/min. Para los cálculos del consumo (oxidación) de NADPH se utilizó el coeficiente de extinción molar  $\epsilon$  (absorbancia 340 nm) del NADPH: 6220  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .
- Reducción con la enzima citocromo P450 reductasa humana purificada. En cubetas de cuarzo se añadieron: tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), el sustrato objeto de estudio (cationes  $\beta\text{c}^+_s$ , menadiona, *p*-benzoquinona o paraquat) (concentración de 100  $\mu\text{M}$  exceptuando la menadiona que fue 50  $\mu\text{M}$ ), y la enzima citocromo P450 reductasa (2.5  $\mu\text{g}$  prot./mL). Simultáneamente en otra cubeta se añadieron los mismos reactivos menos el sustrato que se reemplazó por tampón. La reacción se inició con la adición en ambas cubetas de NADPH (300  $\mu\text{M}$ ) (volumen final de la mezcla 500  $\mu\text{L}$ ), y se midió la evolución de la absorbancia a 340 nm con el tiempo, comparando las cubetas en presencia y ausencia del sustrato. La temperatura del compartimiento de cubetas fue de 30 °C, el barrido de longitud de onda de 200 a 600 nm y la velocidad de barrido de 2400 nm/min. Para los cálculos del consumo de NADPH se utilizó el  $\epsilon$  coeficiente de extinción molar a 340 nm del NADPH: 6220  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ <sup>195</sup>.

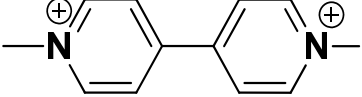
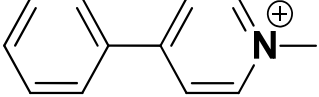
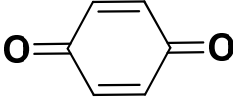
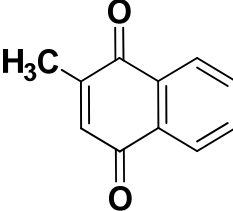
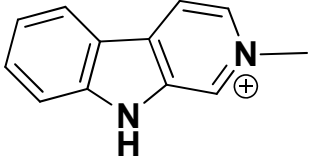
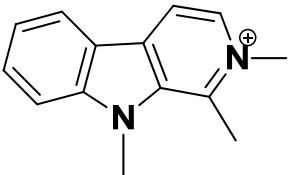
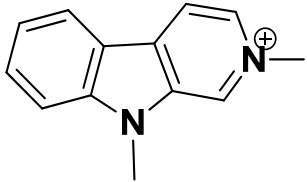
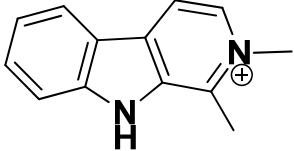
Compuesto	Nombre
	Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio)
	Catión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP <sup>+</sup> )
	1,4-benzoquinona
	Menadiona
	Catión 2-metil-β-carbolinio (2-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup> )
	Catión 1,2,9-trimetil-β-carbolinio (1,2,3-tri-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup> )
	Catión 2,9-dimetil-β-carbolinio (2,9-di-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup> )
	Catión 1,2-dimetil-β-carbolinio (1,2-di-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup> )

Tabla 2.3 Compuestos evaluados en cuanto a su reducción por reductasas.

## b.2) Estudios basados en la reducción del citocromo C y del citocromo C acetilado:

La reducción del citocromo C por reductasas en presencia o ausencia de los compuestos objeto de estudio y de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se utiliza habitualmente como procedimiento para determinar la generación de anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en el medio<sup>194 195</sup>. Es decir, el aumento de la reducción del citocromo C en presencia de los compuestos testados, y la parte que se elimina con la adición de superóxido dismutasa (SOD), indicando esto la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En otro tipo de ensayos, se sustituyó el citocromo C por citocromo C acetilado. Este último no se reduce por la enzima citocromo P450 reductasa y en cambio sí se reduce por el anión superóxido del medio<sup>194</sup>.

- Ensayos de reducción del citocromo C con la enzima citocromo P450 reductasa humana purificada. En cubetas de cuarzo, se añadió tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), el sustrato objeto de estudio (cationes  $\beta c_s^+$ , menadiona, *p*-benzoquinona o paraquat) (500  $\mu$ M), citocromo C (950  $\mu$ g prot./mL), enzima citocromo P450 reductasa humana recombinante purificada (1  $\mu$ g prot./mL), y la enzima SOD (40  $\mu$ g prot./mL). Paralelamente en otra cubeta se añadieron los mismos reactivos exceptuando la enzima SOD. La reacción enzimática se inició tras la adición del NADPH (300  $\mu$ M) (volumen final de la mezcla: 500  $\mu$ L) y se siguió la evolución de la absorbancia a 550 nm (reducción del citocromo C) en el espectrofotómetro durante 10 minutos. La temperatura fue de 30 °C, el barrido espectral fue desde 200 a 600 nm y la velocidad de barrido de 2400 nm/min. Para los cálculos de la reducción del citocromo C, se utilizó  $\epsilon$  a 550 nm de 21  $mM^{-1} cm^{-1}$
- Ensayos de reducción del citocromo C acetilado con la enzima citocromo P450 reductasa humana purificada. En cubetas de cuarzo, se añadió tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), el sustrato objeto de estudio (cationes  $\beta c_s^+$ , menadiona, *p*-benzoquinona o paraquat) (500  $\mu$ M), citocromo C acetilado (950  $\mu$ g prot./mL), enzima citocromo P450 reductasa humana recombinante purificada (1  $\mu$ g prot./mL) y la enzima SOD (40  $\mu$ g prot./mL). Paralelamente en otra cubeta se añadieron los mismos reactivos exceptuando la enzima SOD. Se inició la reacción enzimática tras la adición de NADPH (300  $\mu$ M) (volumen final de la mezcla: 500  $\mu$ L) y se siguió la evolución de la absorbancia a 550 nm (reducción del citocromo C acetilado) en el espectrofotómetro durante 10 minutos. La temperatura fue de 30 °C, el barrido espectral desde 200 a 600 nm y la velocidad de barrido de 2400 nm/min. Para los cálculos de la reducción del citocromo C acetilado a 550 nm se utilizó  $\epsilon$  de 21  $mM^{-1} cm^{-1}$ .

## 2.2. Inhibición del citocromo P450 por $\beta$ -carbolinas y sustancias antioxidantes.

### 2.2.1. Enzimas, reactivos y compuestos químicos utilizados.

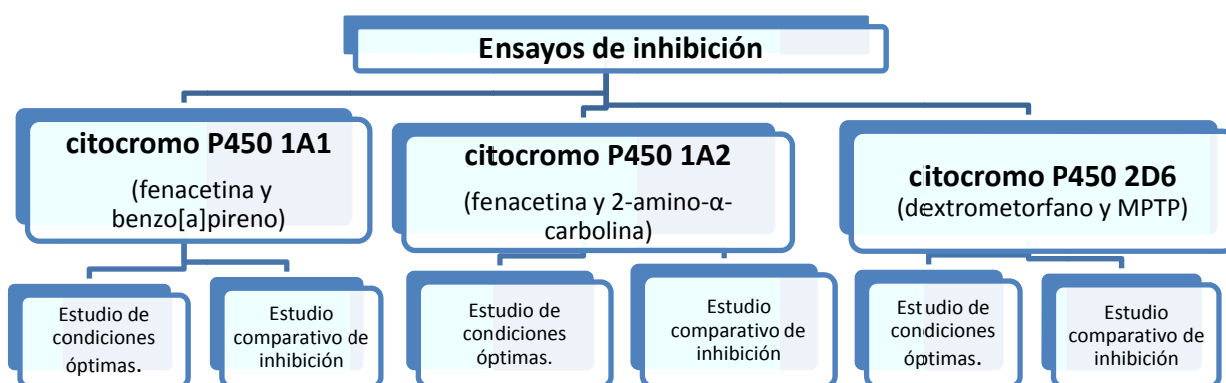
Se utilizaron reactivos y compuestos de procedencia comercial: quinidina,  $\alpha$ -naftoflavona, kaempferol, melatonina, apigenina, elipticina, galangina, resveratrol, genisteina, quercetina, norharmano, harmano, harmina, 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolina (th $\beta$ c o triptolina), 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (PTP), fenacetina, benzo[*a*]pireno (B[*a*]P), dextrometorfano, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), y paracetamol se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El compuesto 2-amino- $\alpha$ -carbolina (A $\alpha$ C) se obtuvo de Toronto Research (Ontario, Canadá). El dextrorfano se obtuvo a partir de dextrometorfano mediante hidrólisis con ácido bromhídrico 48%, y posterior recristalización<sup>196</sup>. Las disoluciones de los compuestos se prepararon en agua; agua ligeramente ácida o con un porcentaje mínimo de DMSO cuando fue necesario para su solubilidad, comprobándose que no interfería en la actividad enzimática. En la **Tabla 2.5** y la **Tabla 2.6** se recogen los compuestos utilizados como sustratos e inhibidores enzimáticos, respectivamente. Las enzimas citocromo P450 humanas recombinantes 1A1, 1A2 y 2D6\*1 así como los microsomas hepáticos humanos se obtuvieron de BD Gentest (Woburn, MA, USA) y fueron similares a las del apartado anterior. El cofactor NADPH se obtuvo de Sigma-Aldrich.

### 2.2.2 Ensayos de inhibición del citocromo P450.

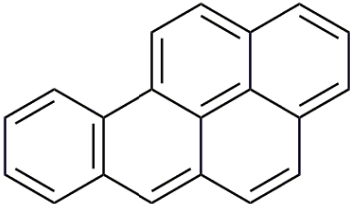

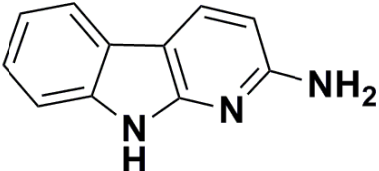
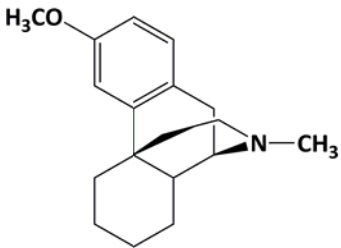
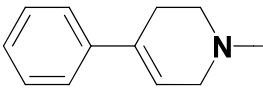
Se estudió la inhibición de los citocromos P450 1A1, P450 1A2 y P450 2D6 por  $\beta$ c<sub>s</sub> y th $\beta$ c<sub>s</sub> y se comparó con la inhibición por sustancias antioxidantes de naturaleza indólica (melatonina, elipticina) y fenólica (flavonoides y resveratrol). Con este fin se utilizaron distintos sustratos de los citocromos señalados entre los que se incluyen: compuestos tóxicos como el MPTP y mutagénicos como son el hidrocarburo policíclico aromático benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) y la amina heterocíclica aromática 2-amino- $\alpha$ -carbolina (A $\alpha$ C), y fármacos como la fenacetina y el dextrometorfano. En la **Tabla 2.4** se recogen las enzimas utilizadas, sus sustratos y los metabolitos correspondientes. La **Figura 2.5** resume los procedimientos experimentales realizados. En un primer paso, se realizaron estudios para encontrar las condiciones óptimas de biotransformación en los que se establecieron la cantidad de enzima adecuada y los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  a partir de las curvas de Michaelis-Menten. Posteriormente se realizaron ensayos de inhibición en distintas concentraciones del inhibidor para obtener valores de  $IC_{50}$  y las constantes  $K_i$  para aquellos inhibidores más relevantes.

Enzimas citocromo P450	Sustratos	Metabolito determinado en los estudios de inhibición
<b>1A1</b>	fenacetina	paracetamol
	benzo[ <i>a</i> ]pireno	3-OH-benzo[ <i>a</i> ]pireno
<b>1A2</b>	fenacetina	paracetamol
	2-amino- $\alpha$ -carbolina	2-hidroxiamino- $\alpha$ -carbolina
<b>2D6</b>	dextrometorfano	dextrorfano
	MPTP	MPTP-OH, PTP

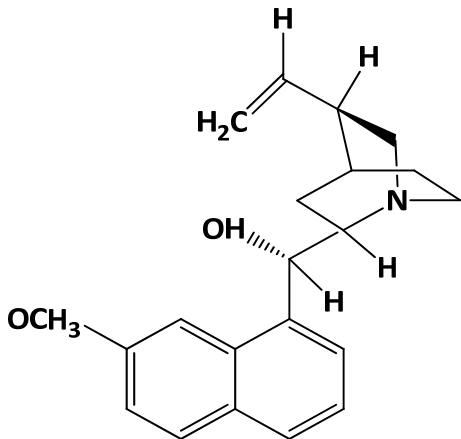
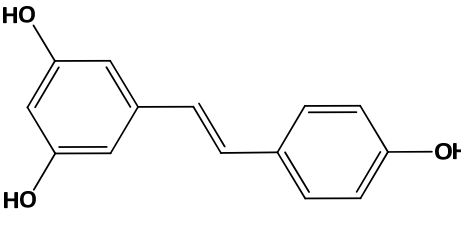
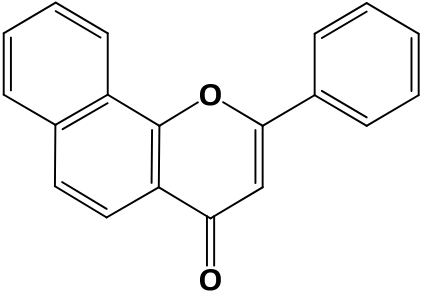
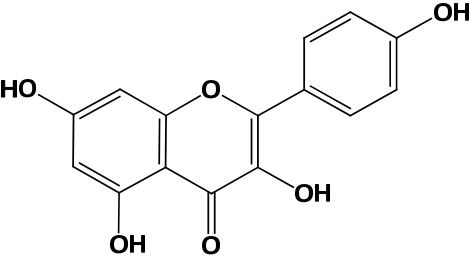
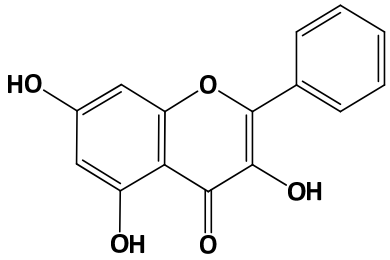
**Tabla 2.4** Enzimas, sustratos y metabolitos.

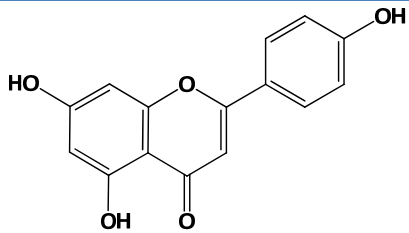
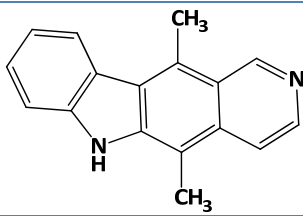
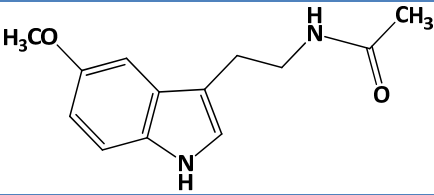
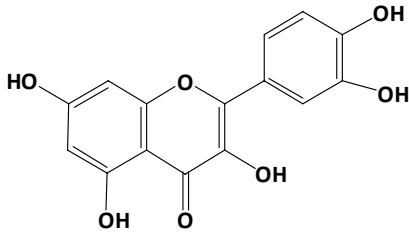
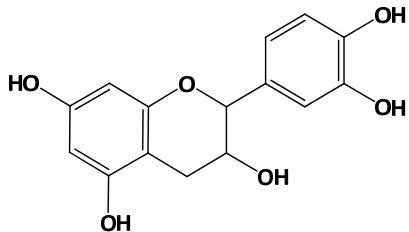
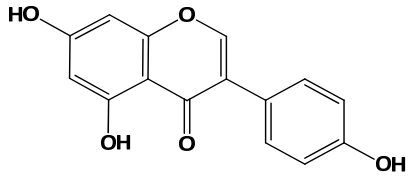
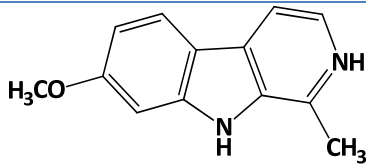
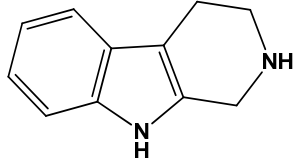


**Figura 2.5** Esquema de trabajo utilizado en los ensayos de inhibición con  $\beta$ -carbolinas y antioxidantes.

Compuesto	Nombre
	<b>benzo[a]pireno</b>
	<b>fenacetina</b>
	<b>2-amino-α-carbolina (AαC)</b>
	<b>dextrometorfano</b>
	<b>1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)</b>

**Tabla 2.5** Sustratos utilizados en los ensayos de inhibición enzimática de los citocromos P450.

Compuesto	Nombre
 <p>The structure shows a quinoline ring system with a methoxy group (OCH<sub>3</sub>) at the 8-position. Attached to the 6-position is a quinuclidine ring system. The quinuclidine ring has a vinyl group (H<sub>2</sub>C=CH-) at the 8-position and a hydroxyl group (OH) at the 4-position. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	quinidina
 <p>The structure consists of two phenolic rings connected by a trans-stilbenoid double bond. The left ring has hydroxyl groups (HO) at the 3 and 4 positions. The right ring has a hydroxyl group (HO) at the 4 position.</p>	resveratrol
 <p>The structure features a naphthalene ring system fused to a flavone core. The flavone core has a benzene ring attached at the 2-position and a carbonyl group (C=O) at the 4-position.</p>	$\alpha$ -naftoflavona
 <p>The structure is a flavone with a naphthalene ring system at the 6-position. It has hydroxyl groups (HO) at the 3, 5, and 7 positions on the naphthalene ring, and a hydroxyl group (OH) at the 3-position on the flavone core. A benzene ring is attached at the 2-position.</p>	kaempferol
 <p>The structure is a flavone with a naphthalene ring system at the 6-position. It has hydroxyl groups (HO) at the 3 and 5 positions on the naphthalene ring, and hydroxyl groups (OH) at the 3 and 7 positions on the flavone core. A benzene ring is attached at the 2-position.</p>	galangina

Compuesto	Nombre
	apigenina
	elipticina
	melatonina
	quercetina
	(+)-catequina
	genisteina
	harmina
	thβc (triptolina)

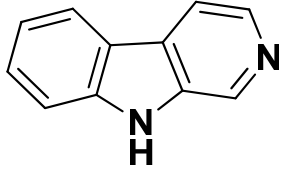
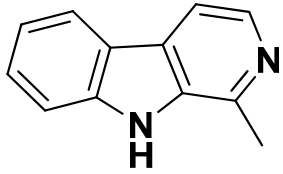
Compuesto	Nombre
	$\beta$ -carbolina (norharmano)
	1-metil- $\beta$ -carbolina (harmano)

Tabla 2.6 Compuestos estudiados como inhibidores en los ensayos de inhibición enzimática de citocromos P450.

### 2.2.2.1. Inhibición de los citocromos P450 de la subfamilia 1A (P450 1A1 y 1A2).

Para estudiar la inhibición de los citocromos P450 1A1 y 1A2 se utilizaron varios sustratos para cada enzima. Las reacciones modelo y los metabolitos producidos se recogen en la **Figura 2.6**.

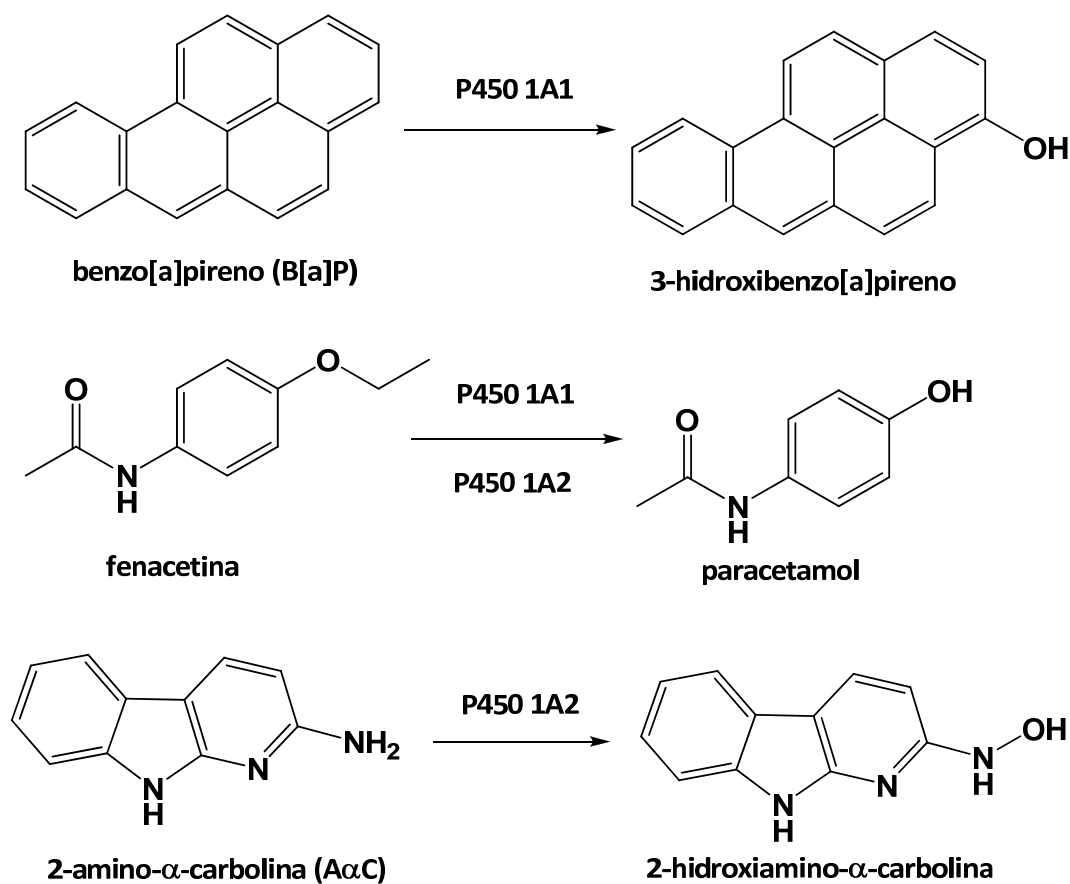


Figura 2.6 Reacciones de metabolización utilizadas para evaluar la inhibición de los citocromos P450 1A1 y P450 1A2<sup>131 162 197 183</sup>.

a) Ensayos con los citocromos P450 1A1 y 1A2/fenacetina.

Se prepararon ensayos en tubos eppendorf con un volumen final de 0.2 mL, que contenía: tampón fosfato 100 mM (pH=7.4), el inhibidor objeto de estudio en concentración variable (rango de 0-100  $\mu$ M), fenacetina (250  $\mu$ M) y la enzima citocromo P450 1A1 o 1A2 (25 pmoles cit. P450/mL). Se preincubaron durante 3 minutos en un baño de agua a 37°C y la reacción de biotransformación metabólica se inició tras la adición de NADPH (1 mM). Los medios se incubaron a 37 °C en baño durante 25 minutos y se paró la reacción con 50  $\mu$ L de acetonitrilo. A continuación se centrifugaron a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos. Las muestras se inyectaron en HPLC-DAD-FLD y HPLC-MS para determinar el paracetamol (absorbancia a 243 nm) formado en los ensayos (véase **Figura 2.6**). Los ensayos se realizaron como mínimo en duplicado, e incluyeron controles sin NADPH y sin enzima o sobre la influencia del medio (ej. DMSO).

b) Ensayos con los citocromos P450 1A1 y 1A2 /benzo[a]pireno.

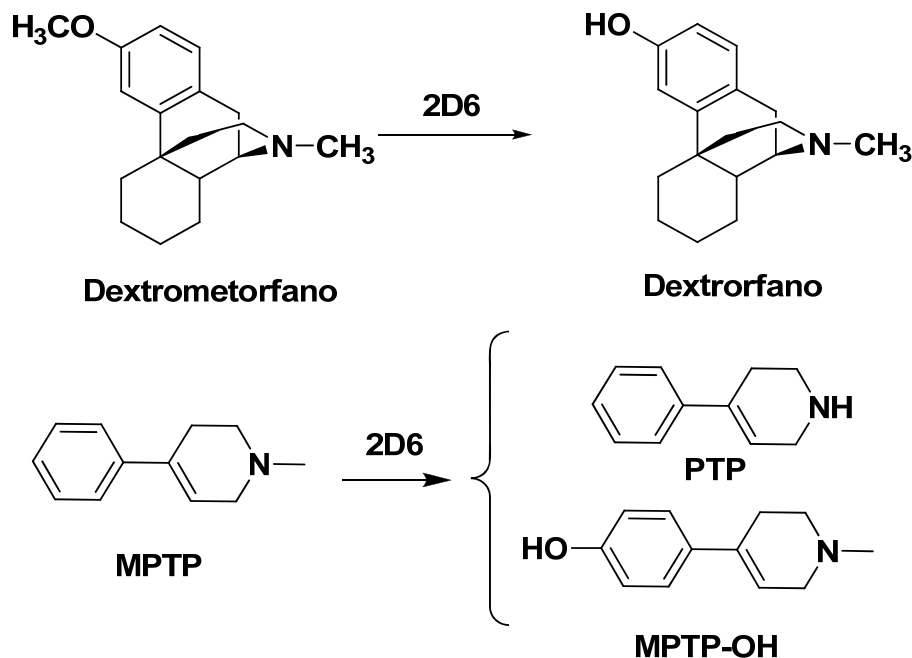
Se prepararon ensayos en tubos eppendorf con un volumen final de 0.2 mL, que contenía: tampón fosfato 100 mM (pH=7.4), inhibidor en concentración variable (rango de 0-100  $\mu$ M), benzo[a]pireno disuelto en DMSO (50  $\mu$ M) y la enzima citocromo P450 1A1 o 1A2 (25 pmoles cit. P450/mL). Se preincubaron durante 3 minutos en un baño de agua a 37°C y la reacción de biotransformación metabólica se inició tras la adición de NADPH (1 mM). Los medios se incubaron a 37 °C en baño durante 25 minutos y se paró la reacción con 100  $\mu$ L de acetonitrilo. A continuación se centrifugaron a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos. Las muestras se inyectaron en HPLC-DAD-FLD y HPLC-MS en el mismo día para determinar los metabolitos del benzo[a]pireno (absorbancia a 265 nm). Los ensayos se realizaron como mínimo en duplicado e incluyeron los correspondientes controles sin NADPH y sin enzima o sobre la influencia del disolvente utilizado (ej. DMSO).

c) Ensayos con los citocromos P450 1A1 o 1A2 /2-amino- $\alpha$ -carbolina.

Se prepararon ensayos en tubos eppendorf con un volumen final de 0.2 mL, que contenía: tampón fosfato 100 mM (pH=7.4), inhibidor en concentración variable (rango de 0-100  $\mu$ M), 2-amino- $\alpha$ -carbolina (50  $\mu$ M) y la enzima citocromo P450 1A1 o 1A2 (25 pmoles cit. P450/mL). Se preincubaron durante 3 min en un baño de agua a 37°C y la reacción de biotransformación metabólica se inició tras la adición de NADPH (1 mM). Los medios se incubaron a 37 °C en baño durante 25 minutos y se paró la reacción con 50  $\mu$ L de HClO<sub>4</sub>-metanol (1:1). A continuación se centrifugaron a 10000 rpm (8000g) durante 10 minutos. Las muestras se mantuvieron en congelador hasta su inyección en HPLC-DAD-FLD y HPLC-MS para determinar los metabolitos del 2-amino- $\alpha$ -carbolina (absorbancia a 355 nm y 230 nm). Los ensayos se realizaron como mínimo en duplicado e incluyeron los correspondientes controles sin NADPH y sin enzima o sobre la influencia de los disolventes utilizados (ej. DMSO).

### 2.2.2.2. Inhibición del citocromo P450 2D6.

La actividad de las  $\beta$ -carbolinas como inhibidores del citocromo P450 2D6 se estudió utilizando dos modelos experimentales de metabolización: el fármaco dextrometorfano y la neurotoxina MPTP (véase **Figura 2.7**).



**Figura 2.7** Reacciones de biotransformación metabólica utilizadas para evaluar la inhibición del citocromo P450 2D6 <sup>123 183</sup>. La metabolización del MPTP por el citocromo P450 2D6 se describe en el apartado correspondiente de resultados.

#### a) Ensayos con el citocromo P450 2D6 /dextrometorfano.

Se prepararon ensayos en tubos eppendorf con un volumen final de 0.2 mL, que contenía: tampón fosfato 100 mM (pH=7.4), inhibidor en concentración variable (intervalo de 0-250  $\mu$ M), dextrometorfano (5  $\mu$ M) y la enzima citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL), y se precalentaron durante 3 min en un baño de agua a 37°C. La reacción de biotransformación metabólica se inició tras la adición de NADPH (1 mM). Los medios se incubaron a 37 °C en baño durante 25 minutos y se paró la reacción con 50  $\mu$ L de una disolución de ácido perclórico-metanol (1:1). A continuación se centrifugó a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos. Las muestras se inyectaron en HPLC-DAD-FLD y HPLC-MS para determinar el metabolito dextrorfan (absorbancia a 280 nm y fluorescencia con excitación: 280 nm y emisión: 312 nm). Los ensayos se realizaron como mínimo en duplicado e incluyeron controles sin NADPH, sin enzima o sobre la influencia del medio (ej. DMSO).

Para saber el tipo de inhibición, se realizaron ensayos a distintas concentraciones del sustrato dextrometorfano (rango de 0-20  $\mu$ M) y del inhibidor norharmano (0,5 y 20  $\mu$ M), y se construyeron curvas de Michaelis-Menten y gráficas de Lineweaver-Burk (dobles inversas de velocidad y concentración de sustrato), cuyas pendientes se utilizaron para calcular los valores de la constante de inhibición ( $K_i$ ).

## b) Ensayos con microsomas hepáticos /dextrometorfano

Se prepararon ensayos en tubos eppendorf con un volumen final de 0.2 mL, que contenía: tampón fosfato 100 mM (pH=7.4), inhibidor en concentración variable (rango de 0-250  $\mu$ M), dextrometorfano (5  $\mu$ M) y microsomas hepáticos humanos (180 pmoles cit. P450/mL), y se precalentaron durante 3 min en un baño de agua a 37°C. La reacción de biotransformación metabólica se inició tras la adición de NADPH (1 mM). Los medios se incubaron a 37 °C durante 25 minutos y se paró la reacción con la adición de 50  $\mu$ L de una disolución de ácido perclórico-metanol (1:1). A continuación se centrifugaron a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos. Las muestras se inyectaron en HPLC-DAD-FLD y HPLC-MS para determinar el metabolito dextrorfano. Los ensayos se realizaron como mínimo en duplicado e incluyeron controles sin NADPH, sin microsomas o sobre la influencia del medio (ej. DMSO).

Para determinar el tipo de inhibición, se realizaron ensayos a distintas concentraciones del sustrato dextrometorfano (rango de 0-10  $\mu$ M) y del inhibidor norharmano (0, 0,8  $\mu$ M y 1,6  $\mu$ M), y se construyeron curvas de Michaelis-Menten y gráficas de Lineweaver-Burk, cuyas pendientes se utilizaron para calcular los valores de  $K_i$ .

## c) Ensayos con el citocromo P450 2D6 /MPTP.

Se prepararon ensayos en tubos eppendorf con un volumen final de 0.2 mL, que contenía: tampón fosfato 100 mM (pH=7.4), inhibidor en concentración variable (rango de 0-250  $\mu$ M), MPTP (100  $\mu$ M) y citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL), y se precalentaron durante 3 minutos en un baño de agua a 37°C. La reacción de biotransformación metabólica se inició tras la adición de NADPH (1 mM). Los medios se incubaron a 37 °C en baño durante 25 minutos y se paró la reacción con 50  $\mu$ l de ácido perclórico-metanol (1:1). A continuación se centrifugaron a 10000 rpm (8000 g) durante 10 minutos. Las muestras se inyectaron en HPLC-DAD-FLD y HPLC-MS para determinar los metabolitos PTP y MPTP-OH (detección a 243 y 254 nm). Los ensayos se realizaron como mínimo en duplicado e incluyeron controles sin NADPH, sin enzima o sobre la influencia del medio (ej. DMSO).

Para determinar el tipo de inhibición se realizaron ensayos a distintas concentraciones de MPTP (rango de 0-250  $\mu$ M) y del inhibidor norharmano (0, 7 y 15  $\mu$ M), y se construyeron curvas de Michaelis-Menten y gráficas de Lineweaver-Burk, cuyas pendientes se utilizaron para calcular los valores de  $K_i$ .

### 2.2.3. Análisis cromatográfico por RP-HPLC-DAD y FLD.

Los ensayos de los estudios de inhibición se analizaron por RP-HPLC con detección de UV-DAD y fluorescencia. Se utilizó un aparato de HPLC Hewlett Packard de la serie 1050 con bomba cuaternaria e inyección manual acoplado a un detector DAD serie 1100 y a un detector de fluorescencia (FLD) 1046 (Agilent).

Para los ensayos con fenacetina, benzo[*a*]pireno, MPTP y dextrometorfano, la separación cromatográfica se realizó en una columna Novapak C<sub>18</sub> (3.9 x 150 mm, 4 µm) (Waters). Como eluyente A se utilizó tampón fosfato amónico 50 mM, pH=3.00 y como eluyente B: 20% del eluyente A en acetonitrilo. El flujo fue de 1 mL/min, la temperatura de 40°C y el volumen de inyección de 20 µL. Dependiendo de los ensayos, se utilizaron dos gradientes distintos:

- 1) Gradiente programado desde 100% de A (0% B) hasta 32% de B en 8 minutos alcanzando el 90 % de B a los 18 minutos (ensayos con fenacetina, dextrometorfano, o MPTP).
- 2) Gradiente programado desde 50% B a 100% B en 10 minutos (ensayos con benzo[*a*]pireno).

Para los ensayos de 2-amino- $\alpha$ -carbolina la separación cromatográfica se realizó usando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 X 150 mm, 5 µm) (Agilent). Como eluyente A se utilizó tampón fosfato amónico 50 mM, pH=3.00 y como eluyente B, 20% del eluyente A en acetonitrilo. Se utilizó un gradiente programado desde 100 % de A (0 % B) hasta 50 % de B en 16 min alcanzando el 90 % de B a los 18 minutos. El flujo fue de 1 mL/min, la temperatura de 40°C y el volumen de inyección de 20 µL.

La detección cromatográfica se realizó mediante DAD, adquiriendo los espectros correspondientes y registrando los cromatogramas a distintas longitudes de onda (243, 254, 265, 280 y 355 nm), y por fluorescencia. Los metabolitos se identificaron mediante los correspondientes espectros UV-VIS de los picos cromatográficos, coelución con estándares y por comparación con datos de la literatura. A continuación los datos se confirmaron utilizando un sistema de HPLC-acoplado a espectrometría de masas (véase condiciones en el apartado siguiente). Los compuestos analizados fueron: paracetamol en los ensayos con fenacetina como sustrato que se determinó a 243 nm; 3-hidroxibenzo[*a*]pireno (3-OH-B[*a*]P) y otros metabolitos del benzo[*a*]pireno determinados a 265 y 380 nm, 2-hidroxiamino- $\alpha$ -carbolina (2-NHOH $\alpha$ C) y otros metabolitos de hidroxilación de 2-amino- $\alpha$ -carbolina que se determinaron a 230 y 355 nm; dextrorfano producido en el metabolismo de dextrometorfano que se determinó a 280 nm y por fluorescencia a 280 nm de excitación y 312 nm de emisión; PTP y MPTP-OH (producidos durante el metabolismo de MPTP) se determinaron a 243 y 254 nm, respectivamente. La concentración de los metabolitos se determinó mediante las rectas de calibrado de los correspondientes estándares en un rango de concentración de 0 a 20 µM obtenidos en las mismas condiciones de los ensayos enzimáticos. Los datos cuantitativos se dan como velocidad (v) de formación de producto en el medio en función de la concentración de enzima utilizada (pmoles de producto generado/minuto y pmoles de cit. P450).

#### 2.2.4. Análisis por RP-HPLC-DAD-MS.

Los ensayos de inhibición se analizaron por RP-HPLC-DAD acoplada a un detector de espectrometría de masas (RP-HPLC-MS). Para ello se utilizaron dos equipos distintos: a) un cromatógrafo RP-HPLC-MS de la serie 1100 (Hewlett Packard) con un detector de DAD y un analizador de masas cuadrupolo equipado con un inyector automático y b) un cromatógrafo HPLC 1200-detector cuadrupolo de masas 6110 (Agilent). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna Zorbax SB-C<sub>18</sub> (2.1 x 150 mm, 5 µm) (Agilent) con un flujo de 0.25 mL /min y una temperatura de 40°C. Para la elución cromatográfica se utilizó como eluyente A: ácido fórmico (0.1 %) y como eluyente B: ácido fórmico (0.1 %) en acetonitrilo. Se utilizaron dos programas distintos: a) 100% de A (0 % B) inicial alcanzando 60% B en 15 minutos para los metabolitos de 2-amino- $\alpha$ -carbolina, del MPTP y del dextrometorfano; b) 40 % B (inicial) hasta 100 % B en 10 minutos en el caso de los metabolitos del benzo[a]pireno. El detector de masas trabajó en ionización de electrospray (ESI) en modo positivo y negativo. La temperatura del gas de secado fue de 350 °C con un flujo de 10 L/min, siendo la presión del nebulizador de 40 psi y el voltaje del capilar 4000 V. El voltaje de fragmentación utilizado en el espectrómetro de masas varió desde 60 a 200 V dependiendo de los compuestos a analizar, y el rango de masa fue de 50-600 u. La identidad de los picos cromatográficos se estableció mediante los espectros de masas obtenidos, y la fragmentación a distintos voltajes, así como por coelución con los correspondientes estándares.

#### 2.2.5. Cálculo de parámetros cinéticos $V_{max}$ , $K_m$ , $IC_{50}$ y $K_i$

Los resultados de velocidad ( $v$ ) de formación de metabolitos en función del tiempo de incubación y de la concentración de enzima (pmoles de metabolito/min pmol P450) se representaron en función de la concentración de sustrato y se ajustaron a cinéticas de Michaelis-Menten, calculándose los parámetros de  $V_{max}$  y de  $K_m$ . En los ensayos realizados en presencia de inhibidores se calcularon los porcentajes (%) de inhibición en función de la concentración de inhibidor que permitieron calcular los valores de  $IC_{50}$  (concentración de inhibidor necesaria para conseguir una inhibición de la biotransformación del 50 % o concentración de inhibidor a la cual la velocidad de reacción disminuye a la mitad). Los estudios realizados a diferente concentración de sustrato e inhibidor se ajustaron a una regresión lineal, representando las inversas de la velocidad de formación de los metabolitos frente a la inversa de la concentración del sustrato (gráficas de Lineweaver-Burk), y a partir de las pendientes se calcularon los valores de constantes de inhibición  $K_i$ . Asimismo, para aquellos inhibidores que se consideran inhibidores de tipo competitivo, se aplicó la ecuación de Cheng-Prusoff<sup>198</sup> ( $IC_{50} = K_i (1 + S/K_m)$ ), que permite calcular los valores de  $K_i$  desde la concentración de sustrato  $S$  y la  $K_m$  e  $IC_{50}$ , determinadas previamente. Para los cálculos, para los ajustes y las representaciones gráficas se utilizó el programa GraphPad Prism 4.0 (San Diego, California. USA).





# *Resultados*



### 3. Resultados.

#### 3.1. Biotransformación metabólica de $\beta$ -carbolinas y sus análogos funcionales.

##### 3.1.1. Tetrahydro- $\beta$ -carbolinas (th $\beta$ c<sub>s</sub>).

Las th $\beta$ c<sub>s</sub> (véase la **Figura 3.1**) son alcaloides con estructura de tetrahidropiridoindol identificados inicialmente en plantas y que más recientemente se han encontrado también en muchos alimentos y en muestras biológicas. Son compuestos con actividad biológica por su interacción con receptores y enzimas del Sistema Nervioso Central (SNC), y por su acción antioxidante. En el ámbito toxicológico, las th $\beta$ c<sub>s</sub> se han postulado como precursores de neurotoxinas debido a su analogía estructural con la neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) y por la formación a partir de ellas de cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta$ c<sup>+</sup>), funcionalmente parecidos a la neurotoxina, 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>). Aunque se considera que las th $\beta$ c<sub>s</sub> podrían activarse o desactivarse por enzimas metabólicos (biotransformación), hasta ahora, se conoce muy poco al respecto. Sabemos que las enzimas monoaminooxidasa (MAO-A o -B) responsables de la activación (oxidación) del MPTP no metabolizan (activan) las th $\beta$ c<sub>s</sub><sup>79 108</sup>. Sin embargo, poco se conoce sobre la posible participación de otras oxidoreductasas como los citocromos P450 o las enzimas peroxidasa<sup>108 199</sup>. En este capítulo se estudió la biotransformación de th $\beta$ c<sub>s</sub> por enzimas del sistema citocromo P450.

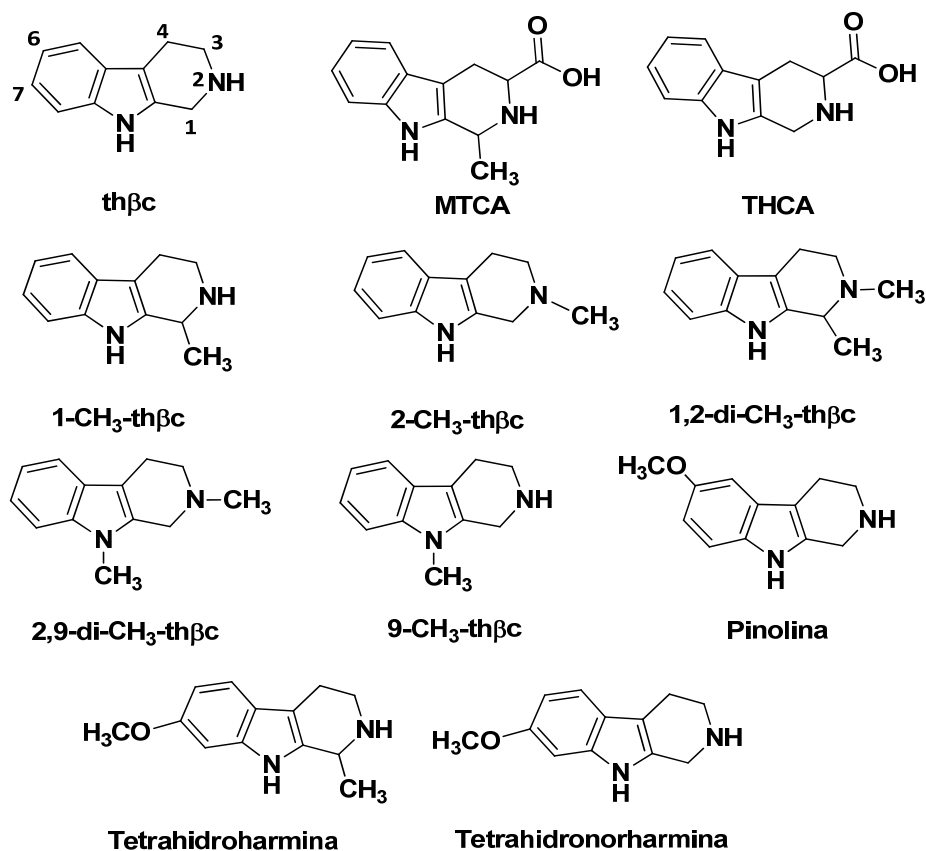


Figura 3.1 Estructuras de las th $\beta$ c<sub>s</sub> estudiadas.

### 3.1.1.1. Biotransformación de th $\beta$ c<sub>s</sub> por citocromos P450.

Se realizó un crivado inicial incubando por separado cada una de las th $\beta$ c<sub>s</sub> con enzimas citocromo P450 (1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) y tras el análisis correspondiente y dependiendo de la enzima implicada (que fue principalmente el citocromo P450 2D6; véase más adelante), se detectaron dos metabolitos de hidroxilación aromática que fueron identificados por HPLC-MS (ionización por electrospray), DAD (UV/VIS), fluorescencia y por coelución con estándares, como los correspondientes 6-hidroxiderivado y 7-hidroxiderivado (véase **Tabla 3.1**, así como la **Figura 3.2** y la **Figura 3.3**, donde se muestran los cromatogramas y los espectros correspondientes a th $\beta$ c y a 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c, respectivamente). En HPLC-MS, tanto las th $\beta$ c<sub>s</sub> como sus metabolitos respectivos proporcionaron un ion molecular protonado (M+H)<sup>+</sup> intenso y una pérdida de masa característica de 29 u (th $\beta$ c) o de 43 u (2-metilderivados), que aumentaba con el incremento del voltaje de fragmentación del espectrómetro de masas y que corresponde a la fragmentación retro-Diels-Alder (**Figura 3.4** y **Figura 3.5**) en el anillo de tetrahidropiridina (por ej. el compuesto th $\beta$ c dio lugar a  $m/z=189$  (M+H)<sup>+</sup> y  $m/z=160$ , véase **Tabla 3.1** y **Figura 3.4**). Además de los compuestos hidroxilados señalados, en las 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c<sub>s</sub> se detectó la formación de los correspondientes th $\beta$ c<sub>s</sub> (*N*-desmetilación) (con los citocromos P450 2C19 y 1A2, véase más adelante) y de los compuestos de deshidrogenación aromática 2-metil-3,4-dihidro- $\beta$ -carbolinio (2-CH<sub>3</sub>-3,4-dh $\beta$ c<sup>+</sup>) (citocromos P450 1A2, 1A1 y 3A4) (**Figura 3.5**).

Las th $\beta$ c<sub>s</sub> con un sustituyente metoxilo como pinolina (6-metoxi-th $\beta$ c), tetrahydroharmina (7-metoxi-1-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c) o tetrahidronorharmina (7-metoxi-th $\beta$ c) proporcionaron los correspondientes compuestos *O*-desmetilados (hidroxi-th $\beta$ c<sub>s</sub>) (véase **Tabla 3.1** y **Figura 3.5**) con participación del citocromo P450 2D6 (véase más adelante). En cambio, los ácidos 1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico (THCA) y 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico (MTCA) no dieron lugar a ningún metabolito destacable en los medios de incubación. De ello, podemos deducir que el THCA y el MTCA no sufren metabolización por citocromos P450.

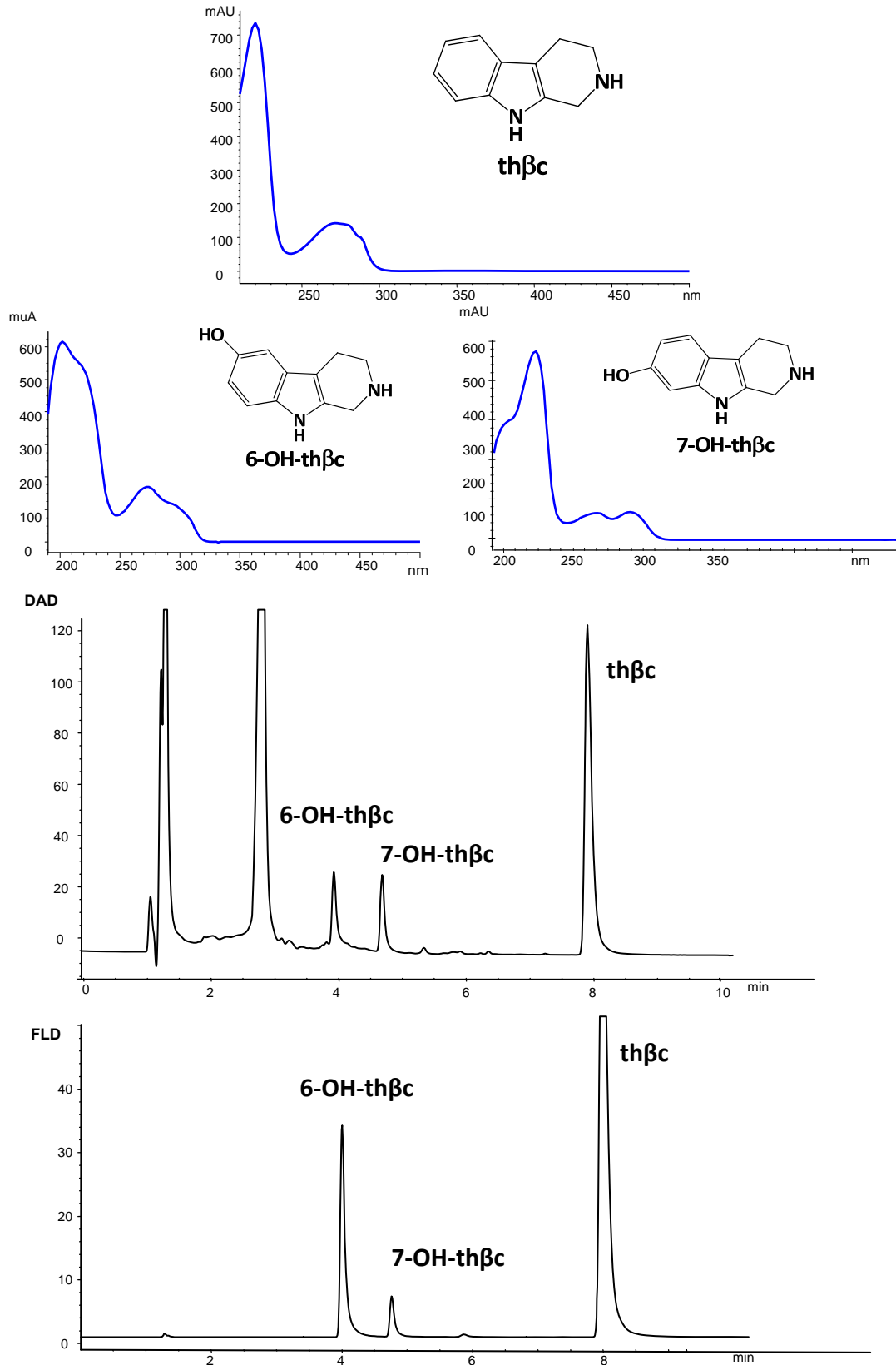
A continuación, se determinó el perfil metabólico producido en los medios de biotransformación (**Figuras 3.6 a 3.10**). En la **Figura 3.6** se recogen los datos para th $\beta$ c y 1-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c. La formación de los metabolitos de hidroxilación aromática de th $\beta$ c y 1-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c (es decir 6-OH y 7-OH derivados) se produjo en concentraciones similares, principalmente por el citocromo P450 2D6 y en mucha menor proporción por el 1A2. No se detectaron metabolitos correspondientes a la deshidrogenación del anillo de tetrahidropiridina en estas th $\beta$ c<sub>s</sub>. Entre los compuestos *N*(2)-metilados (**Figuras 3.7-3.9**) se observó la formación de los compuestos de hidroxilación aromática en posición C-6 y C-7 (es decir, 6-OH-2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c y 7-OH-2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c para el caso de 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c), principalmente por el citocromo P450 2D6 y en mucha menor proporción por 1A2 y 1A1. Una característica singular del 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c fue la formación de dos nuevos metabolitos correspondientes a una reacción de *N*-desmetilación para dar la th $\beta$ c, catalizada por el citocromo P450 2C19 y en menor proporción por 1A1 y 1A2, y a una reacción de deshidrogenación del anillo de tetrahidropiridina llevada a cabo por los citocromos P450 1A1 y 1A2, dando como producto el catión 2-metil-3,4-dihidro- $\beta$ -carbolinio (2-CH<sub>3</sub>-3,4-dh $\beta$ c<sup>+</sup>) (**Figuras 3.5 y 3.7**).

Sustrato <sup>2</sup>	Metabolitos <sup>2</sup>				
	tr (min)	<i>m/z</i> (%) <sup>1</sup> - ESI (70 V)-			Metabolito
		(M+H) <sup>+</sup>	Fragmentación de retro Diels-Alder		
<b>thβc</b> tr 9.7 min MS ( <i>m/z</i> ) (ESI): 173 (100 %), 144 (40 %)	5.5	189 (100 %)	160 (30 %)		6-OH-thβc
	6.5	189 (100 %)	160 (40 %)		7-OH-thβc
<b>1-CH<sub>3</sub>-thβc</b> tr 10.5 min MS ( <i>m/z</i> ) (ESI): 187 (100 %), 170 (15 %), 158 (10 %)	6.4	203 (100 %)	174 (10 %),	186 (15 %)	6-OH-1-CH <sub>3</sub> -thβc
	7.3	203 (100 %)	174 (20 %)	186 (10 %)	7-OH-1-CH <sub>3</sub> -thβc
<b>2-CH<sub>3</sub>-thβc</b> tr 10.3 min MS ( <i>m/z</i> ) (ESI): 187 (100 %), 144 (40 %)	5.9	203 (100 %)	160 (40 %)		6-OH-2-CH <sub>3</sub> -thβc
	6.9	203 (100 %)	160 (60 %)		7-OH-2-CH <sub>3</sub> -thβc
<b>2,9-di-CH<sub>3</sub>-thβc</b> tr 11.9 min MS ( <i>m/z</i> ) (ESI): 201 (100 %), 158 (45 %)	7.77	217 (100 %)	174 (40 %)		6-OH-2,9-di-CH <sub>3</sub> -thβc
	7.94	217 (100 %)	174 (70 %)		OH-2,9-di-CH <sub>3</sub> -thβc
<b>1,2-di-CH<sub>3</sub>-thβc</b> tr 11.0 min MS ( <i>m/z</i> ) (ESI): 201 (100 %), 158 (25 %)	7.07	217 (100 %)	174 (20 %)		6-OH-1,2-di-CH <sub>3</sub> -thβc
	7.9	217 (100 %)	174 (30 %)		7-OH-1,2-di-CH <sub>3</sub> -thβc
<b>9-CH<sub>3</sub>-thβc</b> tr 11.8 min MS ( <i>m/z</i> ) (ESI): 187 (100 %), 158 (40 %)	7.4	203 (100 %)	174 (25 %)		6-OH-9-CH <sub>3</sub> -thβc
	7.5	203 (100 %)	174 (45 %)		OH-9-CH <sub>3</sub> -thβc
<b>Pinolina (6-metoxi-thβc)</b> tr 9.9 min MS ( <i>m/z</i> ) (ESI): 203 (100 %), 174 (35 %)	5.4	189 (100 %)	160 (30 %)		6-OH-thβc
<b>Tetrahidroharmina</b> tr 10.7 min.; MS ( <i>m/z</i> ) (ESI): 217 (100 %), 188 (35 %), 200 (25 %)	7.3	203 (100 %)	174 (35 %)	186 (20 %)	7-OH-1-Me-thβc
<b>Tetrahidronorharmina</b> tr 9.8 min.; MS ( <i>m/z</i> ) (ESI): 203 (100 %), 174 (55 %)	6.5	189 (100 %)	160 (40 %)		7-OH-thβc

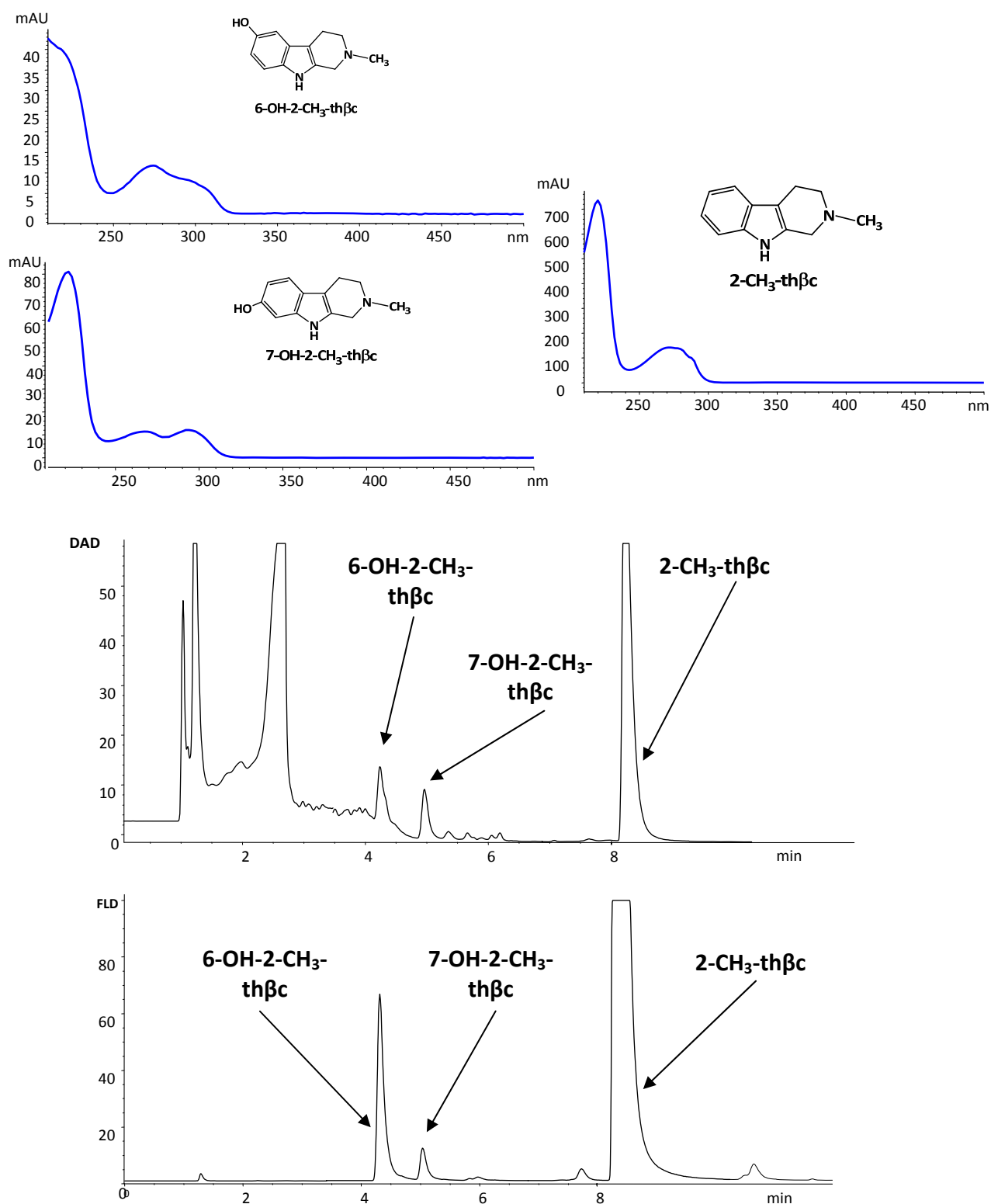
**Tabla 3.1** Metabolitos de hidroxilación aromática y de *O*-desmetilación identificados por HPLC-MS (electrospray positivo) en los medios de biotransformación de thβc<sub>s</sub> y metoxi-thβc<sub>s</sub> con enzimas citocromo P450 (principalmente por el citocromo P450 2D6, véase más adelante).

<sup>1</sup> Se utilizó un columna Zorbax SB-C18 (150 x 2.1 mm), eluyente A: ácido fórmico 0.5 %; eluyente B: 0.5 % ácido fórmico en ACN. Programa: 30 min, 70 % B (se pueden ver condiciones en capítulo de Materiales y Métodos). Los valores de abundancia relativa son indicativos y varían con el voltaje de fragmentación (energía de colisión).

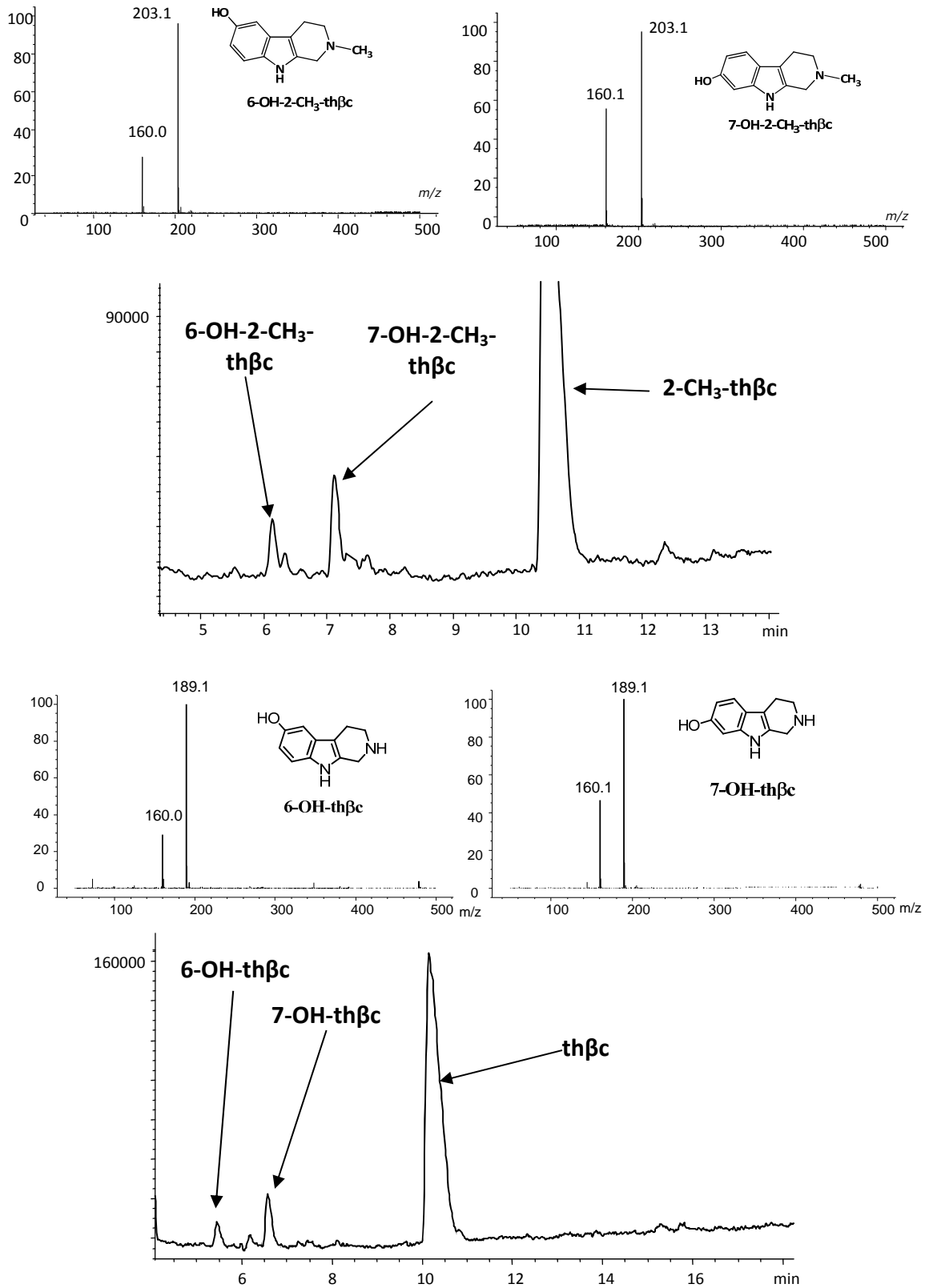
<sup>2</sup> Las estructuras de los compuestos están en la **Figura 3.1** y en la **Figura 3.5**



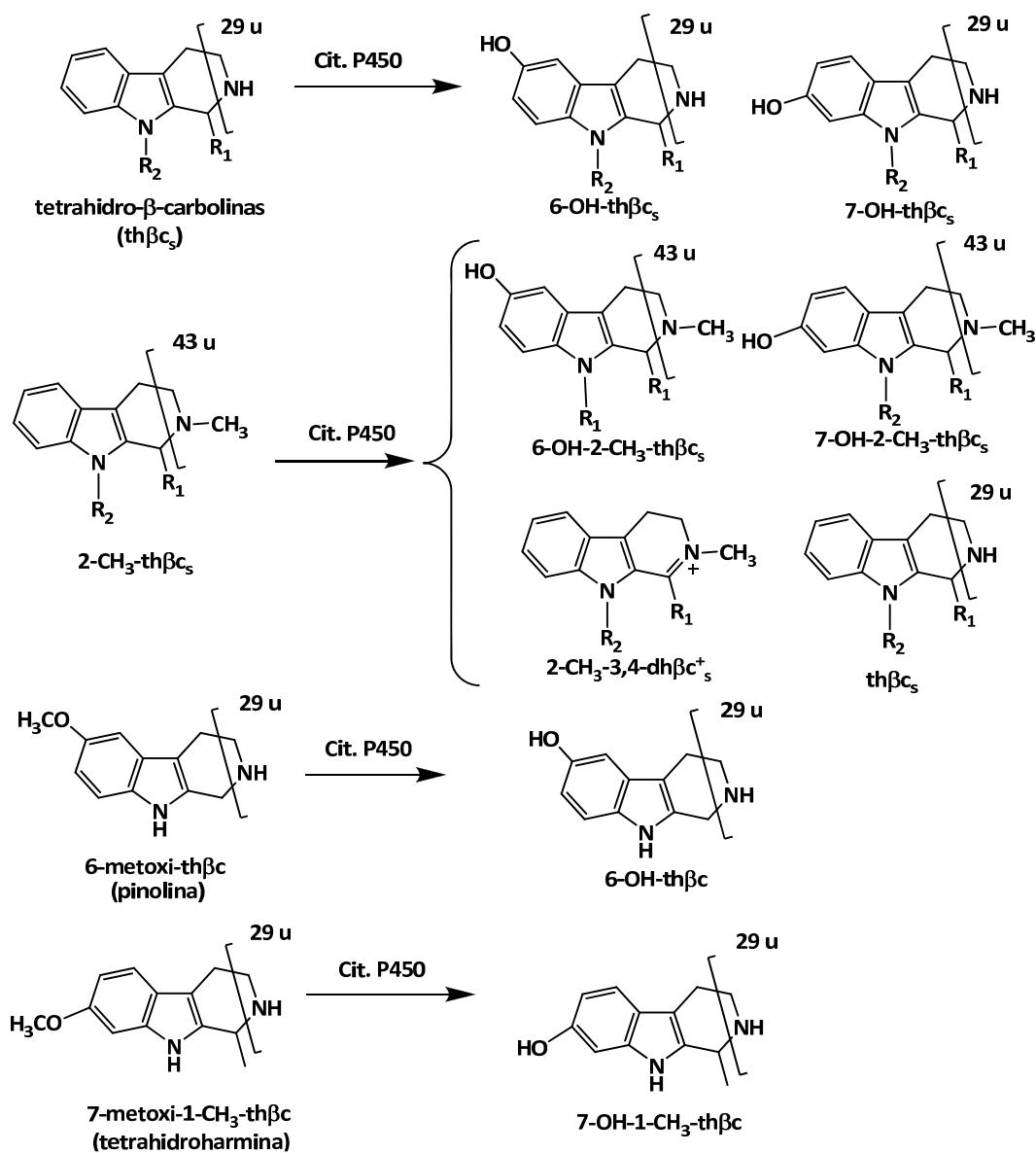
**Figura 3.2** Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC (Novapak-C18) de los medios de biotransformación de thβc por el citocromo P450 2D6. Detección con DAD (280 nm) (**MEDIO**) y fluorescencia (excitación 270 nm; emisión 343 nm) (**ABAJO**). Se muestran también los espectros de DAD de los metabolitos de hidroxilación (**ARRIBA**).



**Figura 3.3** Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC (Novapak-C18) de los medios de biotransformación de 2-CH<sub>3</sub>-thβc por el citocromo P450 2D6. Detección con DAD (280 nm) (**MEDIO**) y fluorescencia (excitación 270 nm; emisión 343 nm) (**ABAJO**). Se muestran también los espectros de DAD de los metabolitos de hidroxilación (**ARRIBA**).

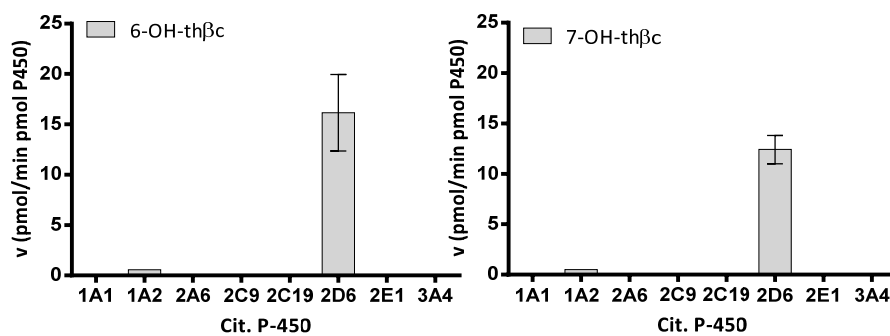


**Figura 3.4** Cromatogramas obtenidos por RP-HPLC-MS (ESI+) (Zorbax SB-C18) de los medios de biotransformación de 2-CH<sub>3</sub>-thβc y de thβc por el citocromo P450 2D6. Se muestran los cromatogramas de iones totales y los espectros de masas de los respectivos metabolitos.

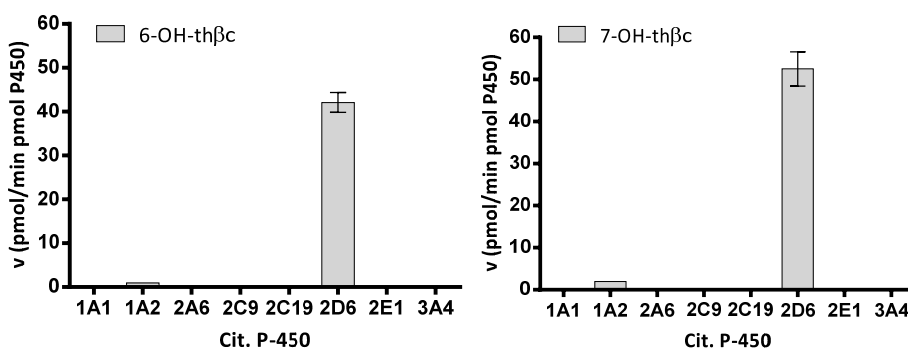


**Figura 3.5** Fragmentación de los sustratos thβc<sub>5</sub> y de sus metabolitos identificados por espectrometría de masas (ESI). Se repiten las correspondientes reacciones de fragmentación de retro-Diels-Alder como fragmento principal junto al ion principal correspondiente a (M+H)<sup>+</sup> salvo en el caso del producto derivado de la oxidación parcial en el anillo piridínico (2-CH<sub>3</sub>-3,4-dhβc<sub>5</sub><sup>+</sup>) que proporciona el ion molecular (M<sup>+</sup>). R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son CH<sub>3</sub> o H.

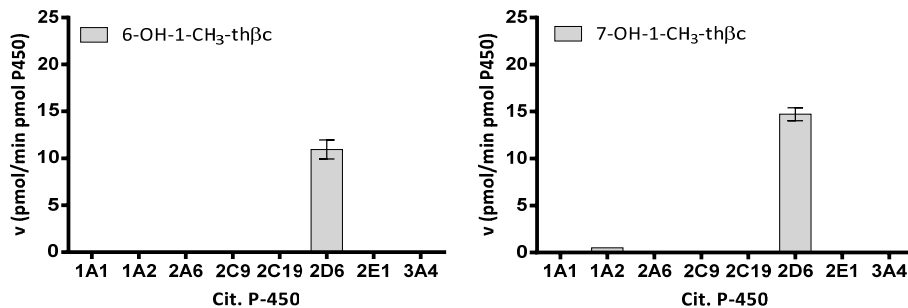
tetrahydro-β-carbolina (thβc) 25 μM



tetrahydro-β-carbolina (thβc) 250 μM



1-CH<sub>3</sub>-thβc 25 μM



1-CH<sub>3</sub>-thβc 250 μM

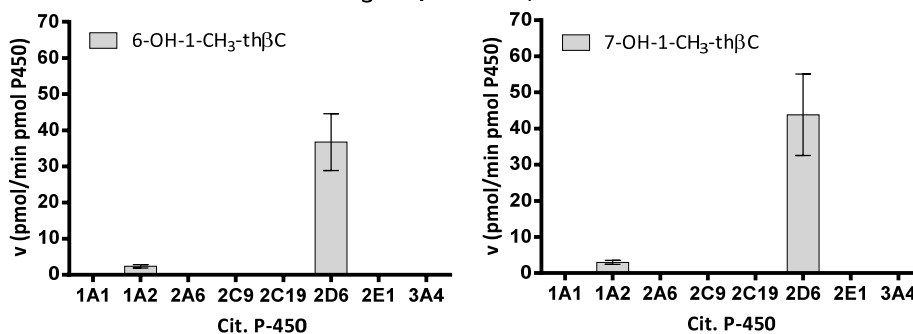


Figura 3.6 Biotransformación de thβc y de 1-CH<sub>3</sub>-thβc (25 y 250 μM) por citocromos P450 (35 pmoles cit. P450/mL).

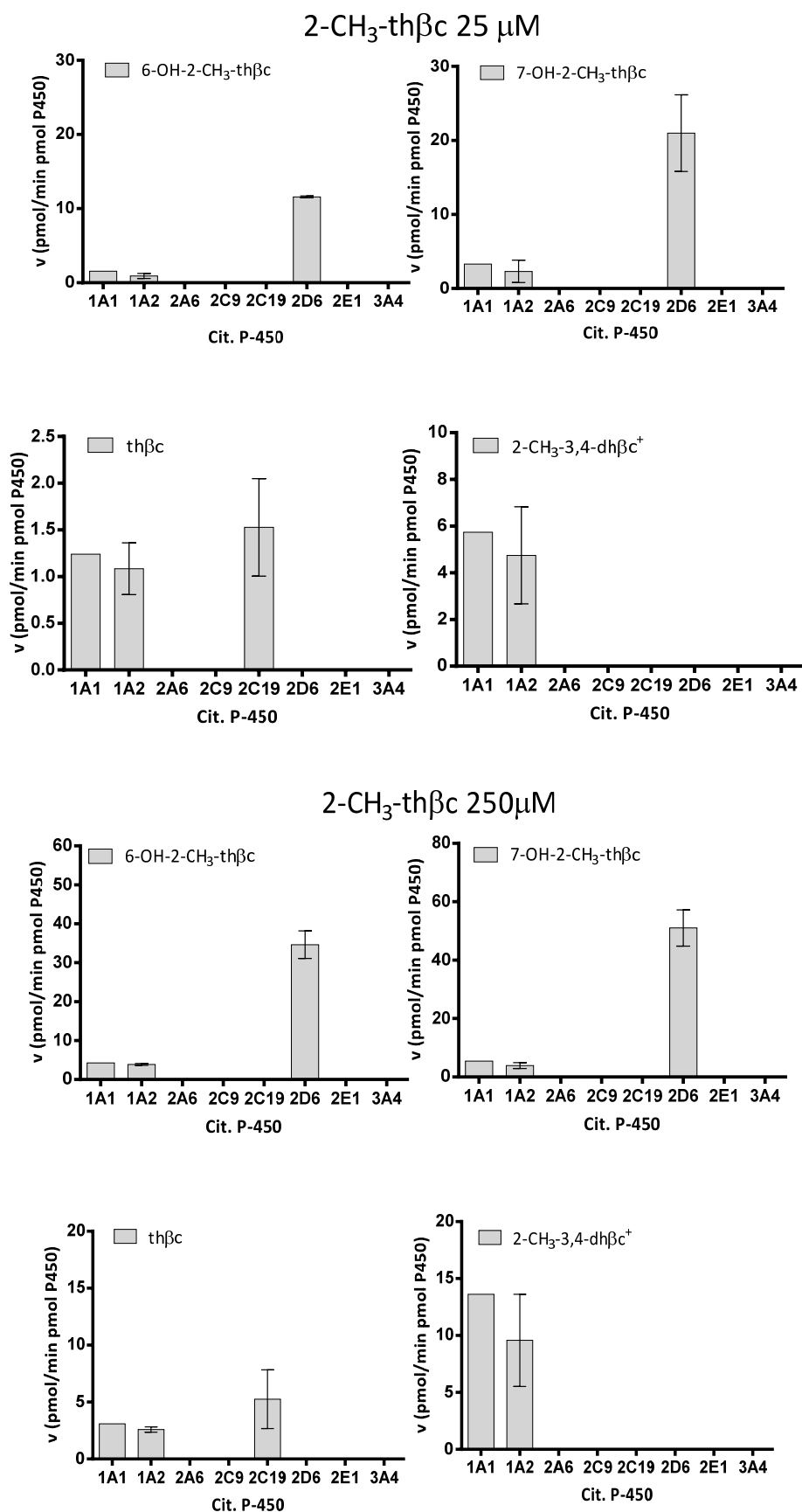
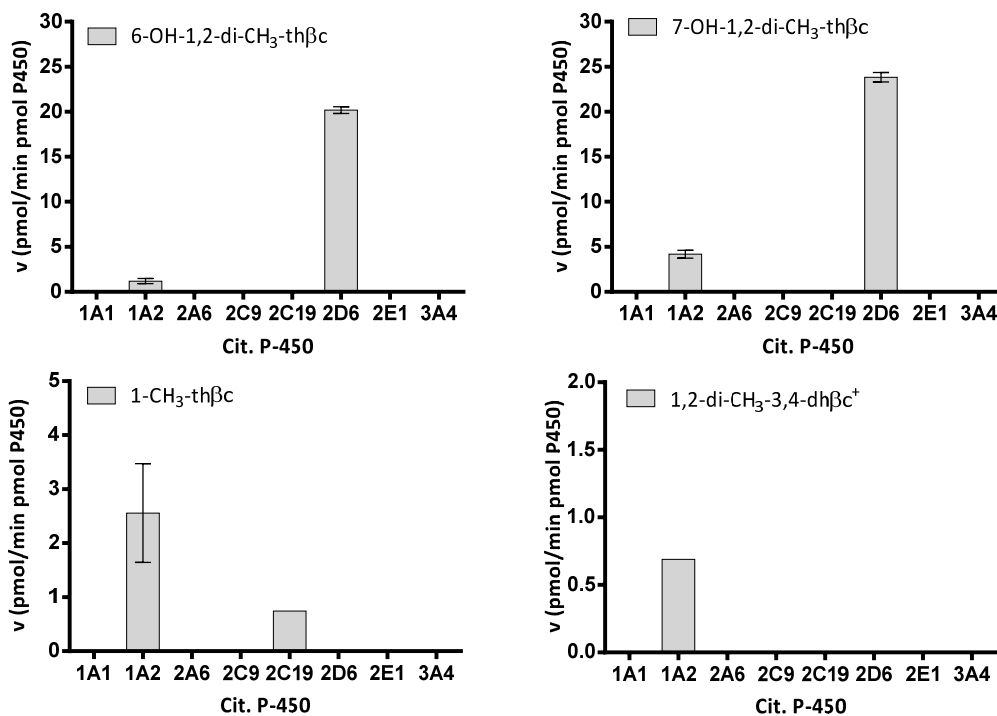


Figura 3.7 Biotransformación de 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c (25 y 250  $\mu$ M) por citocromo P450 (35 pmoles cit. P450/mL).

### 1,2-di-CH<sub>3</sub>-thβc 25 μM



### 1,2-di-CH<sub>3</sub>-thβc 250 μM

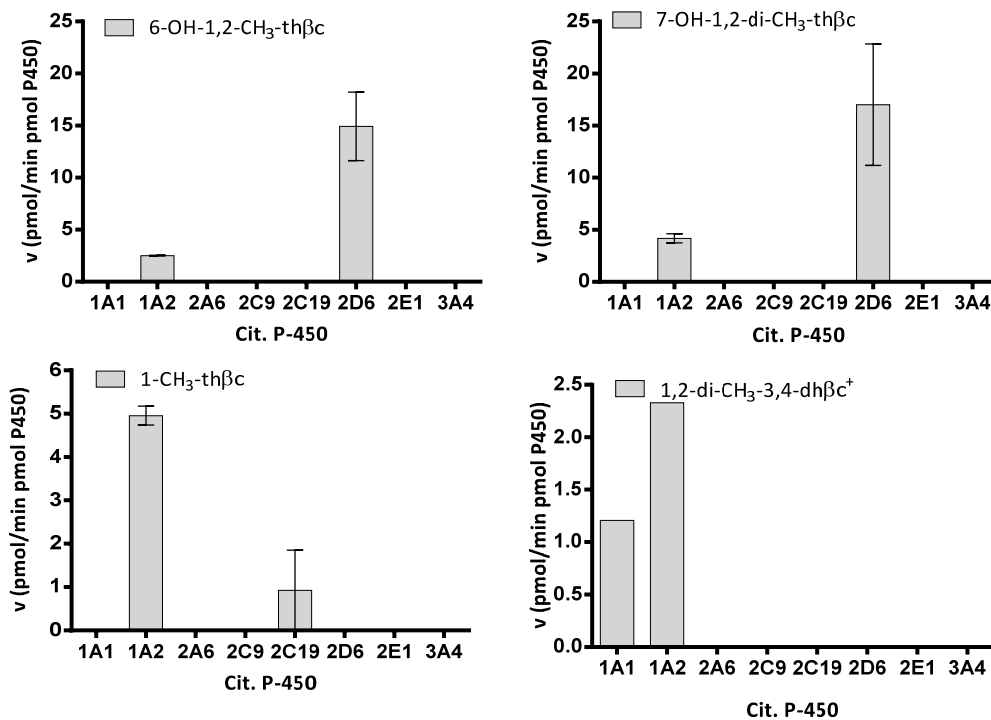


Figura 3.8 Biotransformación de 1,2-di-CH<sub>3</sub>-thβc (25 y 250 μM) por citocromos P450 (35 pmoles cit. P450/mL). Se observaron problemas de solubilidad en concentraciones de 250 μM.

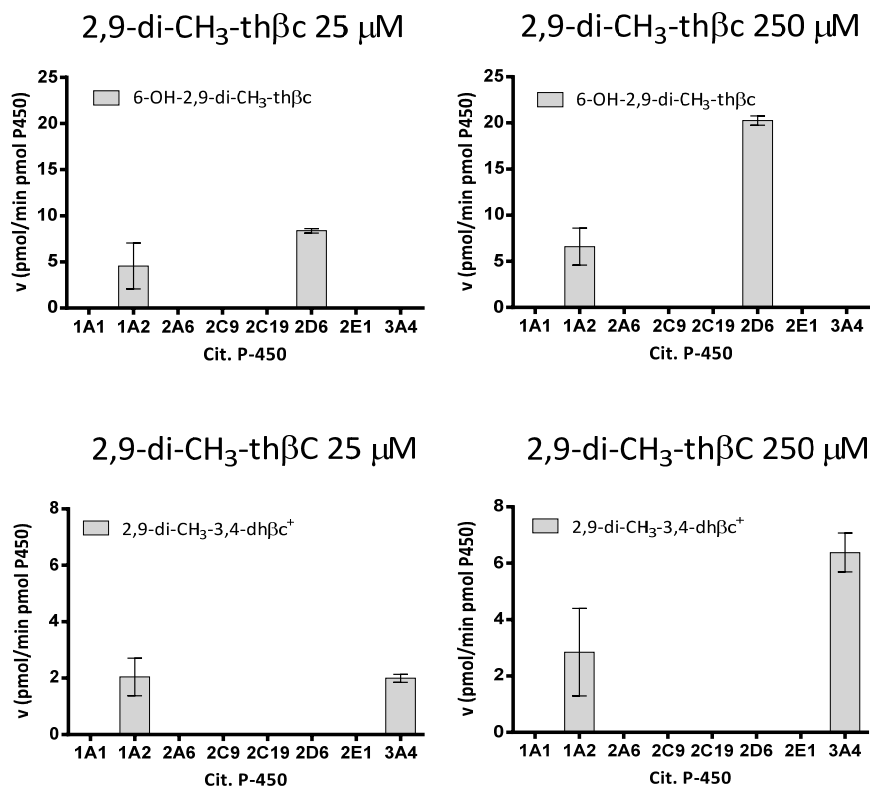


Figura 3.9 Biotransformación de 2,9-di-CH<sub>3</sub>-thβc (25 y 250 μM) por citocromos P450 (35 pmoles cit. P450/mL)

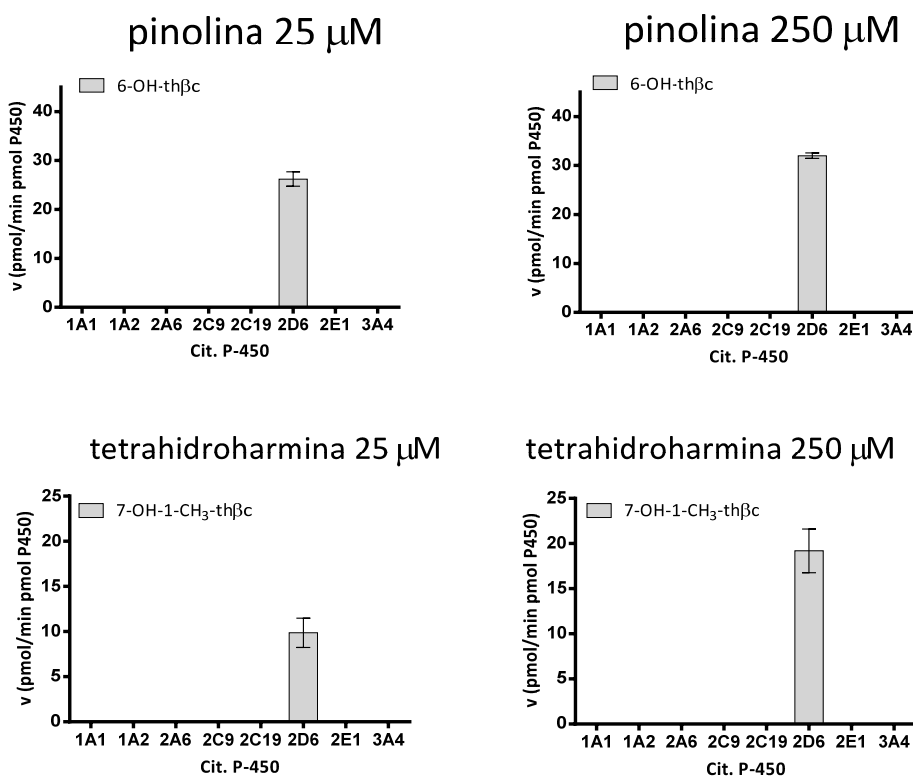


Figura 3.10 Biotransformación de pinolina (6-OCH<sub>3</sub>-thβc) y tetrahydroharmina (7-OCH<sub>3</sub>-1-CH<sub>3</sub>-thβc) (25 y 250 μM) por citocromos P450 (35 pmoles cit. P450/mL).

Un comportamiento similar se produjo para la 1,2-di-CH<sub>3</sub>-thβc (véase **Figura 3.8**). Se observó la formación de los correspondientes derivados hidroxilados en C-6 y C-7, catalizada por el citocromo P450 2D6 y en menor proporción por 1A2. También se detectó *N*-desmetilación por acción de 1A2 y 2C19, proporcionando 1-CH<sub>3</sub>-thβc y deshidrogenación aromática por 1A2 y 1A1 para dar 1,2-di-CH<sub>3</sub>-3,4-dihidro-β-carbolinio (1,2-di-CH<sub>3</sub>-3,4-dhβc<sup>+</sup>). El compuesto 2,9-di-CH<sub>3</sub>-thβc (véase **Figura 3.9**) proporcionó dos metabolitos de hidroxilación aromática producidos por los citocromos P450 2D6 y P450 1A2: uno de ellos fue el 6-hidroxiderivado (6-OH-2,9-di-CH<sub>3</sub>-thβc) y el otro no se pudo identificar con seguridad. Además se observó el correspondiente compuesto de deshidrogenación en los medios incubados con los citocromos P450 1A2 y 3A4. Aunque no se muestran resultados, el compuesto 9-CH<sub>3</sub>-thβc se comportó como el 2,9-di-CH<sub>3</sub>-thβc, proporcionando el mismo patrón de metabolitos aunque en menor concentración.

Las metoxi-thβc<sub>s</sub> (véase **Figura 3.10**) se desmetilaron (*O*-desmetilación) en una reacción catalizada exclusivamente por acción del citocromo P450 2D6 para dar las correspondientes thβc<sub>s</sub> hidroxiladas, no observándose hidroxilaciones aromáticas como en las otras thβc<sub>s</sub>.

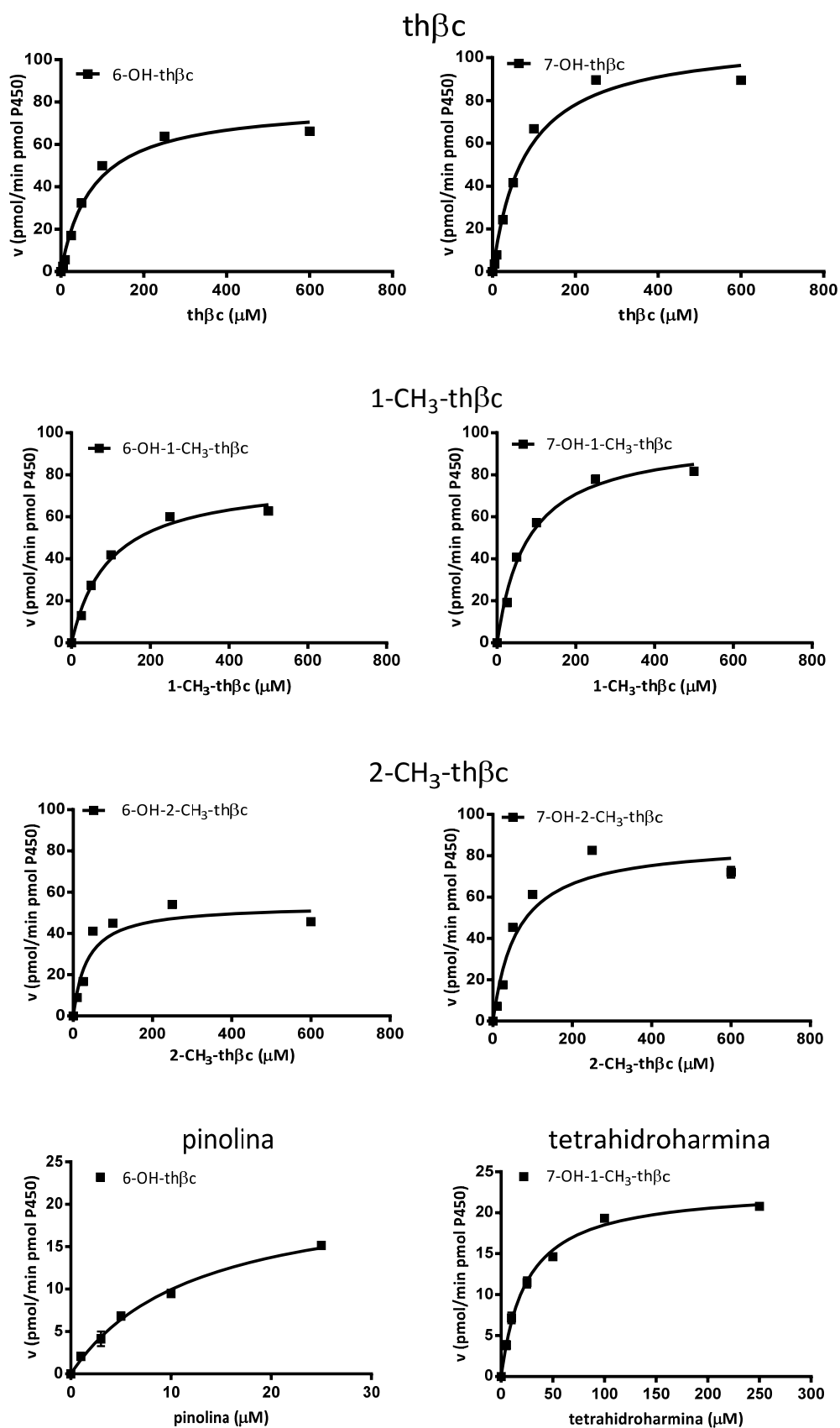
Tras el cribado previo, se realizó un estudio cinético detallado de las principales reacciones metabólicas observadas anteriormente ajustando la cantidad de enzima citocromo P450 y variando la concentración de sustrato (en la **Figura 3.11** se muestran algunos ejemplos de las curvas de metabolización obtenidas) y se determinaron los parámetros cinéticos de  $V_{max}$  y de  $K_m$ , que se recogen en la **Tabla 3.2**.

Cit. P450 2D6	Metabolitos					
	6-OH-derivado			7-OH-derivado		
Sustrato	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ (μM)	$V_{max}/K_m$ (μL min <sup>-1</sup> pmol <sup>-1</sup> P450)	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ (μM)	$V_{max}/K_m$ (μL min <sup>-1</sup> pmol <sup>-1</sup> P450)
thβc	79.6 ± 3.7	77.3 ± 9.4	1.03	109.2 ± 5.1	79.8 ± 9.7	1.37
1-CH <sub>3</sub> -thβc	78.5 ± 3.8	96.7 ± 11.9	0.81	98.2 ± 4.5	77.8 ± 9.5	1.26
2-CH <sub>3</sub> -thβc	58.8 ± 4.1	46.5 ± 10.1	1.26	94.4 ± 8.9	67.8 ± 18.5	1.39
1,2-di-CH <sub>3</sub> -thβc	36.4 ± 2.6	33.4 ± 9.3	1.09	31.1 ± 2.8	25.8 ± 9.9	1.20
2,9-di-CH <sub>3</sub> -thβc	31.0 ± 0.75	38.9 ± 2.5	0.80	-	-	-
Pinolina	22.2 ± 1.8	12.3 ± 1.9	1.80	-	-	-
Tetrahydroharmina	-	-	-	23.1 ± 0.5	24.7 ± 2	0.93

Cit. P450 2C19	Metabolitos		
	thβc		
Sustrato	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ (μM)	$V_{max}/K_m$ (μL min <sup>-1</sup> pmol <sup>-1</sup> P450)
2-CH <sub>3</sub> -thβc	3.7 ± 0.2	81.8 ± 16	0.045

**Tabla 3.2** Parámetros cinéticos correspondientes a la biotransformación de thβc<sub>s</sub> a compuestos de hidroxilación aromática por el citocromo P450 2D6 y al correspondiente compuesto de *N*-desmetilación por el citocromo P450 2C19.



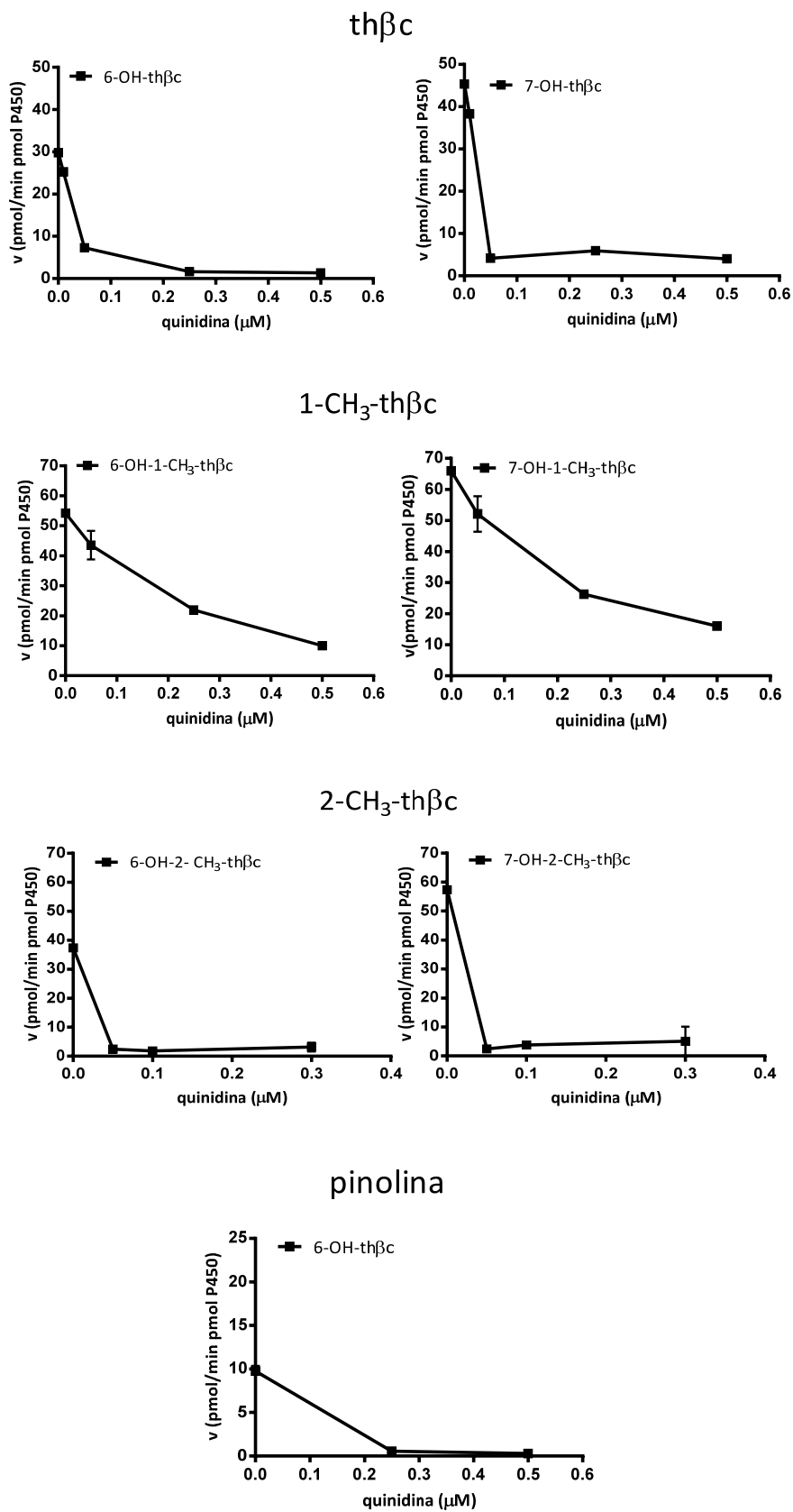
**Figura 3.11** Curvas de Michaelis-Menten correspondientes a la formación de los compuestos 6 y 7-hidroxi derivados por hidroxilación aromática de th $\beta$ c, 1-CH $_3$ -th $\beta$ c y 2-CH $_3$ -th $\beta$ c y de *O*-desmetilación de pinolina (6-OCH $_3$ -th $\beta$ c) y tetrahydroarmina (7-OCH $_3$ -1-CH $_3$ -th $\beta$ c) por el citocromo P450 2D6.

Los resultados obtenidos (véase **Tabla 3.2**) indican una buena eficacia catalítica (altos valores relativos de  $V_{max}/K_m$ ) del citocromo P450 2D6 en la conversión de  $th\beta c_s$  a sus respectivos metabolitos de hidroxilación aromática (6-OH y 7-OH derivados). Se consiguen altas velocidades máximas ( $V_{max}$ ) y una buena afinidad de la enzima por el sustrato (baja  $K_m$ ), y las conversiones metabólicas obtenidas en baja concentración de sustrato fueron relevantes.

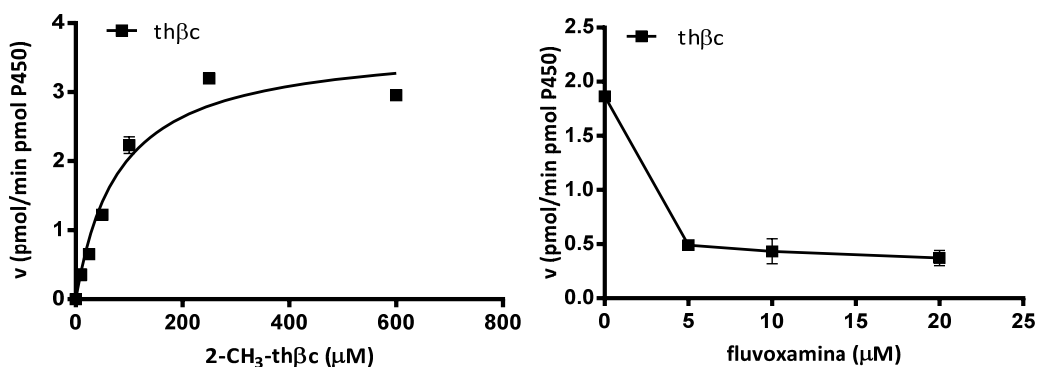
Con el fin de confirmar la participación del citocromo P450 2D6 en la hidroxilación aromática de  $th\beta c_s$ , se realizaron incubaciones en presencia de quinidina, que es un conocido inhibidor selectivo de este citocromo. Se observó inhibición clara del metabolismo de  $th\beta c_s$  en baja concentración de quinidina (0-0.5  $\mu$ M) (véase **Figura 3.12**). La quinidina también inhibió completamente las reacciones de *O*-desmetilación de pinolina y tetrahydroharmina por el citocromo P450 2D6. Se confirma, por tanto, que la metabolización de las  $th\beta c_s$  se lleva a cabo con la participación de este citocromo.

El citocromo P450 2C19 catalizó las reacciones de *N*-desmetilación de 2- $CH_3$ - $th\beta c_s$  para dar la  $th\beta c$  libre (**Tabla 3.2** y **Figura 3.13**). Esta reacción metabólica se inhibió selectivamente en presencia de fluvoxamina (inhibidor selectivo del citocromo P450 2C19), confirmándose la intervención de este citocromo en la biotransformación. Los valores de velocidad máxima y de  $V_{max}/K_m$  (eficacia catalítica) fueron inferiores a los de la hidroxilación aromática por el citocromo P450 2D6 (**Tabla 3.2**).

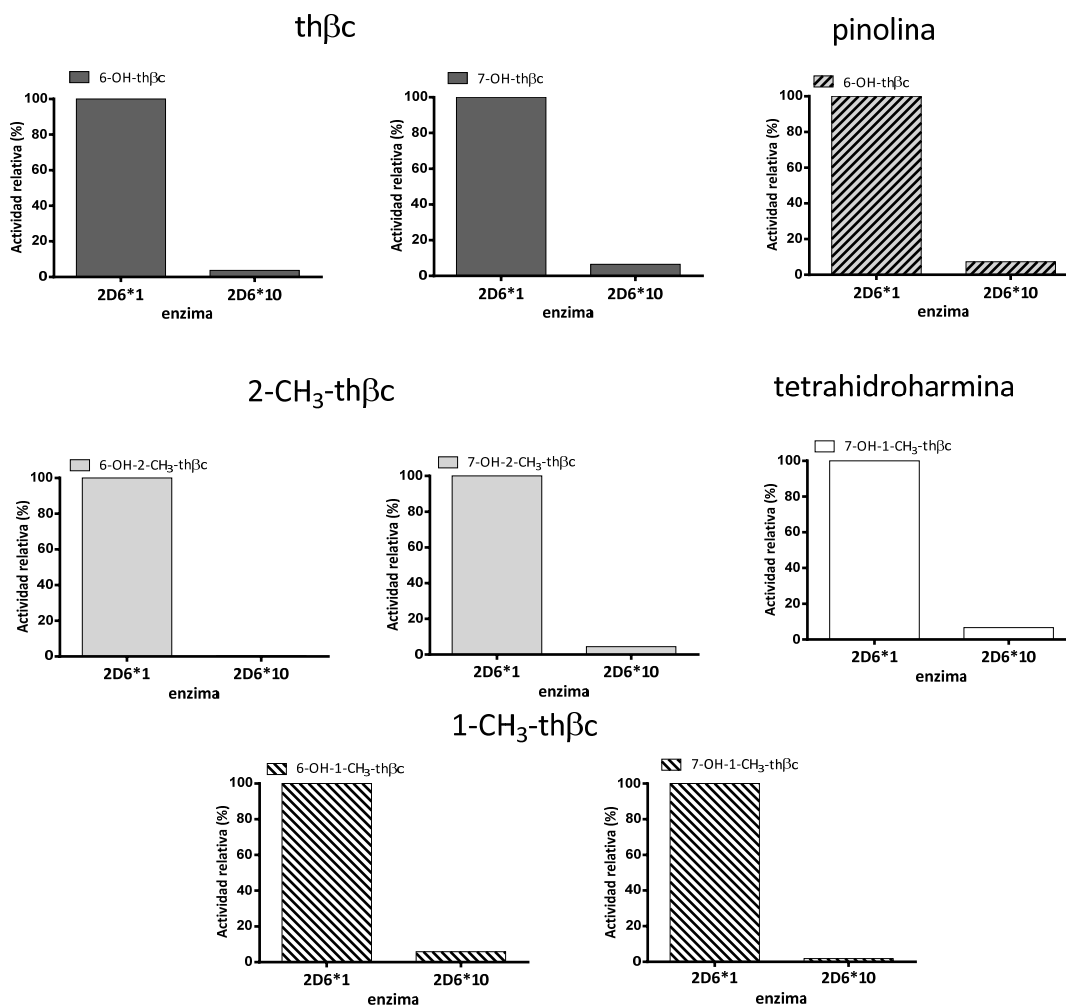
El citocromo P450 2D6 es altamente polimórfico en humanos (polimorfismo que se caracteriza por la existencia de alelos nulos y/o por sustituciones de aminoácidos y por la existencia de distintas copias del gen). Como consecuencia de ello, la expresión y la actividad de esta enzima varían sustancialmente entre individuos. Existen individuos con metabolismo reducido (entre un 5-10 % de la población), metabolismo intermedio (la mayoría), y un metabolismo ultrarrápido (aproximadamente 1 % de la población mundial, aunque en ciertas étnias este porcentaje es mucho mayor<sup>200 201 202 203</sup>). En esta memoria se evaluó la actividad relativa de metabolización de  $th\beta c_s$  por las dos variantes alélicas más comunes: el citocromo P450 2D6\*1 (alelo común que poseen los metabolizadores intermedios) y el citocromo P450 2D6\*10, común en la población asiática (alelo asiático). El citocromo P450 2D6\*10 contiene una mutación en dos aminoácidos (P34S y S486T) y se le ha relacionado con un grado reducido del metabolismo por 2D6<sup>204 205 206</sup>. Como se muestra en la **Figura 3.14**, la formación de los metabolitos procedentes de las reacciones de hidroxilación aromática y de *O*-desmetilación de  $th\beta c_s$ , disminuyó notablemente en la variante asiática defectiva P450 2D6\*10 con respecto a la variante más común P450 2D6\*1. Esto demuestra que la actividad metabólica sobre las  $th\beta c_s$  puede variar sustancialmente entre individuos dependiendo del polimorfismo genético del citocromo P450 2D6.



**Figura 3.12** Inhibición selectiva del citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL) con quinidina (0-0.5  $\mu$ M) sobre la formación de 6-hidroxi y 7-hidroxi derivados de th $\beta$ c (100  $\mu$ M), 1-CH $_3$ -th $\beta$ c (100  $\mu$ M), 2-CH $_3$ -th $\beta$ c (100  $\mu$ M) y pinolina (10  $\mu$ M).



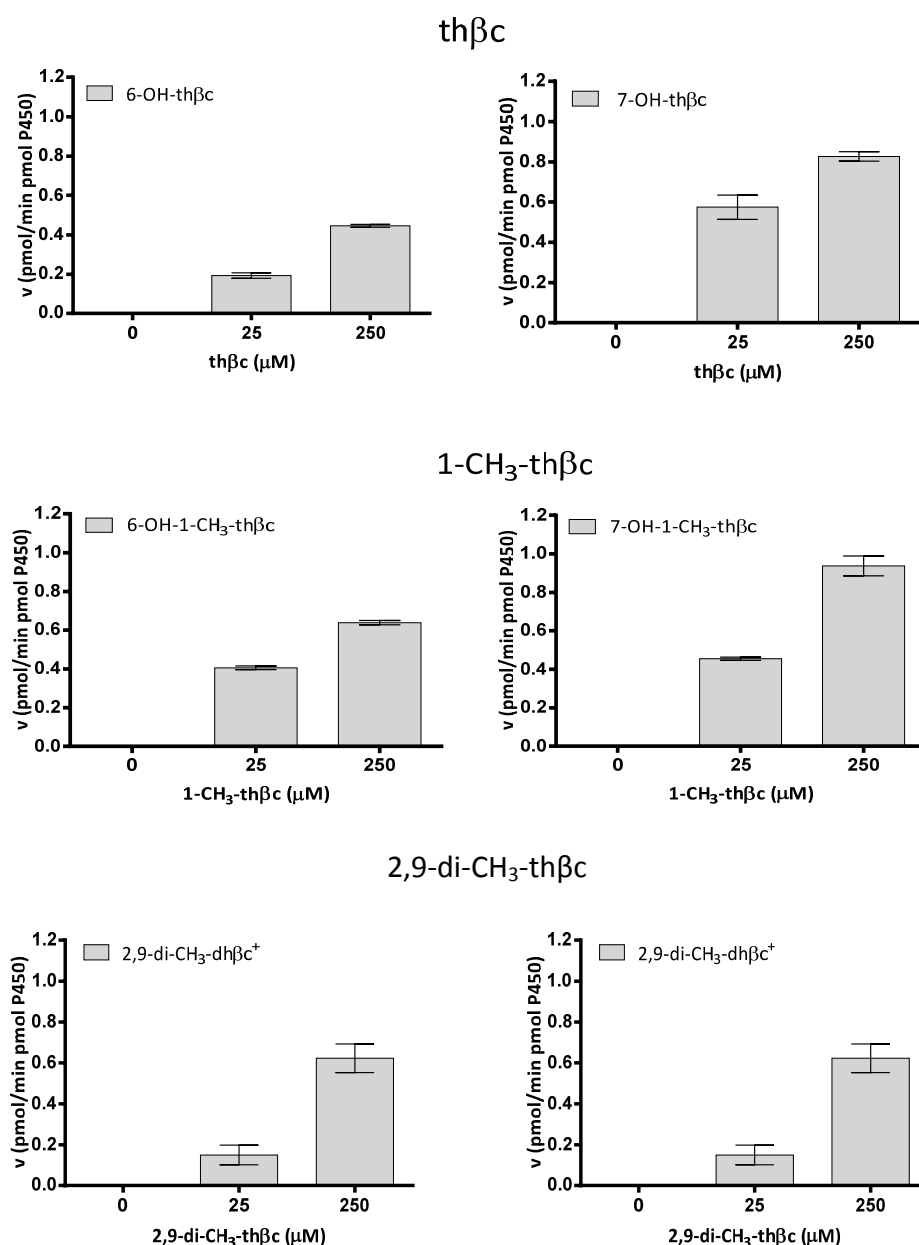
**Figura 3.13. (IZQUIERDA)** Curva de metabolización de 2-CH<sub>3</sub>-thβc por el citocromo P450 2C19 (35 pmoles cit. P450/mL) para dar thβc por reacción de *N*-desmetilación. **(DERECHA)** Inhibición de la metabolización de 2-CH<sub>3</sub>-thβc (100 μM) por la enzima citocromo P450 2C19 (35 pmoles cit. P450/mL) en presencia de fluvoxamina (0-20 μM).



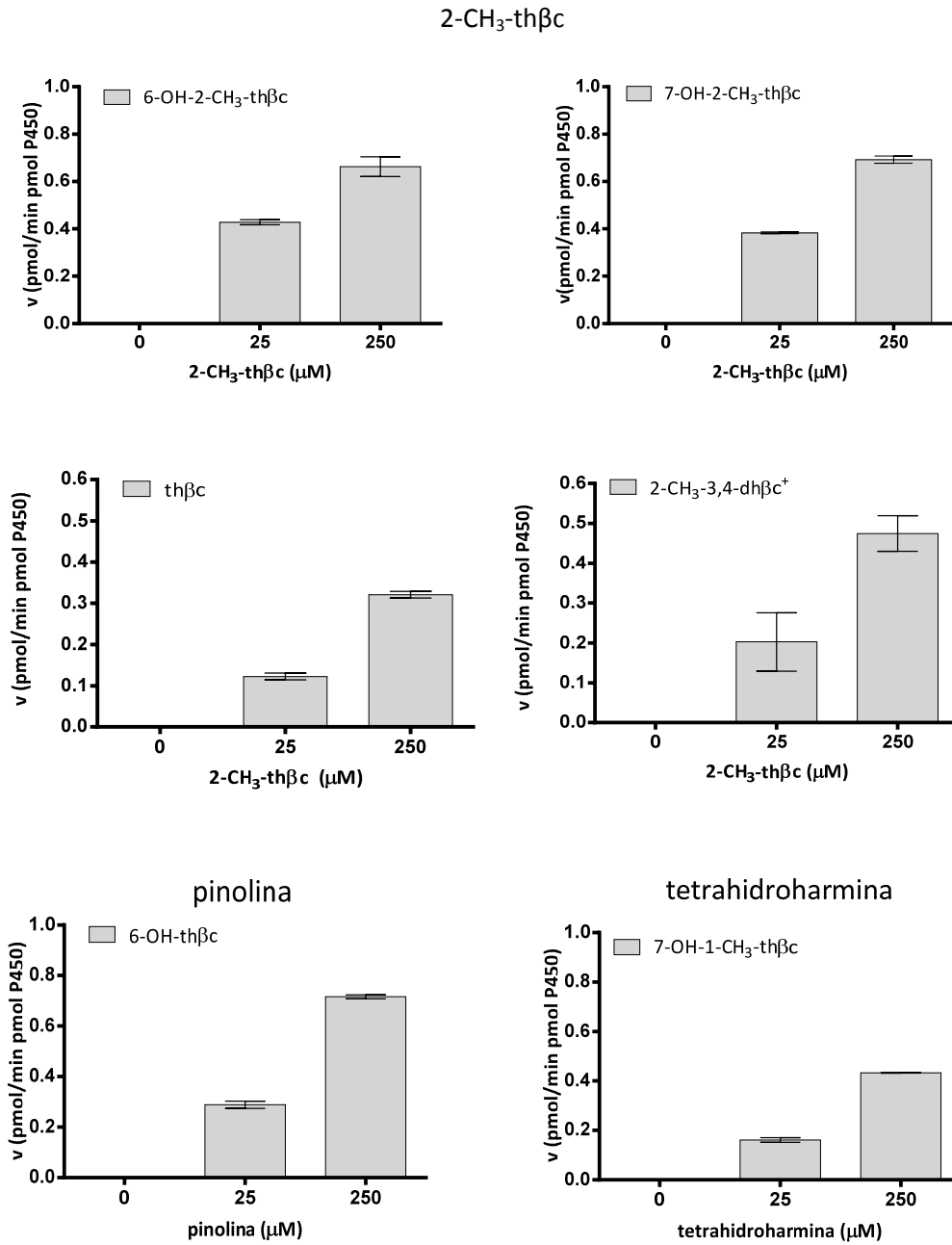
**Figura 3.14** Actividad de biotransformación metabólica relativa de thβc<sub>s</sub> y de metoxi-thβc<sub>s</sub> para dar sus correspondientes metabolitos por el citocromo P450 2D6 en sus variantes alélica común (2D6\*1) y variante asiática (2D6\*10). Los sustratos son thβc; 1-CH<sub>3</sub>-thβc, 2-CH<sub>3</sub>-thβc, pinolina y tetrahydroharmina. Se utilizaron 70 pmoles cit. P450/mL.

### 3.1.1.2. Metabolismo de th $\beta$ c<sub>s</sub> por microsomas hepáticos.

A continuación se estudió la biotransformación metabólica de th $\beta$ c<sub>s</sub> por microsomas hepáticos. En la **Figura 3.15** y la **Figura 3.16** se recogen los resultados de la formación de metabolitos de la th $\beta$ c, 1-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c, 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c y 2,9-di-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c, así como de las metoxi-th $\beta$ c<sub>s</sub> (pinolina y tetrahydroharmina) en dos concentraciones distintas de sustrato. Los resultados obtenidos con los microsomas hepáticos están de acuerdo con los obtenidos previamente con enzimas recombinantes, y muestran la formación de compuestos de hidroxilación aromática en las posiciones C-6 y C-7 de las th $\beta$ c<sub>s</sub>, la formación de productos de *O*-desmetilación en las metoxi-th $\beta$ c<sub>s</sub> y metabolitos de reacciones de *N*-desmetilación y de deshidrogenación en 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c<sub>s</sub>.



**Figura 3.15** Biotransformación de th $\beta$ c, 1-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c, y 2,9-di-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c (25 y 250  $\mu$ M) por microsomas hepáticos humanos (168 pmoles cit. P450/mL excepto para 2,9-di-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c que fue 232 pmoles cit. P450/mL).

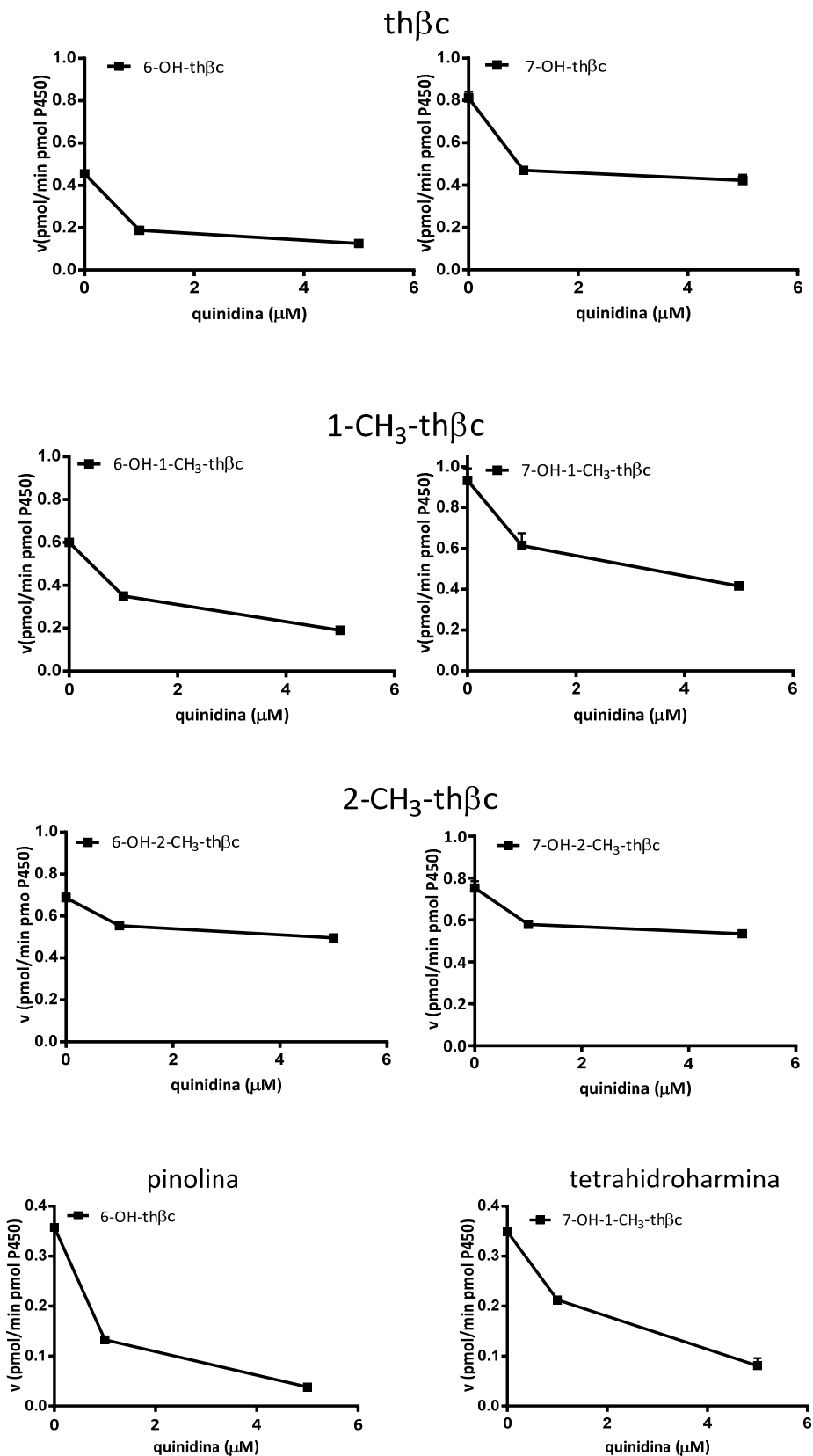


**Figura 3.16** Biotransformación de 2-CH<sub>3</sub>-thβc, pinolina (6-metoxi-thβc) y tetrahydroharmina (7-metoxi-1-CH<sub>3</sub>-thβc) (25 y 250 μM) por microsomas hepáticos humanos (168 pmoles cit. P450/mL).

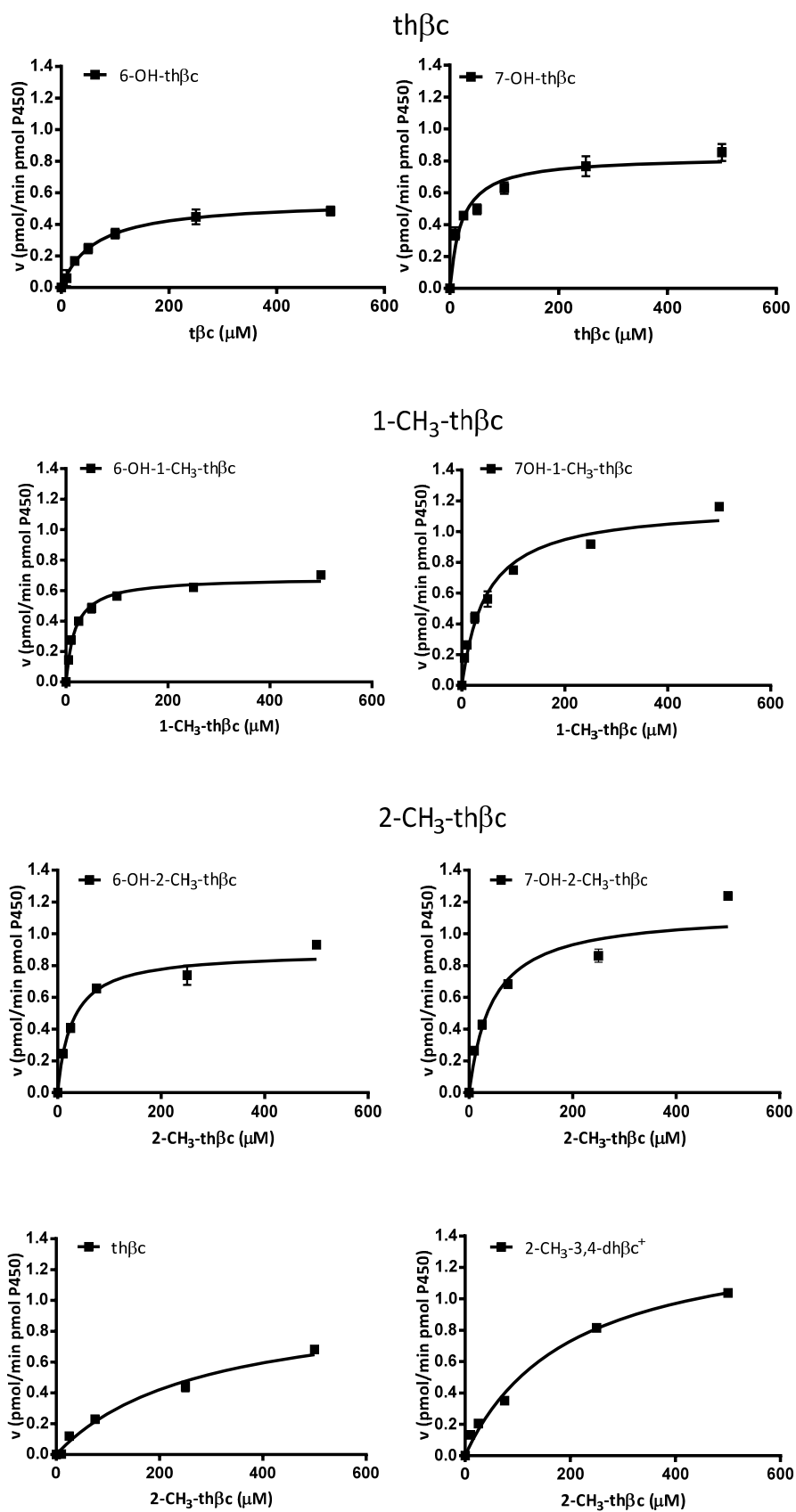
El metabolismo de th $\beta$ c<sub>s</sub> por microsomas hepáticos se inhibió en presencia de quinidina, indicando que la principal enzima implicada en la biotransformación de th $\beta$ c<sub>s</sub> a compuestos hidroxilados aromáticos es el citocromo P450 2D6 (**Figura 3.17**). Sin embargo, no se alcanzó una inhibición total, y esto sugiere, una posible contribución adicional de otras enzimas que se encuentran en mayor proporción relativa<sup>141</sup>, como por ejemplo el citocromo P450 1A2 (véase apartado anterior). En cambio, la metabolización de las th $\beta$ c<sub>s</sub> metoxiladas, pinolina y tetrahydroharmina, se inhibió sustancialmente por quinidina (véase **Figura 3.17**). En este caso, se alcanzaron altos porcentajes de inhibición, indicando que la enzima citocromo P450 2D6 es la principal contribuyente a la metabolización de metoxi-th $\beta$ c<sub>s</sub> en microsomas hepáticos.

Tras realizar estudios en función de la concentración del sustrato th $\beta$ c, se obtuvieron curvas de metabolización de varias th $\beta$ c<sub>s</sub> representativas (véase **Figura 3.18**), y a partir de ellas, se calcularon los parámetros cinéticos  $V_{max}$ ,  $K_m$  y la relación  $V_{max}/K_m$  como un indicador de la eficacia catalítica (**Tabla 3.3**). Los datos obtenidos ponen de manifiesto la buena eficacia de biotransformación de th $\beta$ c<sub>s</sub> por microsomas hepáticos principalmente mediante hidroxilación aromática, así como la existencia de rutas secundarias como son la *N*-desmetilación y la oxidación parcial del anillo piridínico para el caso de los compuestos *N*(2)-metilados. Por su parte, las th $\beta$ c<sub>s</sub> metoxiladas sufren *O*-desmetilación para dar las correspondientes hidroxi-th $\beta$ c<sub>s</sub> con buena eficacia catalítica.

En resumen, los resultados obtenidos en este apartado se recogen en el esquema de la **Figura 3.19**. Las th $\beta$ c<sub>s</sub> se metabolizan por citocromos P450 y dan lugar a compuestos de hidroxilación aromática (caso de las th $\beta$ c<sub>s</sub>) y de *O*-desmetilación a los correspondientes derivados hidroxilados (caso de las metoxi-th $\beta$ c<sub>s</sub>). En las 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c<sub>s</sub> (*N*-metilderivados) se produce una reacción adicional de *N*-desmetilación (por ejemplo la formación de th $\beta$ c a partir de 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c) y reacciones de deshidrogenación parcial del anillo de tetrahidropiridina dando lugar a cationes 3,4-dihidro- $\beta$ -carbolinio (3,4-dh $\beta$ c<sup>+</sup>). Los ácidos tetrahydro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico (THCA y MTCA) no se metabolizan por los citocromos P450. Respecto a las enzimas, el principal citocromo involucrado en la hidroxilación aromática de th $\beta$ c<sub>s</sub> y en las reacciones de *O*-desmetilación de metoxi-th $\beta$ c<sub>s</sub> es el citocromo P450 2D6. La reacción de *N*-desmetilación se produce con la participación de los citocromos P450 2C19 y 1A2 mientras que la deshidrogenación parcial del anillo de tetrahidropiridina se lleva a cabo con la participación de los citocromos P450 1A2, 1A1 y 3A4. El resto de enzimas no contribuye de manera significativa a la biotransformación de estos alcaloides.



**Figura 3.17** Inhibición selectiva con quinidina (0-5  $\mu\text{M}$ ) de la metabolización por microsomas hepáticos de th $\beta\text{c}$  (250  $\mu\text{M}$  y 168 pmoles cit. P450/mL), 1-CH<sub>3</sub>-th $\beta\text{c}$  (250  $\mu\text{M}$  y 168 pmoles cit. P450/mL) y 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta\text{c}$  (250  $\mu\text{M}$  y 233 pmoles cit. P450/mL), pinolina (25  $\mu\text{M}$  y 168 pmoles cit. P450/mL) y tetrahydroharmina (100  $\mu\text{M}$  y 168 pmoles cit. P450/mL).



**Figura 3.18** Curvas de Michaelis-Menten correspondientes a la formación de metabolitos de thβc, 1-CH<sub>3</sub>-thβc y 2-CH<sub>3</sub>-thβc por microsomas hepáticos humanos (168 pmoles cit. P450/mL).

Sustrato	Metabolitos					
	6-OH-derivado			7-OH-derivado		
	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L min <sup>-1</sup> pmol <sup>-1</sup> P450)	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L min <sup>-1</sup> pmol <sup>-1</sup> P450)
th $\beta$ c	0.55 $\pm$ 0.034	61.3 $\pm$ 12.7	0.009	0.82 $\pm$ 0.04	21.7 $\pm$ 4.7	0.038
1-CH <sub>3</sub> -th $\beta$ c	0.68 $\pm$ 0.018	18.3 $\pm$ 1.8	0.037	1.17 $\pm$ 0.06	47.7 $\pm$ 7.3	0.024
2-CH <sub>3</sub> -th $\beta$ c	0.89 $\pm$ 0.04	28.3 $\pm$ 4.6	0.031	1.13 $\pm$ 0.08	44.8 $\pm$ 10.8	0.025
tetrahidro- harmina	-	-	-	0.56 $\pm$ 0.02	48.5 $\pm$ 6.9	0.011

Sustrato	Metabolitos					
	derivado <i>N</i> -desmetilado (th $\beta$ c)			3,4-dh $\beta$ c <sup>+</sup> derivado		
	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L min <sup>-1</sup> pmol <sup>-1</sup> P450)	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L min <sup>-1</sup> pmol <sup>-1</sup> P450)
th $\beta$ c	-	-	-	-	-	-
1-CH <sub>3</sub> -th $\beta$ c	-	-	-	-	-	-
2-CH <sub>3</sub> -th $\beta$ c	1.02 $\pm$ 0.13 <sup>1</sup>	281 $\pm$ 74	0.0036	1.45 $\pm$ 0.13 <sup>2</sup>	197.9 $\pm$ 42	0.007
tetrahidro- harmina	-	-	-	-	-	-

**Tabla 3.3** Parámetros cinéticos correspondientes a la metabolización de th $\beta$ c<sub>s</sub> por microsomas hepáticos.  
<sup>1</sup>tetrahidro- $\beta$ -carbolina; <sup>2</sup> cation 2-metil-3,4-dihidro- $\beta$ -carbolino

Se puede concluir que las th $\beta$ c<sub>s</sub> son buenos sustratos del citocromo P450 2D6, siendo esta enzima la principal responsable de su metabolismo. Estudios de la literatura sobre relación estructura-actividad indican que los sustratos de este citocromo suelen tener un anillo aromático planar y un heteroátomo de nitrógeno protonable, y se hidroxilan (oxidan) a aproximadamente 5-7 Å de distancia de éste<sup>123</sup><sup>207</sup>. Por tanto, es lógico pensar que el heteroátomo de nitrógeno situado en el anillo de tetrahidropiridina de las th $\beta$ c<sub>s</sub>, que es protonable a pH fisiológico, es fundamental para la interacción de las th $\beta$ c<sub>s</sub> con el centro activo (residuos de Asp o Glu) del citocromo P450 2D6<sup>207</sup>.

Los resultados obtenidos indican que los metabolitos de hidroxilación de las th $\beta$ c<sub>s</sub> detectados en muestras biológicas<sup>208</sup> pueden proceder de la actividad de biotransformación de las th $\beta$ c<sub>s</sub> por el citocromo P450 2D6. Asimismo, este citocromo puede influir en la actividad biológica de las th $\beta$ c<sub>s</sub> pues desempeña un papel destacado en su metabolización y degradación. Por ejemplo, la metabolización de las 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c<sub>s</sub> por el citocromo P450 2D6 podría suponer una vía de detoxificación de estas sustancias que se han propuesto como posibles protoxinas similares a la neurotoxina MPTP<sup>209</sup>. Su hidroxilación aromática catalizada por este citocromo, podría ser relevante en tejidos extrahepáticos como el cerebro, donde actúan estos compuestos<sup>210</sup><sup>211</sup>. Podría pensarse en una acción competitiva y protectora del citocromo P450 2D6 frente a otras enzimas responsables de la bioactivación tóxica de th $\beta$ c<sub>s</sub> como son las hemoperoxidasas y/o *N*-metiltransferasas<sup>108</sup><sup>109</sup><sup>209</sup>. Por otro lado, los citocromos 1A (1A1 y 1A2) llevaron a cabo la oxidación de 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c<sub>s</sub> a cationes

dihidro- $\beta$ -cabolinio ( $\text{dh}\beta\text{c}_s^+$ ), si bien esta vía fue mucho menos eficaz que la de hidroxilación por el citocromo P450 2D6.

El citocromo P450 2D6 es polimórfico. Esta circunstancia influye en la eficacia de biotransformación de los sustratos endógenos y exógenos de esta enzima<sup>206</sup>. Estudios recientes sugieren que este polimorfismo puede tener relación con la susceptibilidad o resistencia contra algunas toxinas y pesticidas<sup>212 213</sup>. Los resultados obtenidos aquí sobre la actividad metabólica de las variantes polimórficas P450 2D6\*1 (variante común) y P450 2D6\*10 (variante asiática), demuestran que el citocromo P450 2D6 podría intervenir en el metabolismo de las  $\text{th}\beta\text{c}_s$ , proporcionando un perfil metabólico distinto en función del genotipo y del polimorfismo individual de esta enzima.

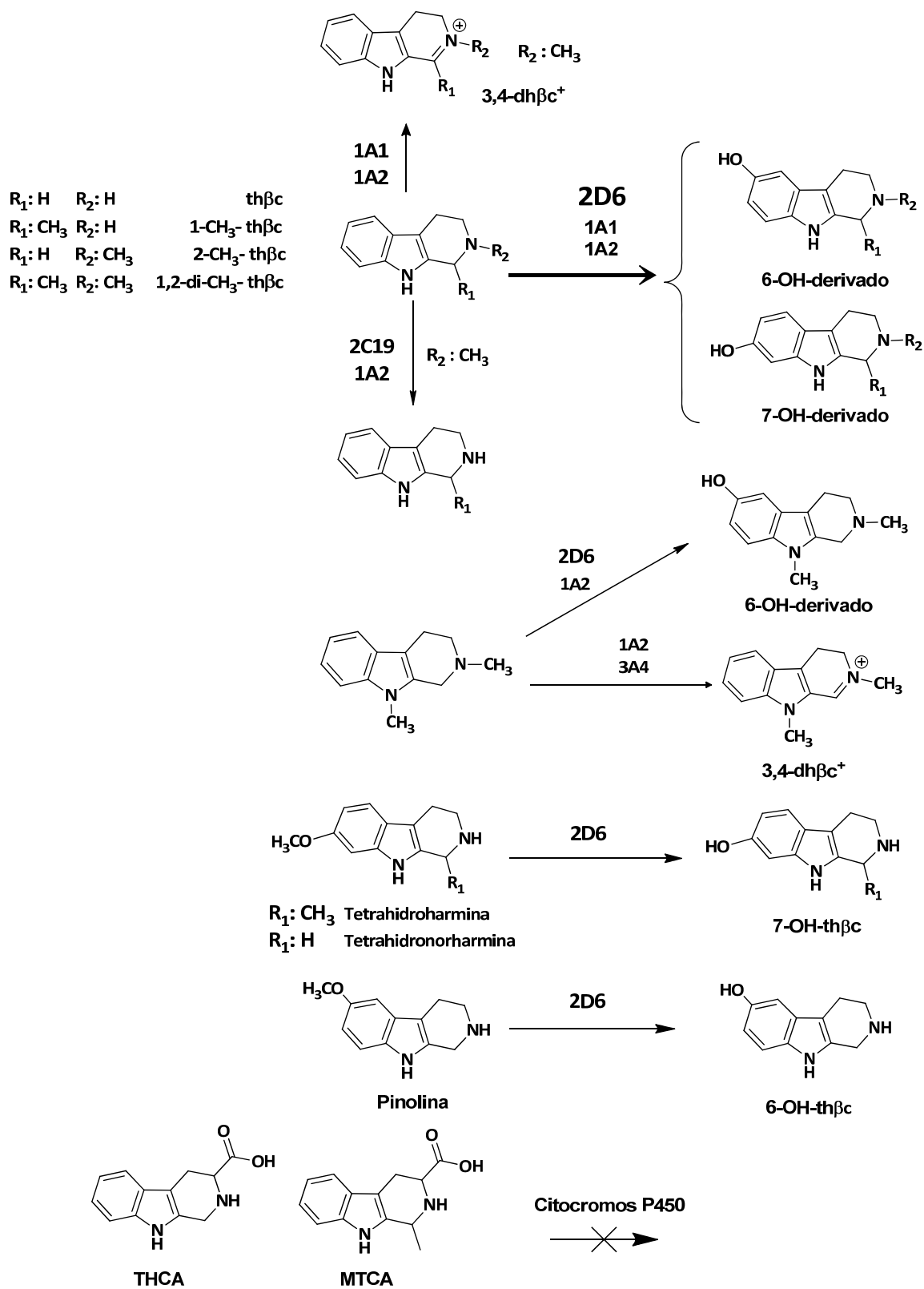


Figura 3.19 Biotransformación de th $\beta$ c<sub>s</sub> por enzimas citocromo P450.

### 3.1.2. *N*-Metiltetrahidropiridinas (MPTP) y *N*-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>).

A finales de los años 70 se detectó un tipo de enfermedad neurodegenerativa similar a la enfermedad de Parkinson en consumidores habituales de meperidina, un análogo sintético de la heroína<sup>110 214</sup>. La causa de esta enfermedad se debió a un contaminante producido durante la síntesis, que fue identificado como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (véase **Figura 3.20**). El MPTP cruza la barrera hematoencefálica y da lugar a la especie catiónica *N*-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>), que actúa como neurotoxina dañando las células dopaminérgicas de la sustancia negra del cerebro y causando enfermedad de Parkinson irreversible. La bioactivación del MPTP se produce por acción de la enzima monoaminoxidasa (MAO-B) que cataliza su oxidación a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio (MPDP<sup>+</sup>), que a su vez se oxida a 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>)<sup>80 214 215</sup>. El MPP<sup>+</sup> se capta selectivamente por las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT) y se concentra en la matriz mitocondrial inhibiendo la cadena de transporte de electrones y provocando la muerte celular.

El MPTP se utiliza actualmente como modelo experimental para inducir enfermedad de Parkinson en animales<sup>216</sup>. Tras el descubrimiento de esta neurotoxina, se ha especulado con la posibilidad de que ésta u otras enfermedades neurodegenerativas se inicien por la acción de toxinas ambientales o endógenas de manera análoga. Compuestos como la rotenona, 6-hidroxi-dopamina y los pesticidas paraquat y diquat, generan neurodegeneración a nivel experimental. Asimismo, las  $\beta$ -carbolinas podrían actuar como posibles neurotoxinas<sup>105 115 217</sup>. Las 2-metiltetrahydro- $\beta$ -carbolinas (2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c<sub>5</sub>) tienen cierta semejanza estructural con el MPTP (incluyendo un puente de nitrógeno adicional), y los cationes aromáticos  $\beta$ -carbolinio ( $\beta$ c<sub>5</sub><sup>+</sup>), por su parte, con el MPP<sup>+</sup> (véase **Figura 3.20**). Los cationes  $\beta$ c<sub>5</sub><sup>+</sup> podrían generarse en el organismo por reacciones enzimáticas de oxidación y de *N*-metilación a partir de las th $\beta$ c<sub>5</sub> y  $\beta$ c<sub>5</sub> presentes en productos naturales y alimentos<sup>109 218 219 220 221</sup>. El MPP<sup>+</sup> y los cationes  $\beta$ c<sub>5</sub><sup>+</sup> tienen propiedades funcionales y toxicológicas parecidas. Ambos son sustratos del transportador DAT, inhiben la respiración mitocondrial, producen un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), son tóxicos en cultivos neuronales induciendo apoptosis y producen neurotoxicidad en modelos animales. Los cationes  $\beta$ c<sub>5</sub><sup>+</sup><sup>222</sup> son potentes neurotoxinas aunque menos selectivos que el MPP<sup>+</sup><sup>223</sup>. Sin embargo, al contrario que las especies MPTP/MPP<sup>+</sup>, las  $\beta$ c<sub>5</sub> y los cationes  $\beta$ c<sub>5</sub><sup>+</sup> se encuentran en alimentos y plantas<sup>25 104 224</sup>, y se han detectado en cerebro humano<sup>102 225 226</sup>. Por ello, algunos investigadores creen que una exposición crónica a estos compuestos podría inducir neurodegeneración en sujetos predispuestos genéticamente. La toxicidad del MPTP depende de su bioactivación enzimática y de su metabolismo. El metabolismo (bioactivación) por enzimas MAO es esencial y, por ello, los inhibidores de MAO-B son neuroprotectores<sup>227</sup>. Por otro lado, el metabolismo de esta neurotoxina y de sus análogos por enzimas del citocromo P450 podría suponer una posible vía de detoxificación tanto a nivel hepático como en tejidos extrahepáticos<sup>123 125 212 228</sup>. En esta memoria, se investigó la biotransformación metabólica del MPTP y de los compuestos de piridinio por el sistema citocromo P450.

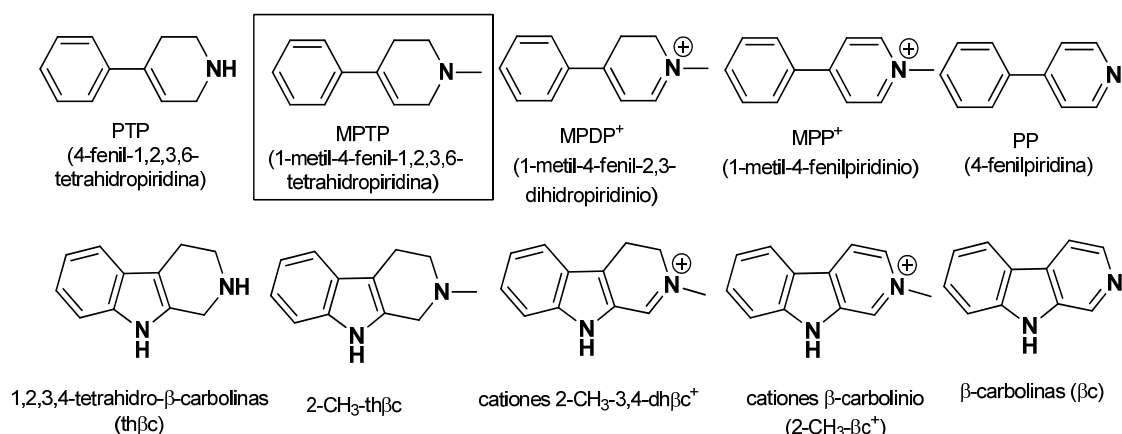
### 3.1.2.1. Biotransformación del MPTP por citocromos P450

Se incubó MPTP con enzimas citocromo P450 (1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) por separado y tras el análisis de los medios de incubación se detectaron varios metabolitos que variaron en función de la enzima implicada, y que se identificaron mediante HPLC-MS (ionización por electrospray), DAD y por coelución con los correspondientes estándares como: 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (PTP), 4-(4'-hidroxifenil)-1-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP-OH), 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio (MPDP<sup>+</sup>) y 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>) (véase la **Tabla 3.4**). En la **Figura 3.22** se muestra un cromatograma típico correspondiente a la biotransformación del MPTP por el citocromo P450 2D6.

En la **Figura 3.21** se muestra el perfil de metabolitos producido en la biotransformación metabólica. El metabolito PTP (producido por *N*-desmetilación del MPTP) se produjo principalmente por el citocromo P450 2D6; en menor proporción por 1A2 y 2C19 y residualmente por 2E1 y 3A4. El metabolito hidroxilado MPTP-OH (producido por hidroxilación aromática del MPTP) se produjo exclusivamente con la participación del citocromo P450 2D6, no observándose contribución de otras enzimas. Los compuestos de oxidación del anillo de tetrahidropiridina MPDP<sup>+</sup> y MPP<sup>+</sup> se formaron en presencia de los citocromos P450 1A2, 2D6, 2C19 y 3A4, siendo las principales contribuyentes 1A2 y 2D6.

Mediante ensayos de inhibición selectiva (véase **Figura 3.23**) se demostró que la quinidina (inhibidor del citocromo P450 2D6), inhibió la metabolización producida por 2D6 a PTP y a MPTP-OH (valores de IC<sub>50</sub> de 43.7 nM para la reacción de *N*-desmetilación y de 33.8 nM para la reacción de hidroxilación aromática, respectivamente). La  $\alpha$ -naftoflavona, un inhibidor selectivo del citocromo P450 1A2, inhibió la metabolización del MPTP por esta enzima para dar los metabolitos PTP y MPDP<sup>+</sup>. La fluvoxamina, un inhibidor selectivo del citocromo P450 2C19, inhibió la metabolización de MPTP por este citocromo para dar PTP. Estos datos confirman la participación de los citocromo P450 señalados en el metabolismo del MPTP (**Figura 3.21**).

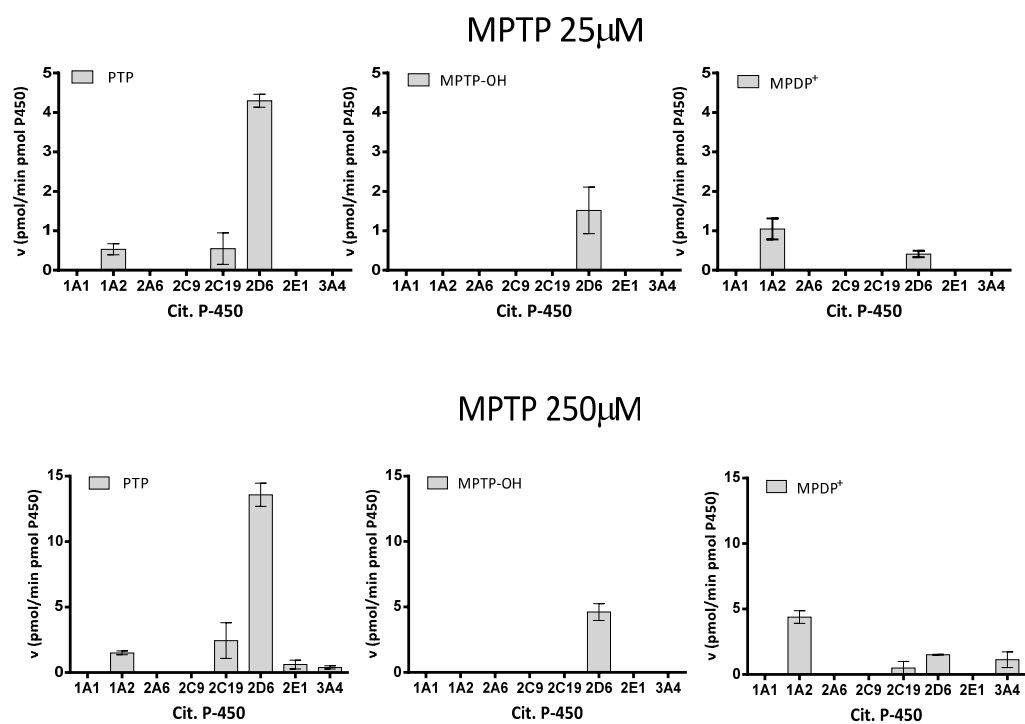
El citocromo P450 2D6 fue la principal enzima implicada en la biotransformación del MPTP. A continuación se estudiaron la cinéticas de formación de PTP (ruta de *N*-desmetilación), MPTP-OH (ruta de hidroxilación) y de MPDP<sup>+</sup>/MPP<sup>+</sup> (ruta de deshidrogenación aromática) por este citocromo en función de la concentración de sustrato, obteniéndose las gráficas de la **Figura 3.24** y la **Figura 3.25**. En la **Tabla 3.5** se recogen los parámetros cinéticos ( $V_{max}$  y  $K_m$ , así como de la relación  $V_{max}/K_m$ ) para los metabolitos formados. En base a estos datos, el PTP se produjo con mejor eficacia metabólica que el MPTP-OH, y sobre todo que el MPDP<sup>+</sup>. Así pues, la reacción de *N*-desmetilación es la predominante en el metabolismo por el citocromo P450 2D6, seguido de la hidroxilación aromática. La relación  $V_{max}/K_m$  indica que el MPDP<sup>+</sup> (y MPP<sup>+</sup>) son metabolitos minoritarios del citocromo P450 2D6 en comparación con PTP y MPTP-OH. No obstante, su formación por este citocromo se confirmó mediante inhibición con quinidina y los dos metabolitos siguieron un patrón de comportamiento similar (véase **Figura 3.25**).



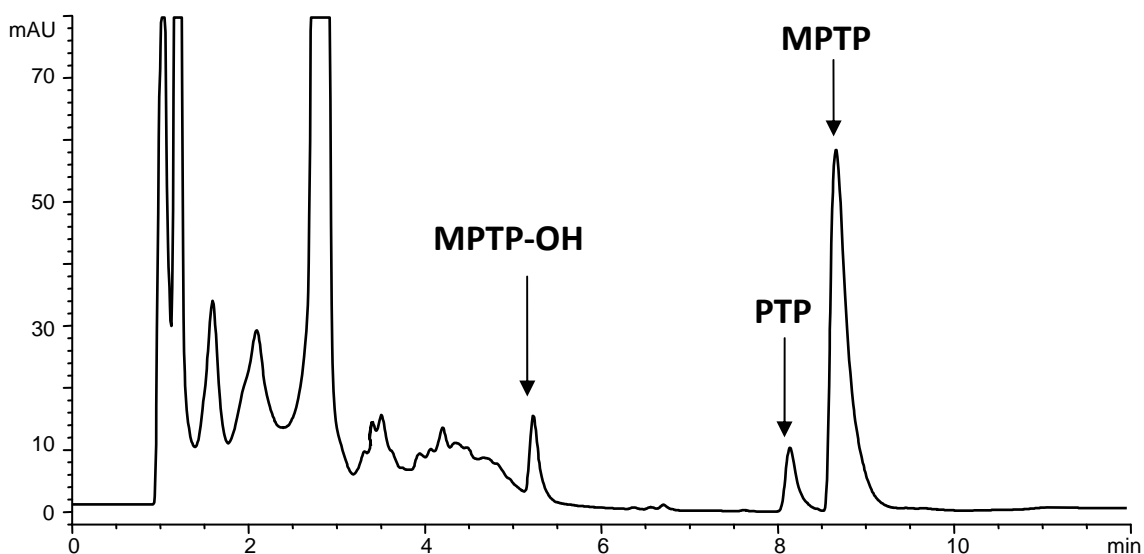
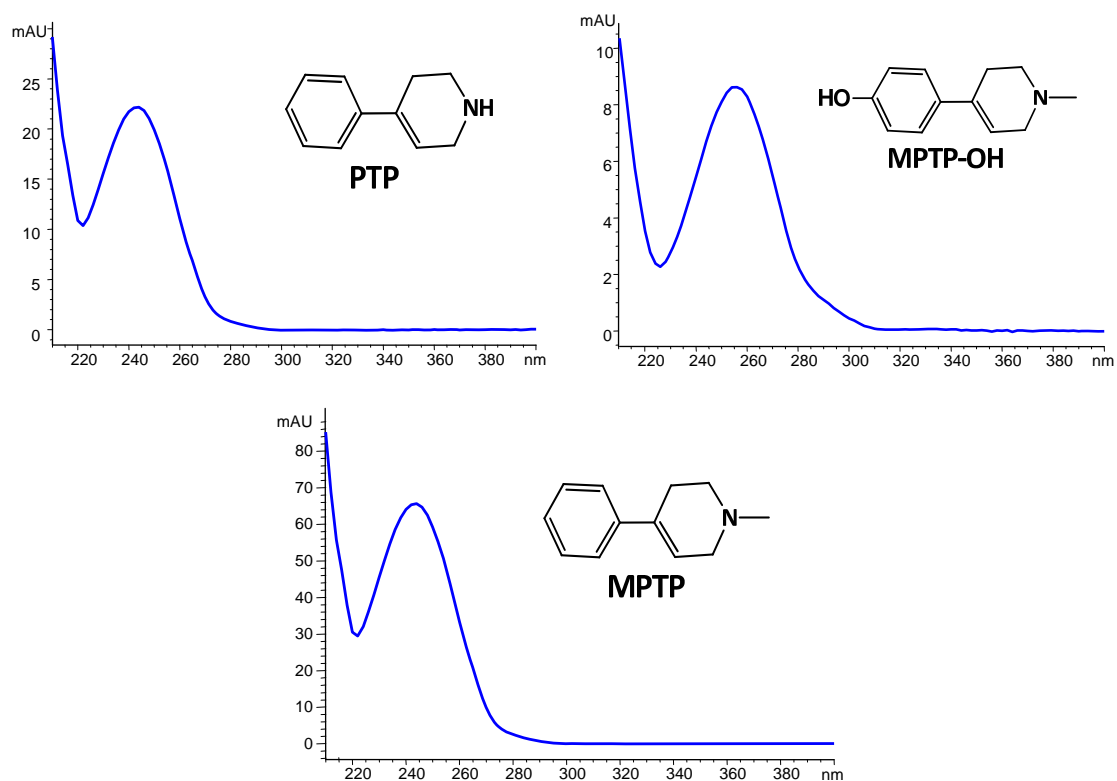
**Figura 3.20** Analogía entre la neurotoxina MPTP y 2-metiltetrahydro-β-carbolina (2-CH<sub>3</sub>-thβc), y entre el MPP<sup>+</sup> y los cationes β-carbolinio (βc<sup>s</sup>).

Compuesto	Metabolitos		
	tr (min)	m/z (%) ESI (70 V) (M+H) <sup>+</sup>	Nombre
<b>MPTP</b> (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) tr 13.5 min. MS: 174 (M+H) <sup>+</sup>	10.55	190 (100 %)	MPTP-OH
	13.26	160 (100 %)	PTP
	12.5	172 (100 %)	MPDP <sup>+</sup>
	12.3	170 (100 %)	MPP <sup>+</sup>

**Tabla 3.4** Metabolitos del MPTP identificados por HPLC-MS (electrospray positivo) en los medios de incubación con citocromos P450. Col. Zorbax-SB-C18 (0.25 mL/min). Eluyente A: ácido fórmico 0.5 %; eluyente B: ácido fórmico 0.5 % en ACN. Programa: 80 % B en 30 min. Las estructuras se recogen en las Figuras 3.20 y 3.22.



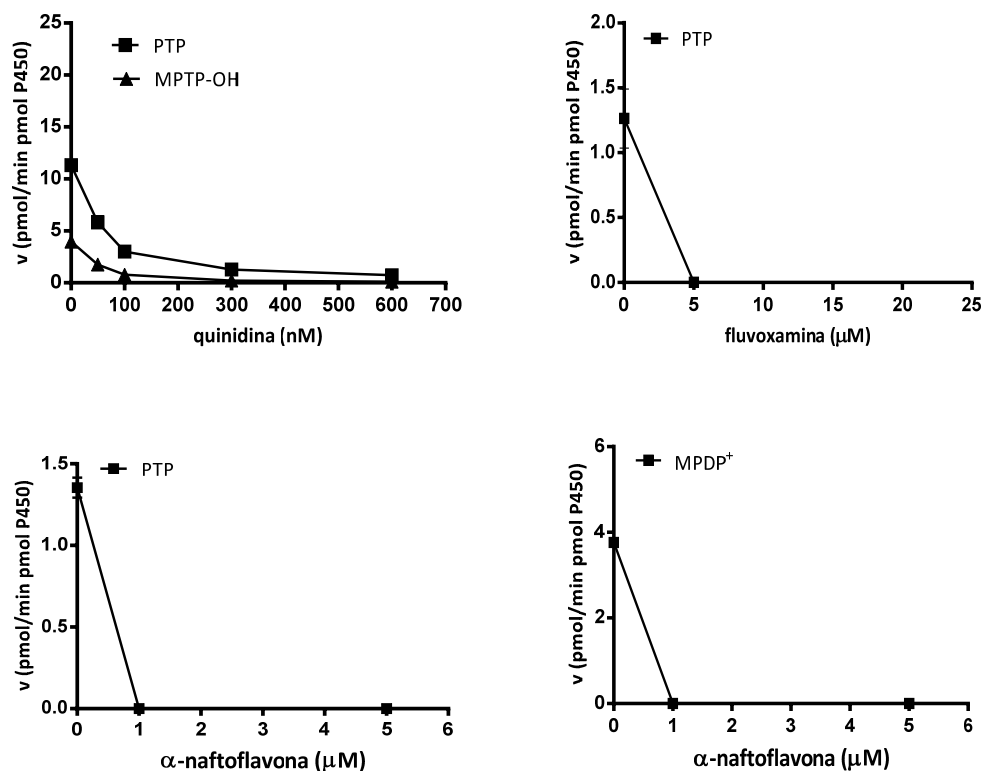
**Figura 3.21** Biotransformación de MPTP (25 y 250 μM) por citocromos P450 (35 pmoles cit. P450/mL) para dar los metabolitos PTP, MPTP-OH y MPDP<sup>+</sup> (el MPP<sup>+</sup> se comporta cualitativamente como el MPDP<sup>+</sup>).



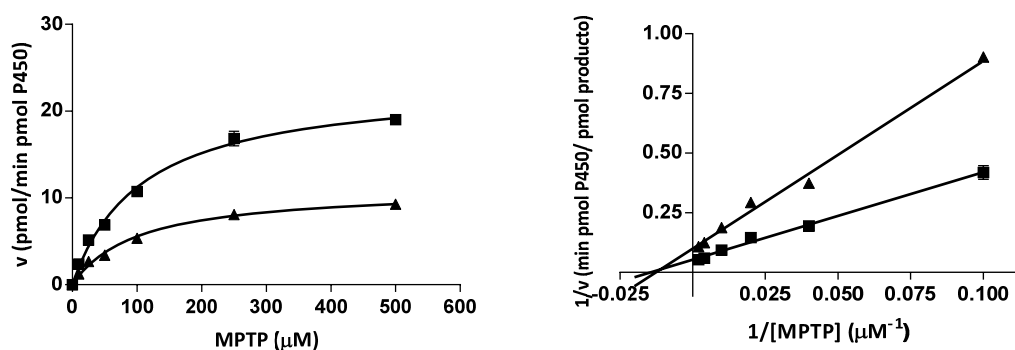
**Figura 3.22** Cromatograma obtenido por RP-HPLC (Novapak C18) con detección DAD (254 nm) de un medio de incubación de MPTP (25  $\mu$ M) con citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL). En el cromatograma se observan los metabolitos PTP y MPTP-OH. Los metabolitos MPDP<sup>+</sup> y MPP<sup>+</sup> no se observan a 254 nm sino a 355 y 280 nm.

metabolito	$V_{max}$ (pmol/min/pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$K_m/V_{max}$ ( $\mu$ L min <sup>-1</sup> pmol <sup>-1</sup> P450)
PTP	18.95 $\pm$ 0.6	69.6 $\pm$ 2.2	0.27
MPTP-OH	10.09 $\pm$ 1.1	79.4 $\pm$ 3.0	0.127
MPDP <sup>+</sup>	2 $\pm$ 0.14	107 $\pm$ 7.5	0.019

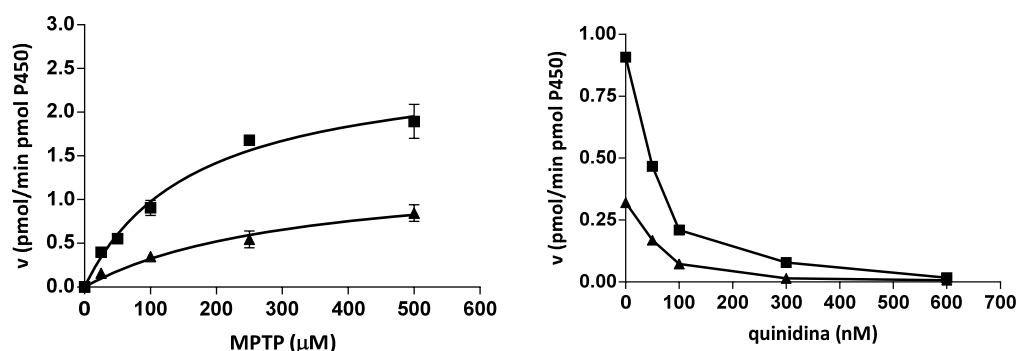
**Tabla 3.5** Parámetros cinéticos determinados para la metabolización del MPTP por el citocromo P450 2D6. Los metabolitos determinados son PTP (ruta de *N*-desmetilación), MPTP-OH (ruta de *p*-hidroxilación aromática), y MPDP<sup>+</sup> (ruta de deshidrogenación aromática).



**Figura 3.23 (ARRIBA IZQUIERDA)** Inhibición con quinidina (0-600 nM) de la metabolización de MPTP (100 μM) por el citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL) a MPTP-OH y PTP. **(ARRIBA DERECHA)** Inhibición de la metabolización de MPTP (250 μM) a PTP por el citocromo P450 2C19 (35 pmoles cit. P450/mL) en presencia de fluvoxamina (0-5 μM). **(ABAJO)** Inhibición de la metabolización de MPTP (250 μM) por el citocromo P450 1A2 (35 pmoles cit. P450/mL) a PTP o MPDP<sup>+</sup> en presencia de α-naftoflavona (0-5 μM).



**Figura 3.24 (IZQUIERDA)** Formación de los metabolitos PTP (■) y MPTP-OH (▲) desde MPTP por el citocromo P450 2D6. **(DERECHA)** Curva de Lineweaver-Burk de los mismos metabolitos.



**Figura 3.25 IZQUIERDA** Curva de metabolización de MPTP por el citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL) a MPDP<sup>+</sup> (■) y MPP<sup>+</sup> (▲) **DERECHA** Curva de inhibición con quinidina de la metabolización de MPTP (250 μM) por el citocromo P450 2D6 a los mismos metabolitos.

### 3.1.2.2. Metabolismo del MPTP por microsomas hepáticos.

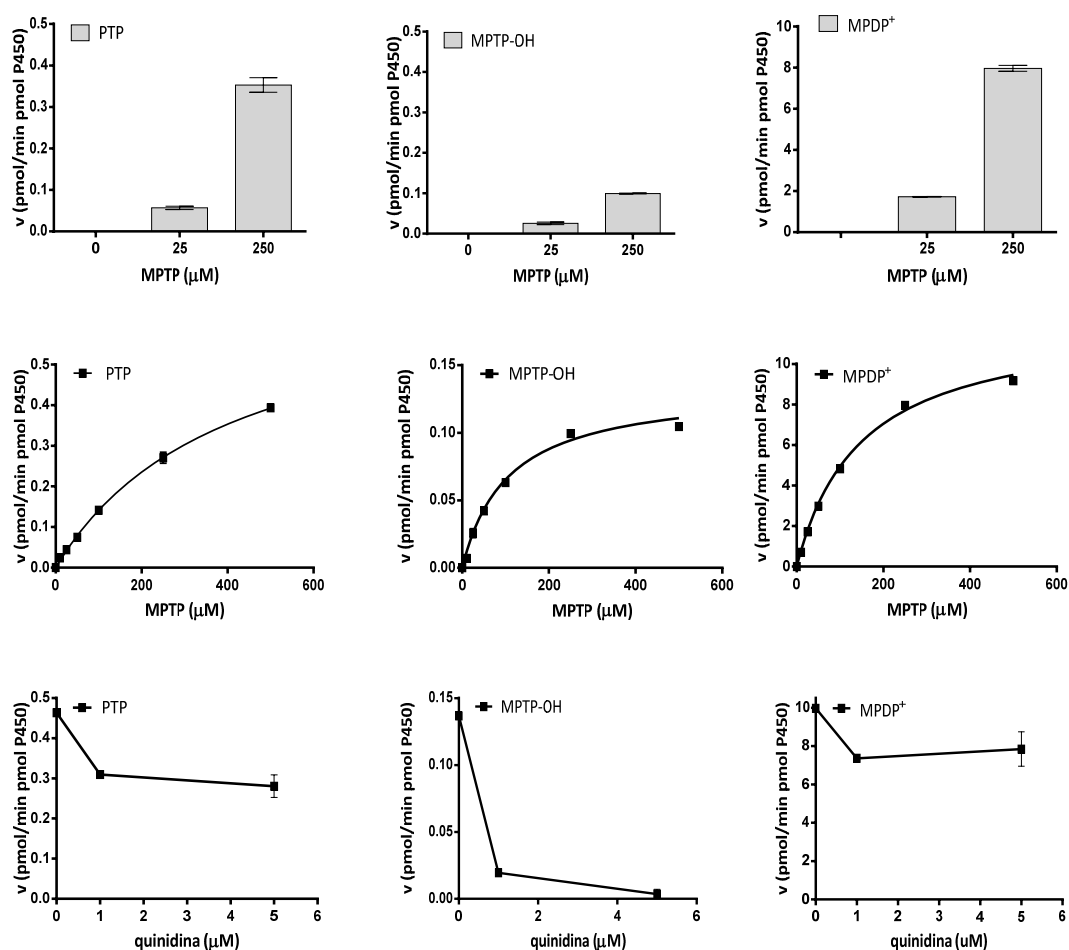
El metabolismo del MPTP por microsomas hepáticos dio lugar a los mismos metabolitos detectados con las enzimas aisladas; es decir: PTP, MPTP-OH, MPDP<sup>+</sup> y MPP<sup>+</sup> (véase **Figura 3.26**). En presencia de quinidina se produjo una reducción clara de la formación de MPTP-OH, indicando que su formación por hidroxilación aromática se debe principalmente al citocromo P450 2D6 (**Figura 3.26**). En cambio, la formación del PTP se redujo solo parcialmente por quinidina, sugiriendo que hay otras enzimas implicadas en la *N*-desmetilación del MPTP. En el apartado anterior se había observado que el PTP se producía también con la participación de otras enzimas, además del citocromo P450 2D6. La formación del MPDP<sup>+</sup> (y de MPP<sup>+</sup>) fue comparativamente alta en microsomas. No se inhibió por quinidina (**Figura 3.26**), pero se inhibió (87 %) en presencia de los inhibidores de la enzima MAO, clorgilina y deprenyl (2 μM). Estos datos sugieren que esta oxidación se produce por la posible presencia residual de MAO en la preparación de microsomas<sup>206</sup>. Las curvas de metabolización del MPTP por microsomas obtenidas variando la concentración de sustrato se recogen en la **Figura 3.26** y los parámetros cinéticos en la **Tabla 3.6**. Los valores cinéticos de  $V_{\max}$  y la relación  $V_{\max}/K_m$  indican que la formación de PTP (ruta de *N*-desmetilación) es más eficiente que la de MPTP-OH (ruta de hidroxilación aromática) en microsomas hepáticos.

En resumen, la neurotoxina MPTP se metaboliza por varios citocromos P450 (véase **Figura 3.28**) para dar los metabolitos: PTP, MPTP-OH, MPDP<sup>+</sup> y MPP<sup>+</sup>. Estos metabolitos se producen por los citocromos P450 2D6, 1A2, 2C19, 2E1 y 3A4 (formación de PTP), 2D6 (formación de MPTP-OH), y 1A2, 2D6, 2C19 y 3A4 (formación de MPDP<sup>+</sup>). El metabolismo mediante *p*-hidroxilación aromática para dar MPTP-OH es característico del citocromo P450 2D6 mientras que la reacción de *N*-desmetilación para dar PTP se produce en gran parte por el citocromo P450 2D6 junto a 1A2 y 2C19.

Así pues, la metabolización de la neurotoxina MPTP depende en gran medida del citocromo P450 2D6. Al ser éste polimórfico, el metabolismo de esta neurotoxina podría sufrir variaciones importantes dependiendo del genotipo individual<sup>206</sup>. De hecho, se comprobó experimentalmente que la metabolización por el citocromo P450 2D6\*10 (alelo asiático) para dar PTP y MPTP-OH fue del 3% y 6%, respectivamente, de la del citocromo P450 2D6\*1 (alelo común) para dar los mismos metabolitos<sup>123</sup>. Por otro lado, la comparación de los datos del metabolismo del MPTP con los de las thβc<sub>s</sub>, indica que estas últimas proporcionan, en general, valores más altos de  $V_{\max}$  y más bajos de  $K_m$  (poseen más afinidad). Por tanto, las thβc<sub>s</sub> son mejores sustratos para los citocromos P450 y se metabolizarían mejor por P450 2D6 que el MPTP.

metabolito	$V_{max}$ (pmol/min/pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L min <sup>-1</sup> pmol <sup>-1</sup> P450)
PTP	$0.71 \pm 0.044$	$402.9 \pm 44.2$	0.0018
MPTP-OH	$0.13 \pm 0.006$	$105.3 \pm 13.8$	0.0012

**Tabla 3.6** Parámetros cinéticos determinados para la metabolización de MPTP por microsomas hepáticos humanos a PTP (ruta de *N*-desmetilación) y MPTP-OH (ruta de *p*-hidroxilación).



**Figura 3.26 (ARRIBA)** Biotransformación de MPTP (25 y 250  $\mu$ M) por microsomas hepáticos (232 pmoles cit. P450/mL). **(MEDIO)** Curvas de metabolización de MPTP (0-500  $\mu$ M) por microsomas hepáticos humanos (232 pmoles cit. P450/mL) para dar PTP, MPTP-OH y MPDP<sup>+</sup>. **(ABAJO)** Inhibición en presencia de quinidina (0-5  $\mu$ M) de la biotransformación metabólica de MPTP (250  $\mu$ M) por microsomas hepáticos.

### 3.1.2.3. Biotransformación de 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>) y 4-fenilpiridina (PP) por citocromos P450.

El compuesto MPP<sup>+</sup> es el responsable último de la toxicidad del MPTP. Se estudió su posible biotransformación por enzimas del citocromo P450 (1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) (35 pmoles cit. P450/mL). Los resultados analíticos no mostraron metabolización alguna del MPP<sup>+</sup> (**Tabla 3.7**). Estos datos indican que el MPP<sup>+</sup> es estable a su biotransformación mediante hidroxilación o *N*-desmetilación por citocromos, y esta característica podría tener relación con sus propiedades tóxicas.

Compuesto	Metabolitos		
	tr (min)	<i>m/z</i> (%) ESI(+) (100 V)	Nombre
<b>MPP<sup>+</sup></b> (1-metil-4-fenilpiridinio) tr 12.2 min MS ( <i>m/z</i> ): 170 (M+H) <sup>+</sup>	-	- <sup>1</sup>	-
<b>PP</b> (4-fenilpiridina) tr 10.1 min. MS ( <i>m/z</i> ): 156 (M+H) <sup>+</sup>	15.05	(100 V) 172 (M+H) <sup>+</sup> (100 %), 155 (M+H-OH) <sup>+</sup> (5 %) (170 V) 172 (M+H) <sup>+</sup> (60 %), 155 (M+H-OH) <sup>+</sup> (100 %)	PP- <i>N</i> -óxido

**Tabla 3.7** Metabolitos identificados por HPLC-MS (electrospray positivo) (Columna Zorbax-SB C18) en los medios de incubación de MPP<sup>+</sup> y de PP con citocromos P450. <sup>1</sup>No se encontraron metabolitos

En cambio, los mismos citocromos sí metabolizaron el compuesto 4-fenilpiridina (PP) (véase **Figura 3.20**), demostrándose la formación de un metabolito mayoritario que se identificó como 4-fenilpiridina-*N*-óxido mediante HPLC-MS (ESI) (*m/z*= 172 (M+H)<sup>+</sup>, *m/z*=155 (-17 u)), DAD y coelución con un estándar. Su formación se produjo principalmente por el citocromo P450 2E1 y en menor proporción por 3A4 (véase **Figura 3.27**). La metabolización de este compuesto por enzimas del citocromo P450 podría tener que ver con su ausencia de toxicidad en comparación con el MPP<sup>+</sup> <sup>229</sup>.

La **Figura 3.28** recoge un esquema del metabolismo de la neurotoxina MPTP de acuerdo con los resultados anteriores y con otros de la literatura relativos a la enzima MAO. Esta neurotoxina se metaboliza por citocromos P450 para dar lugar a varios metabolitos entre los que cabe destacar el compuesto MPTP-OH (reacción de *p*-hidroxilación aromática) y el PTP (reacción de *N*-desmetilación). Estos dos metabolitos no se consideran tóxicos <sup>230 231 232</sup>, por lo que estas dos vías de metabolización podrían considerarse rutas de detoxificación del MPTP. Los citocromos P450 que contribuyen a esta detoxificación son principalmente 2D6, en menor proporción 1A2 y 2C19 y residualmente 2E1 y 3A4. Por tanto, estas enzimas podrían contribuir a la protección contra la neurotoxina MPTP <sup>123 212</sup>. De hecho, el citocromo P450 2D6 se ha relacionado con la protección frente a enfermedades neurodegenerativas <sup>211 212 233 234</sup>. Por otro lado, en los resultados descritos en esta memoria, también se ha detectado cierta oxidación del MPTP a los cationes piridinio (MPDP<sup>+</sup>) tóxicos (ruta de activación

toxicológica) por varios citocromos P450 (1A2, 2D6, 3A4 y 2C19). Sin embargo, esta vía es claramente minoritaria en comparación con la vía de activación toxicológica propiciada por la enzima monoaminoxidasa (MAO)<sup>123 234</sup>. Por último, el catión piridinio MPP<sup>+</sup> es estable frente a los citocromos P450, lo cual puede favorecer su acción tóxica.

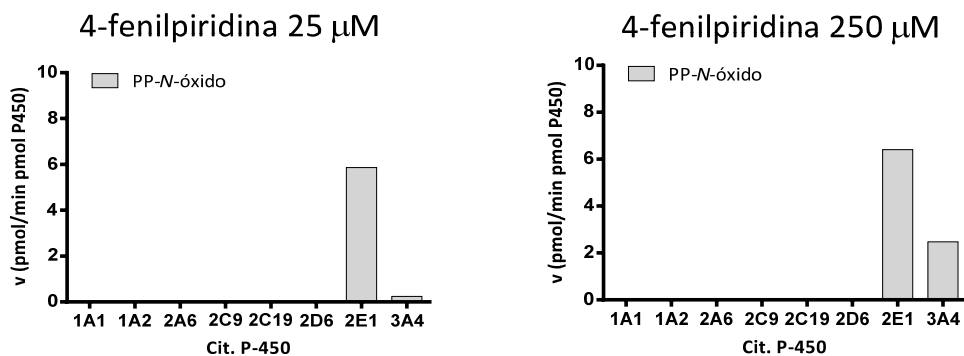


Figura 3.27 Biotransformación de 4-fenilpiridina (PP) a 4-fenilpiridina-*N*-óxido por citocromos P450.

Las  $th\beta c_s/\beta c_s$  tienen cierta analogía con el MPTP/MPP<sup>+</sup> (véase la **Figura 3.20**). Estos compuestos se oxidan y se metilan para dar cationes 2-metil- $\beta$ -carbolinio (2-CH<sub>3</sub>- $\beta c_s^+$ ) que son agentes neurotóxicos funcionalmente parecidos al MPP<sup>+</sup><sup>109 119</sup>. Por esta razón tiene interés evaluar la biotransformación metabólica de las especies MPTP/MPP<sup>+</sup> comparada con las especies  $th\beta c_s/\beta c_s$ . Según los resultados obtenidos, tanto las  $th\beta c_s$  como el MPTP son metabolizados con participación principal del citocromo P450 2D6, aunque comparativamente las  $th\beta c_s$  fueron mejores sustratos de este citocromo que el MPTP. Por otra parte, al comparar la metabolización de los cationes MPP<sup>+</sup> con los cationes 2-metil- $\beta$ -carbolinio (2-CH<sub>3</sub>- $\beta c_s^+$ ) (véase apartado correspondiente, más adelante), hay que resaltar que no se observó metabolización del MPP<sup>+</sup>, pero, en cambio como se verá en el apartado correspondiente, sí se observó metabolización de los cationes  $\beta c_s^+$  por varias enzimas y particularmente por el citocromo P450 2D6. Estos resultados sugieren que al ser este citocromo una variante altamente polimórfica, podrían producirse diferencias interindividuales en el metabolismo de MPTP,  $th\beta c_s$ , y de  $\beta c_s^+$ .

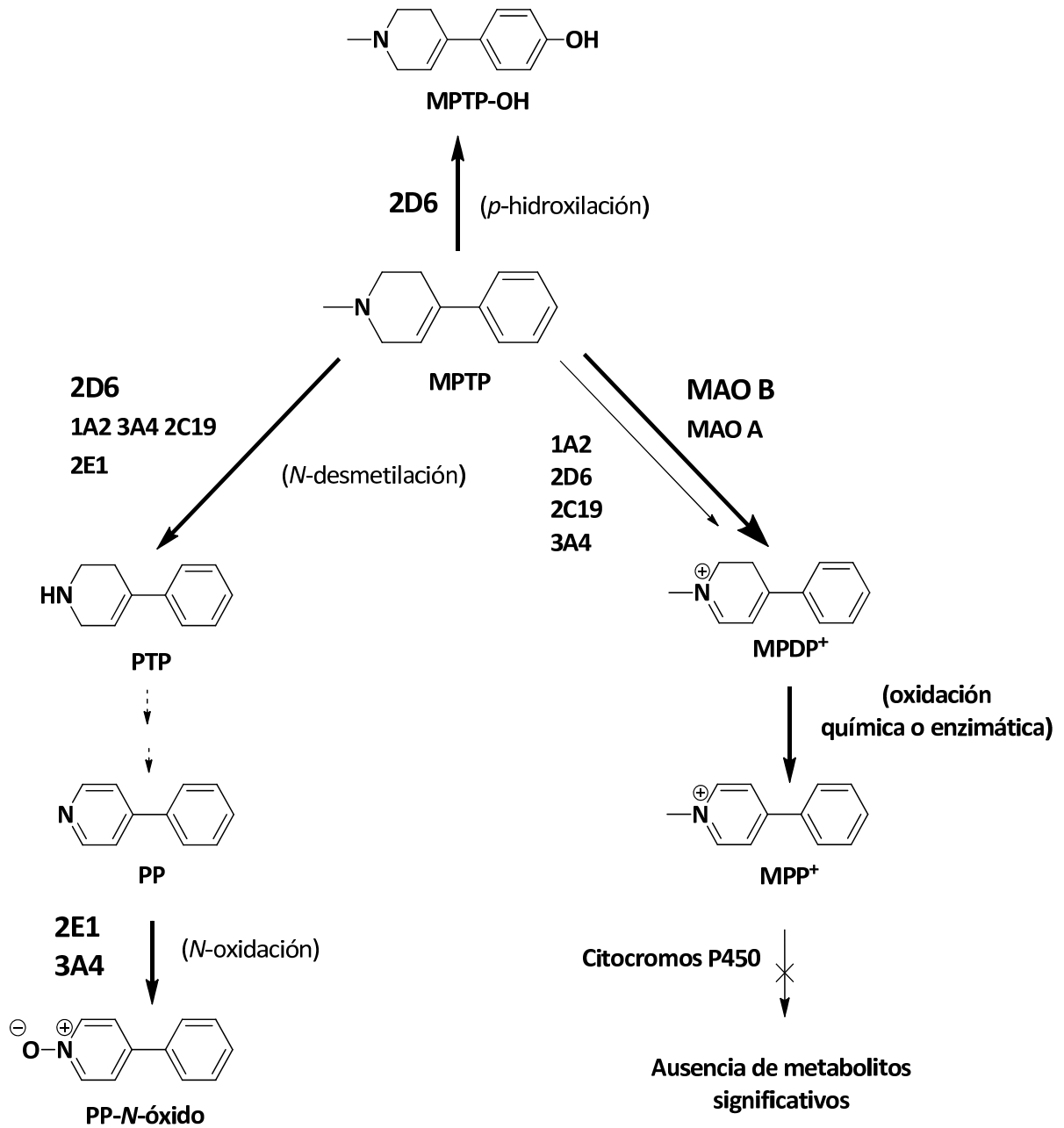


Figura 3.28 Esquema de la metabolización de la neurotoxina MPTP por citocromos P450.

### 3.1.3. Las $\beta$ -carbolinas ( $\beta$ c<sub>s</sub>) aromáticas y las metoxi- $\beta$ -carbolinas.

#### 3.1.3.1. Las $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas.

Los heterociclos norharmano y harmano (véase la **Figura 3.29**) son alcaloides simples del tipo  $\beta$ c aromática detectados en alimentos y plantas (véase introducción). Estas  $\beta$ c<sub>s</sub> se absorben relativamente bien y ejercen efectos psicofarmacológicos. Son también objeto de atención toxicológica debido a su conversión en cationes carbolinio ( $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup>), y a que son agentes comutágenos en presencia de aminas aromáticas como anilina y toluidina<sup>96,97</sup>. La presencia de  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas en los fluidos y tejidos biológicos, en alimentos y en muestras ambientales (por ejemplo el humo del tabaco), indica la exposición humana continuada a estas sustancias<sup>24, 25, 235</sup>. Es lógico pensar que el metabolismo y la biotransformación de  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas desempeñan un papel crucial en la actividad de estas sustancias, así como en su detoxificación y/o bioactivación. Sin embargo, existen escasos precedentes dedicados a este asunto<sup>175</sup>. El objetivo de esta Tesis Doctoral fue investigar la biotransformación y el metabolismo de las  $\beta$ c aromáticas por citocromos P450. Los resultados se presentan a continuación.

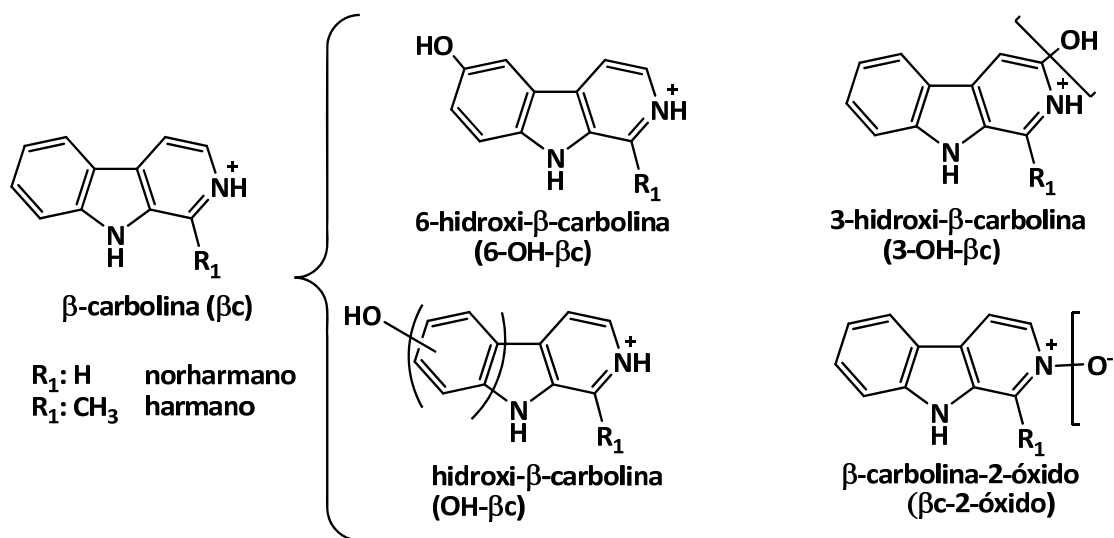
##### 3.1.3.1.1. Biotransformación metabólica de $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas por citocromos P450.

Las  $\beta$ c<sub>s</sub> norharmano y harmano se incubaron por separado con enzimas citocromo P450 (1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4), y tras el correspondiente análisis cromatográfico de los medios de incubación se detectaron varios metabolitos que variaron según el citocromo P450, y que fueron identificados mediante HPLC-MS (ionización en electrospray a distintas condiciones de fragmentación), espectros de absorción obtenidos por DAD y por coelución con los correspondientes estándares, como compuestos de hidroxilación aromática (véase **Tabla 3.8** y **Figura 3.29**). En la **Figura 3.30** se muestran cromatogramas tipo correspondientes a la biotransformación del norharmano y harmano por los citocromos P450 1A2 y P450 2E1 respectivamente, junto con los espectros de absorción obtenidos por DAD correspondientes a los picos cromatográficos identificados.

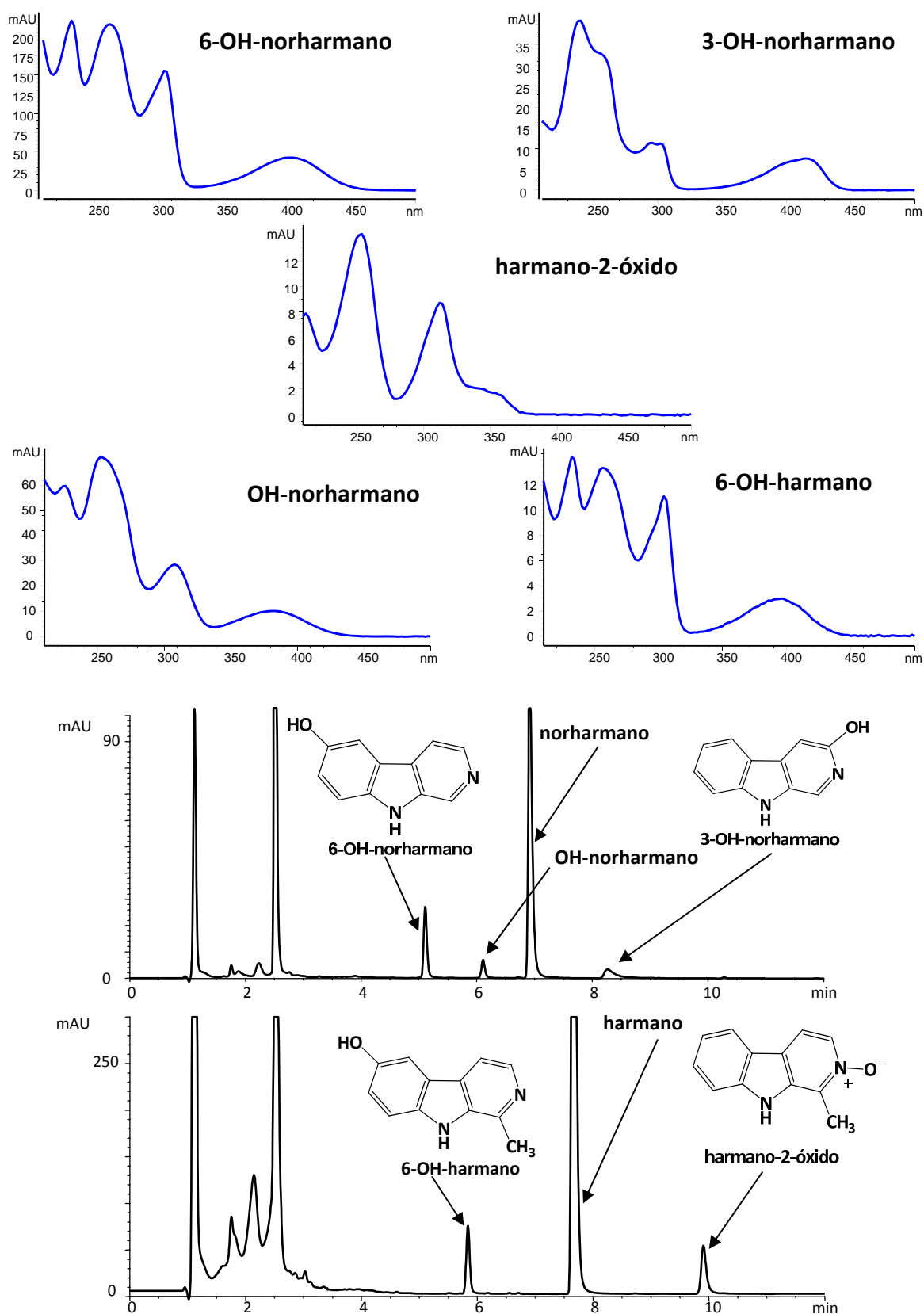
Dependiendo de la enzima implicada (véase más adelante de este apartado), el norharmano dio lugar a 6-OH-norharmano, 3-OH-norharmano (que puede estar como  $\beta$ -carbolina-3-ona), OH-norharmano, cuya posición de hidroxilación no se determinó, y norharmano-2-óxido. El mismo patrón de metabolitos se observó para la biotransformación del harmano (**Tabla 3.8**). En la **Figura 3.31** se recoge el perfil de metabolitos así como la contribución de cada citocromo a la biotransformación de  $\beta$ c<sub>s</sub>. En términos cuantitativos, el compuesto 6-OH- $\beta$ c fue el principal metabolito seguido por 3-OH- $\beta$ c y  $\beta$ c-2-óxido.

Compuesto	Metabolitos		
	tr (min)	m/z –ESI (+)- (100 V)	nombre
<b>Norharmano</b> tr 6.9 min. MS (m/z):169 (M+H) <sup>+</sup> (100 %)	5.8	185 (M+H) <sup>+</sup> (100 %)	6-OH-norharmano
	6.47	185 (M+H) <sup>+</sup> (100 %)	OH-norharmano
	9.7	185 (M+H) <sup>+</sup> (100 %), 167 (M+H-18) <sup>+</sup> (15 %)	3-OH-norharmano
	10.9	185 (M+H) <sup>+</sup> (100 %), 168 (M+H-OH) <sup>+</sup> (20 %)	norharmano-2-óxido
<b>Harmano</b> tr 7.7 min. MS (m/z): 183 (M+H) <sup>+</sup> (100 %)	6.6	199 (M+H) <sup>+</sup> (100 %)	6-OH-harmano
	7.1	199 (M+H) <sup>+</sup> (100 %)	OH-harmano
	10.2	199 (M+H) <sup>+</sup> (100 %), 181 (M+H-18) <sup>+</sup> (5 %)	3-OH-harmano
	11.4	199 (M+H) <sup>+</sup> (100 %), 182 (M+H-OH) <sup>+</sup> (35 %)	harmano-2-óxido

**Tabla 3.8** Metabolitos identificados por HPLC-MS (electrospray positivo) en los medios de incubación de  $\beta_c$  aromáticas con citocromos P450. La abundancia de fragmentación cambia con el voltaje de fragmentación (energía de colisión). Se utilizó una columna Novapak C18 (150 x 3.9 mm) (0.7 mL/min). Eluyente A: ácido acético 0.5 %; eluyente B: 20 % A en acetonitrilo. Programa: 60 % B en 15 min.

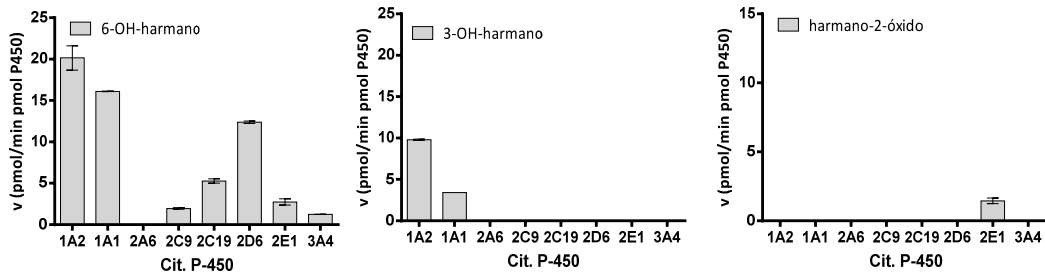


**Figura 3.29**  $\beta_c$  aromáticas y sus metabolitos detectados por HPLC-MS en la biotransformación por citocromos P450.

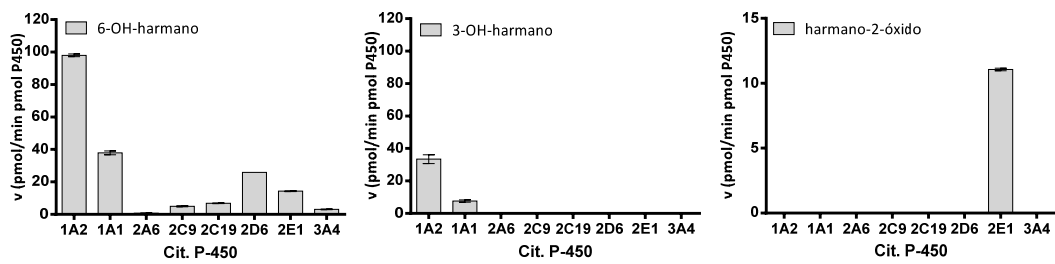


**Figura 3.30** Cromatogramas de HPLC (DAD a 254 nm) (Col. Novapak C18) de las reacciones de metabolización de las  $\beta_c$  norharmano (250  $\mu$ M) con citocromo P450 1A2 (35 pmoles cit. P450/mL) (**MEDIO**) y harmano (250  $\mu$ M) con citocromo P450 2E1 (35 pmoles cit. P450/mL) (**ABAJO**). Se recogen también los espectros DAD de los distintos metabolitos detectados (**ARRIBA**).

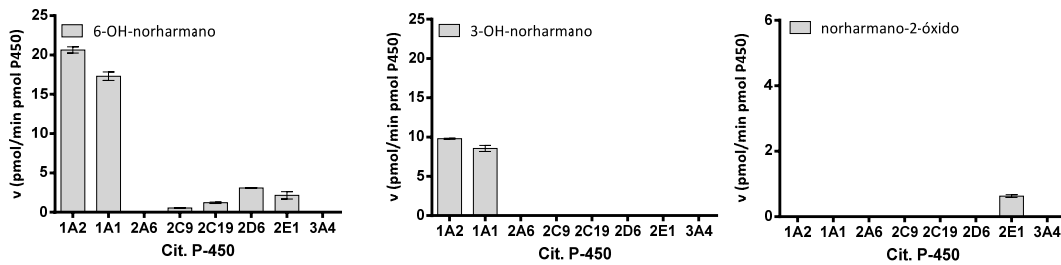
### harmano 25 $\mu\text{M}$



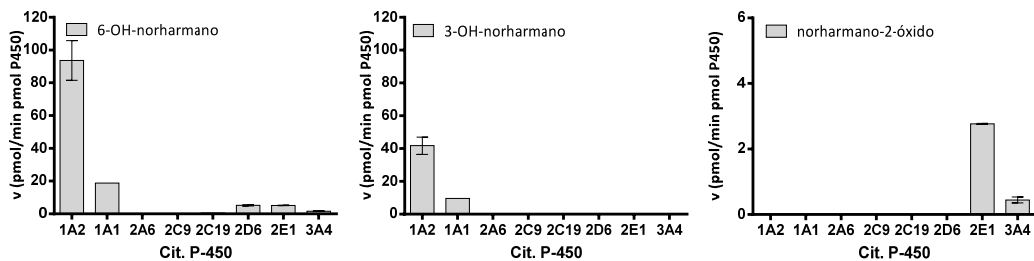
### harmano 250 $\mu\text{M}$



### norharmano 25 $\mu\text{M}$



### norharmano 250 $\mu\text{M}$



**Figura 3.31** Biotransformación de harmano y de norharmano (25  $\mu\text{M}$  y 250  $\mu\text{M}$ ) por enzimas citocromo P450 (35 pmoles cit. P450/mL).

Con respecto a las enzimas implicadas, los citocromos P450 de la subfamilia 1A (1A1 y 1A2) contribuyeron de manera clara a la biotransformación de estos alcaloides. El citocromo P450 1A2 fue el más eficaz para dar 6-OH- $\beta$ c (6-OH-norharmano y 6-OH-harmano) seguido por el 1A1. Los citocromos P450 2D6, 2E1, y 2C19 produjeron 6-OH- $\beta$ c<sub>s</sub> (en particular, 6-OH-harmano), aunque en menor proporción que P450 1A2 y P450 1A1. Se observó un metabolismo reducido con 2A6, 3A4 y 2C9, aunque se detectó también la formación de 6-OH- $\beta$ c en altas concentraciones de sustrato. El metabolito 3-OH- $\beta$ c (3-OH-norharmano y 3-OH-harmano) se produjo específicamente por P450 1A2 y P450 1A1. Las  $\beta$ c<sub>s</sub>-2-óxidos se produjeron principalmente por la enzima 2E1, aunque también se detectaron trazas con 3A4, especialmente en el caso del norharmano. La biotransformación del norharmano por los citocromos P450 2D6, P450 2C19, P450 2C9 y P450 2E1 fue significativamente menor que la del harmano. Por otro lado, además de los metabolitos que se incluyen en la **Figura 3.31**, las enzimas P450 1A2 y 1A1 produjeron otra OH- $\beta$ c adicional en una proporción aproximadamente cuatro veces menor que la correspondiente 6-OH- $\beta$ c (véase **Figura 3.30**).

A continuación se realizó un estudio detallado de las principales reacciones metabólicas anteriores, ajustando la cantidad de enzima y variando la concentración del sustrato (véase la **Figura 3.32**), y tras ello se obtuvieron los parámetros cinéticos que se recogen en la **Tabla 3.9** y **Tabla 3.10**. Los valores de  $V_{\max}$  y  $K_m$  indican que el citocromo P450 1A2 metabolizó eficazmente las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas para dar 6-OH- $\beta$ c<sub>s</sub> (6-OH-norharmano y 6-OH-harmano). La relación  $V_{\max}/K_m$  fue parecida para el noharmano y harmano (4.1 y 4.96  $\mu\text{L}/\text{min pmol}$ ) sugiriendo que la eficacia de conversión metabólica por esta enzima es similar para ambos sustratos. Por su parte, la formación del 3-OH- $\beta$ c por el citocromo P450 1A2 se produjo también con una  $V_{\max}$  relativamente alta y con una relación  $V_{\max}/K_m$  similar para norharmano y harmano (1.4  $\mu\text{L}/\text{min pmol P450}$ ). La relación  $V_{\max}/K_m$  es aproximadamente tres veces más alta para dar 6-OH- $\beta$ c<sub>s</sub> que para las 3-OH- $\beta$ c<sub>s</sub>, sugiriendo la preferencia del citocromo P450 1A2 para hidroxilar las  $\beta$ c<sub>s</sub> en posición C-6 frente a C-3. El citocromo P450 1A1 metabolizó las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas para dar metabolitos hidroxilados con buenos parámetros cinéticos, aunque en general relativamente peores (sobre todo en harmano) que el P450 1A2. Las enzimas P450 2C19, P450 2D6 y P450 2E1 produjeron 6-OH- $\beta$ c<sub>s</sub> (particularmente en el caso del harmano) con valores de  $V_{\max}$  y  $V_{\max}/K_m$  inferiores a los del P450 1A2 y P450 1A1. El citocromo P450 2E1 produjo el metabolito harmano-2-óxido con parámetros cinéticos similares a los del correspondiente 6-OH-derivado (véase **Tabla 3.10**).

Los estudios de inhibición selectiva confirmaron las biotransformaciones anteriores (**Figura 3.33**). La hidroxilación de  $\beta$ c<sub>s</sub> por el citocromo P450 1A2 (y por P450 1A1 en ensayos puntuales) se inhibió en presencia de  $\alpha$ -naftoflavona, que es un inhibidor selectivo de los citocromos de la subfamilia P450 1A<sup>236</sup>. EL 4-metilpirazol, que es un inhibidor selectivo del citocromo P450 2E1, inhibió la conversión del harmano a harmano-2-óxido y 6-OH-harmano. Por su parte, la formación de 6-OH-harmano por el citocromo P450 2D6 se inhibió claramente en presencia de quinidina, que es un inhibidor selectivo de esta enzima.

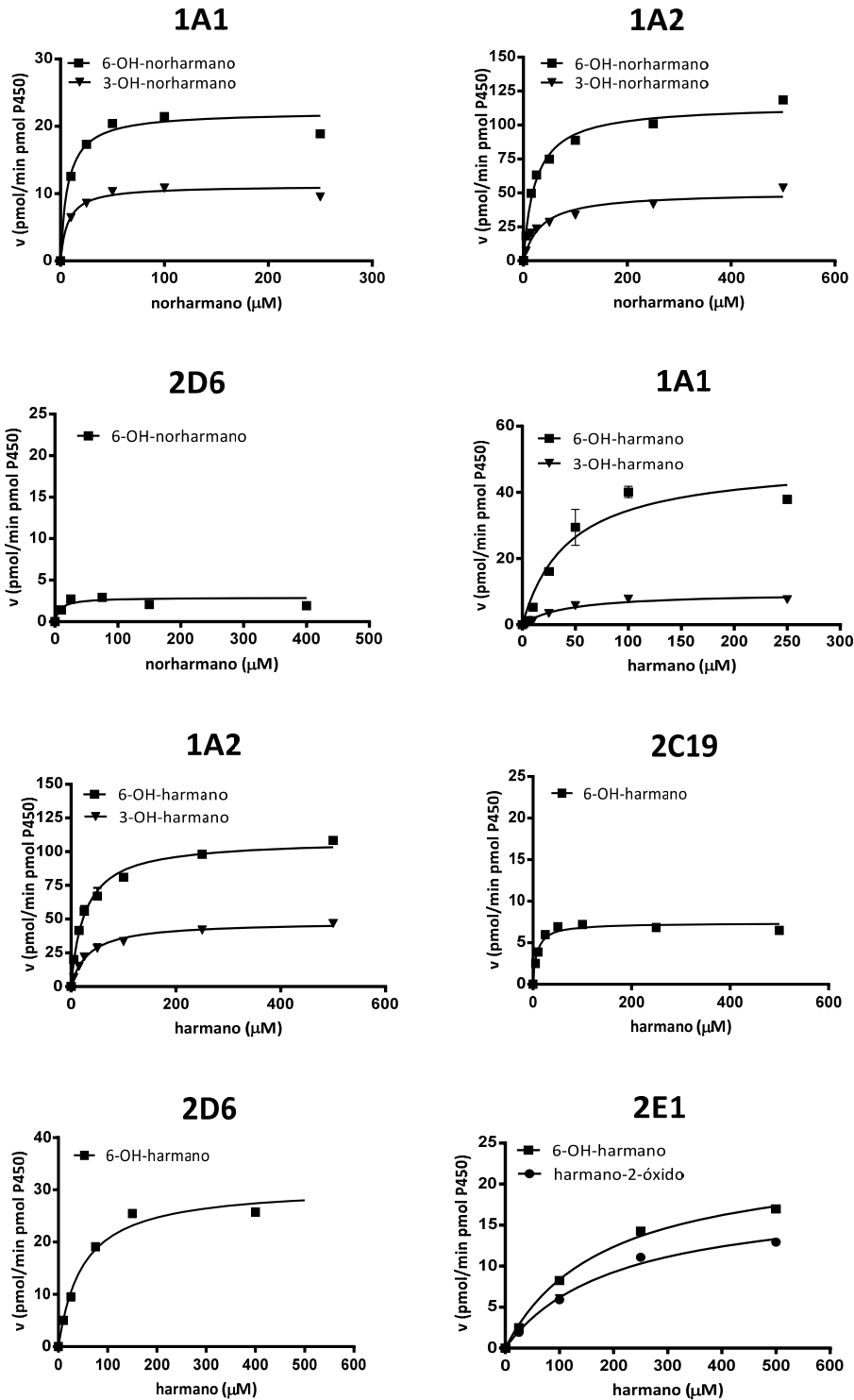


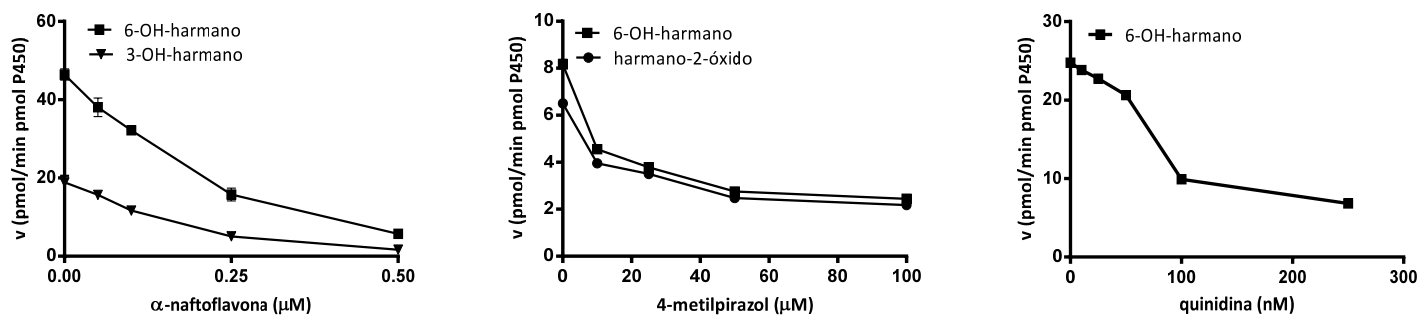
Figura 3.32 Curvas de metabolización de norharmano y de harmans por los citocromos P450 1A2, 1A1, 2D6, 2C19 y 2E1 (35 pmoles cit. P450/mL). Metabolitos cuantificados: 6-OH-norharmano (■), 3-OH-norharmano (▼), 6-OH-harmano (■), 3-OH-harmano (▼) y harmano-2-óxido (●).

Metabolito	P450 1A2			P450 1A1		
	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol)	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol P450)
6-OH-harmano	108.8 $\pm$ 3.5	26.5 $\pm$ 3	4.1	49.7 $\pm$ 6.6	43.8 $\pm$ 16	1.13
3-OH-harmano	47.9 $\pm$ 2.1	33.2 $\pm$ 4.8	1.4	9.7 $\pm$ 0.8	41.5 $\pm$ 10.4	0.23
harmano-2-óxido	-			-		
6-OH-norharmano	114.7 $\pm$ 2.9	23.1 $\pm$ 2.2	4.96	22.2 $\pm$ 0.7	7.1 $\pm$ 1.3	3.1
3-OH-norharmano	50.4 $\pm$ 2.4	33.3 $\pm$ 5.4	1.5	11.2 $\pm$ 0.4	7.06 $\pm$ 1.3	1.6
norharmano-2-óxido	-			-		

**Tabla 3.9** Parámetros cinéticos del metabolismo de las  $\beta_c$  harmano y norharmano por los citocromos P450 1A1 y P450 1A2.

Metabolito	P450 2D6			P450 2C19			P450 2E1		
	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol)	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol P450)	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol P450)
6-OH-harmano	30.8 $\pm$ 1.6	49.5 $\pm$ 7.4	0.6	7.4 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 1.1	0.9	23.6 $\pm$ 0.8	183 $\pm$ 14	0.13
harmano-2-óxido	-			-			18.7 $\pm$ 1.6	205 $\pm$ 38	0.09

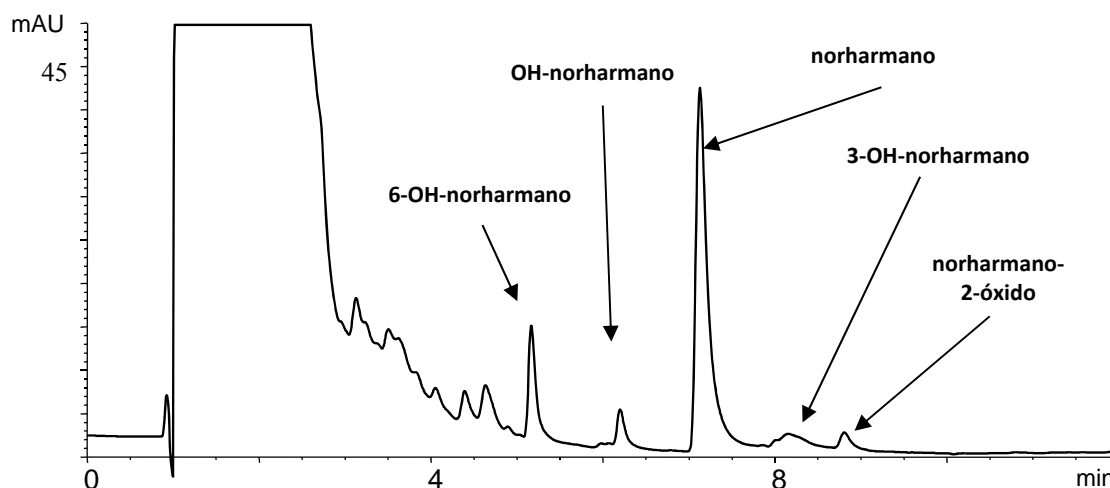
**Tabla 3.10** Parámetros cinéticos para el metabolismo de harmano por los citocromos P450 2C19, P450 2D6, y P450 2E1 para dar 6-OH-harmano y harmano-2-óxido.



**Figura 3.33** Inhibición de la metabolización de harmano (25  $\mu$ M) por el citocromo P450 1A2 en presencia de  $\alpha$ -naftoflavona (**IZQUIERDA**); inhibición de metabolización de harmano (100  $\mu$ M) por el citocromo P450 2E1 en presencia de 4-metilpirazol (**MEDIO**) e inhibición de la metabolización de harmano (100  $\mu$ M) por el citocromo P450 2D6 en presencia de quinidina (**DERECHA**). Los metabolitos representados en las gráficas son 6-OH-harmano ( $\blacksquare$ ), 3-OH-harmano ( $\blacktriangledown$ ) y harmano-2-óxido ( $\bullet$ ).

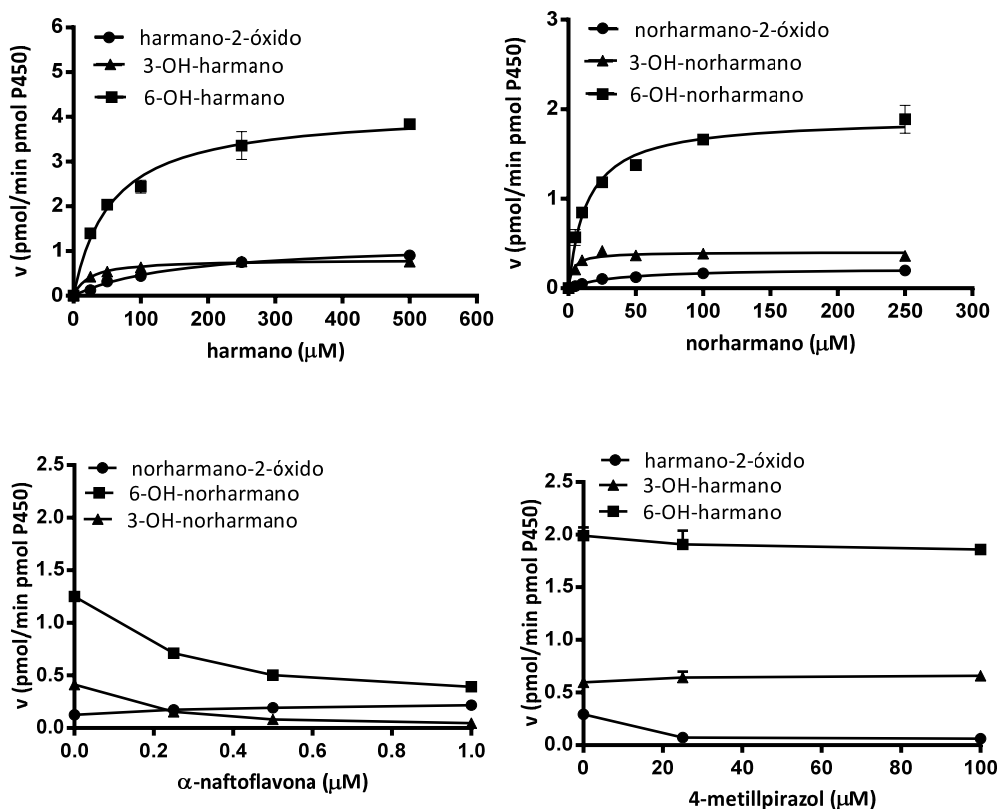
### 3.1.3.1.2. Metabolismo de $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas por microsomas hepáticos.

El metabolismo de las  $\beta$ c<sub>s</sub> harmano y norharmano por microsomas hepáticos proporcionó el mismo perfil metabólico descrito en el apartado anterior con enzimas citocromo P450 y se identificaron los mismos metabolitos: 6-OH- $\beta$ c, 3-OH- $\beta$ c, OH- $\beta$ c en una proporción menor que el 6-OH-derivado (3-8 veces menor) y la  $\beta$ c-2-óxido. En la **Figura 3.34** se muestra un cromatograma correspondiente al norharmano.



**Figura 3.34** Cromatograma de RP-HPLC (254 nm) (col. Novapak C18) correspondiente a la incubación de norharmano (25  $\mu$ M) con microsomas hepáticos humanos (168  $\mu$ moles cit. P450 /mL).

Las curvas correspondientes a la formación de cada metabolito y los valores cinéticos obtenidos se muestran en la **Figura 3.35** y en la **Tabla 3.11**. Los valores de  $V_{\max}$  y de  $V_{\max}/K_m$  indican que los microsomas hepáticos metabolizan eficazmente las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas norharmano y harmano, para dar la correspondiente 6-OH- $\beta$ c, 3-OH- $\beta$ c y  $\beta$ c-2-óxido. Se produjo mayor conversión metabólica ( $V_{\max}$ ) para dar 6-OH- $\beta$ c que para dar 3-OH- $\beta$ c o  $\beta$ c-2-óxido. La  $V_{\max}$  correspondiente a los metabolitos provenientes de la oxidación del harmano fue mayor que para el norharmano; sin embargo el norharmano mostró mejor afinidad (un valor de  $K_m$  inferior) y su relación  $V_{\max}/K_m$  fue mayor. La relación  $V_{\max}/K_m$  para la formación del 2-óxido es menor que la de los metabolitos hidroxilados, lo que sugiere que la vía de hidroxilación aromática es la vía de metabolización principal.



**Figura 3.35** ARRIBA Curvas de metabolización por microsomas hepáticos (168 pmoles cit. P450/mL) de harmano y de norharmano. ABAJO Inhibición de la metabolización de norharmano (25  $\mu$ M) por microsomas hepáticos (168 pmoles cit. P450/mL) en presencia de  $\alpha$ -naftoflavona (inhibidor selectivo del citocromo P450 1A2) y de harmano (100  $\mu$ M) por 4-metilpirazol (inhibidor del citocromo P450 2E1).

Metabolito	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol P450)
6-OH-harmano	$4.16 \pm 0.18$	$56.4 \pm 8.2$	0.070
3-OH-harmano	$0.81 \pm 0.03$	$23.5 \pm 4.5$	0.030
harmano-2-óxido	$1.3 \pm 0.06$	$160.7 \pm 18$	0.008
6-OH-norharmano	$1.9 \pm 0.07$	$13.8 \pm 1.9$	0.140
3-OH-norharmano	$0.4 \pm 0.02$	$3.3 \pm 2.0$	0.120
norharmano-2-óxido	$0.22 \pm 0.02$	$35.1 \pm 9.2$	0.006

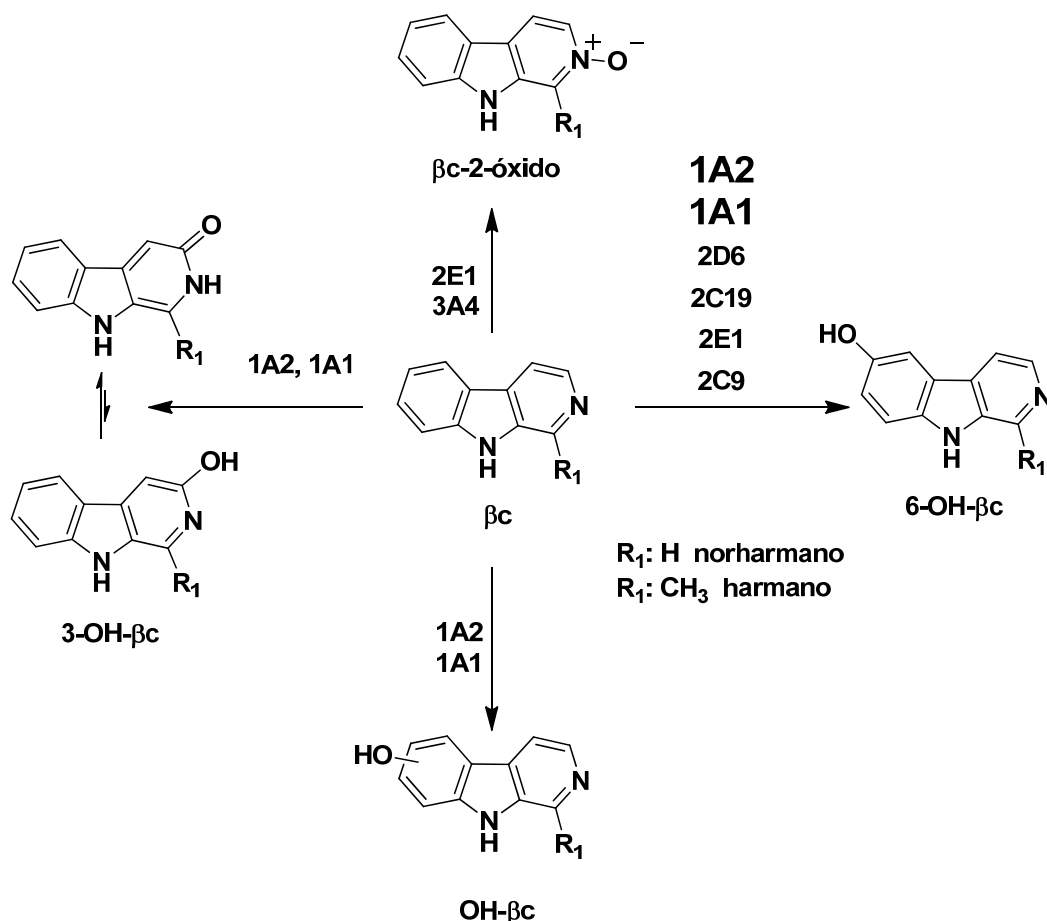
**Tabla 3.11** Parámetros cinéticos del metabolismo de las  $\beta_c$  harmano y norharmano por microsomas hepáticos humanos.

Los microsomas hepáticos contienen todos los citocromos P450 funcionales por lo que el uso de inhibidores selectivos de cada citocromo permite determinar el grado en el que un determinado citocromo P450 contribuye al metabolismo conjunto. La metabolización de las  $\beta_c$  aromáticas norharmano y harmano a sus correspondientes derivados hidroxilados (6-OH ó 3-OH-derivado) se inhibió claramente en presencia de  $\alpha$ -naftoflavona (un inhibidor selectivo de la enzima citocromo P450 1A2) (véase **Figura 3.35** para norharmano). Estos resultados confirman que el citocromo P450 1A2 es la principal enzima implicada en el metabolismo de las  $\beta_c$  aromáticas en microsomas hepáticos ya que estos no contienen el citocromo P450 1A1.

En cambio, la formación de la  $\beta$ c-2-óxido (véase **Figura 3.35**) no se inhibió por  $\alpha$ -naftoflavona, pero sí se inhibió en presencia de 4-metilpirazol (un inhibidor selectivo del citocromo P450 2E1), confirmando la contribución de la enzima P450 2E1 a la formación del *N*-óxido en microsomas hepáticos. No se observó inhibición de la formación de 6-OH-harmano ó 3-OH-harmano en presencia de 4-metilpirazol (véase **Figura 3.35**) o de quinidina (resultados no mostrados). Luego estos resultados confirman que la formación de 6-OH y 3-OH-derivados de las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas se produce principalmente por el citocromo P450 1A2 y con escasa contribución de los citocromos P450 2D6 y P450 2E1.

En resumen, los resultados anteriores demuestran que las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas norharmano y harmano, se metabolizaron eficazmente por los citocromos P450 a varios metabolitos hidroxilados (**Figura 3.36**). Los citocromos P450 1A2 y 1A1 dieron lugar a 6-OH- $\beta$ c (metabolito principal), 3-OH- $\beta$ c (probablemente presente en su forma de piridona por el equilibrio ceto-enólico de su estructura), y a una tercera OH- $\beta$ c, que podría ser un compuesto hidroxilado en C-8 por analogía con los resultados obtenidos en la hidroxilación química de  $\beta$ c<sub>s</sub> con el reactivo de Fenton<sup>123 237</sup>. No se detectó la formación de 7-OH- $\beta$ c (es decir formación de harmol a partir de harmano). Las enzimas P450 2D6, 2C19 y 2E1 también llevaron a cabo la biotransformación de  $\beta$ c<sub>s</sub> a 6-OH- $\beta$ c<sub>s</sub>, aunque con una eficacia relativa ( $V_{\max}$  y relación  $V_{\max}/K_m$ ) menor que P450 1A2 y P450 1A1. El metabolito 3-OH- $\beta$ c se produjo específicamente por P450 1A2 y P540 1A1 y el metabolito  $\beta$ c-*N*-óxido por el citocromo P450 2E1 y en menor medida por P450 3A4.

En microsomas hepáticos, los citocromos P450 se encuentran en la siguiente proporción relativa: 30% (3A4), 20% (2C9), 15% (1A2), 10% (2E1), 5% (2D6) y 5% (2C19)<sup>141</sup>. Basándonos en esta abundancia y en la actividad catalítica observada, el citocromo P450 1A2 debe ser la principal enzima encargada de la metabolización oxidativa de estos alcaloides en el hígado. Podría darse cierta superposición de actividades catalíticas para la ruta de 6-hidroxilación debida a los citocromos P450 2E1, P450 2D6 y P450 2C19 (en particular con el harmano); sin embargo, considerando la actividad relativa de éstas y su abundancia, su contribución será pequeña en comparación con el P450 1A2. Aunque no es polimórfico, existe gran variabilidad en la expresión genética del citocromo P450 1A2 entre individuos (variación de hasta 40 veces)<sup>141 157</sup>. Por tanto, el metabolismo *in vivo* de las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas por este citocromo podría mostrar gran variabilidad, e influir de manera decisiva en la biodisponibilidad de estos alcaloides. A esta variación también podría contribuir el propio metabolismo por los citocromos P450 polimórficos (es decir, P450 2D6 y P450 2C19).



**Figura 3.36** Metabolismo oxidativo de las  $\beta\text{c}_s$  aromáticas norharmano y harmano por citocromos P450 humanos en base a los resultados descritos en esta memoria.

Por otra parte, el patrón de citocromos del hígado no es aplicable a los tejidos extrahepáticos donde actúan las  $\beta\text{c}_s$ . Al contrario que el 1A2, los citocromos P450 1A1, 2D6 y 2E1 se expresan también en otros tejidos como pulmón o cerebro<sup>141</sup>. Estos citocromos podrían participar en la biotransformación de  $\beta\text{c}_s$  en estos tejidos. En ese caso, por ejemplo, la hidroxilación y la N-oxidación de  $\beta\text{c}_s$  aromáticas podría suponer una posible vía de detoxificación al impedir la formación de cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta\text{c}^+_s$ ) tóxicos<sup>108 206 235</sup>. Por otro lado, los fenómenos de inducción por agentes químicos que inciden en los niveles de expresión de los citocromos P450 1A1, P450 1A2, P450 2C19 y P450 2E1<sup>141</sup> podrían afectar al metabolismo de  $\beta\text{c}_s$  por estos citocromos. De hecho, recientemente se ha descrito que el citocromo P450 1A1 se induce por la  $\beta\text{c}$  harmano<sup>238</sup>.

Las citocromos P450 1A2 y 1A1 participan en procesos de carcinogénesis debido a que catalizan la bioactivación de mutágenos y carcinógenos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos y las aminas heterocíclicas aromáticas<sup>143 164 239</sup>. Las  $\beta\text{c}_s$  interaccionan con estos mismos citocromos y se cree que eventualmente podrían llegar a modular estos procesos<sup>96 97 240</sup>. El norharmano inhibe la mutagenicidad de nitrosaminas, benzo[*a*]pireno y de aflatoxina B1<sup>97 241</sup>, pero tiene efectos comutagénicos en presencia de fracciones microsomales y de anilina<sup>96</sup>. El mecanismo exacto de este efecto dual no está claro, pero podría deberse a la inhibición de la actividad de los citocromos P450 por  $\beta\text{c}_s$ <sup>97</sup>. Esta hipótesis se estudia en un apartado posterior de esta memoria.

### 3.1.3.2. Las metoxi- $\beta$ c<sub>s</sub> (harmina y harmalina).

Las metoxi- $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas harmina y harmalina, son alcaloides simples que abundan en algunas especies de plantas, y particularmente en *Banisteriopsis caapi* y *Peganum harmala*<sup>44 242</sup>. La *Banisteriopsis caapi* se utiliza como ingrediente principal de la ayahuasca, una bebida alucinógena empleada con fines rituales por tribus amazónicas. La *P. harmala* se emplea en preparados medicinales por la medicina tradicional oriental y del norte de África<sup>243 244</sup>. Las metoxi- $\beta$ c<sub>s</sub> tienen notable actividad biológica por su unión a distintos receptores biológicos y por ser potentes inhibidores de las enzimas MAO<sup>44 80 235 245</sup> y quinasas<sup>246</sup>. Son compuestos psicoactivos y recientemente se han descrito casos graves de intoxicación debidos su ingesta con fines recreativos<sup>46 247</sup>. Actualmente existe especial interés en determinar el perfil metabólico y la biotransformación de estos compuestos<sup>248 249 250 251</sup>. El objetivo de este apartado fue investigar su biotransformación y metabolismo por citocromos P450.

#### 3.1.3.2.1. Biotransformación de harmina por citocromos P450.

Se incubó harmina (véase **Figura 3.37**) con distintas enzimas citocromo P450 (1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) por separado y tras el correspondiente análisis cromatográfico, se detectaron varios metabolitos que dependieron del citocromo implicado (véase más adelante), y que se identificaron por HPLC-MS (ionización por electrospray), espectros de absorción obtenidos por DAD, y coelución con estándares como el harmol (reacción de *O*-desmetilación) y los compuestos de hidroxilación de harmina: 6-OH-harmina, 3-OH-harmina, y harmina-2-óxido (véase **Tabla 3.12** y **Figura 3.37**). En la **Figura 3.38** se muestra un cromatograma correspondiente a la biotransformación de harmina a harmol por el citocromo P450 2D6. El perfil de metabolitos producido por los distintos citocromos P450 se muestra en la **Figura 3.39**. El harmol proveniente de la reacción de *O*-desmetilación se produjo inespecíficamente por varios citocromos P450, aunque en mayor proporción relativa por 2C9, 2C19 y 2D6 y en menor por 1A1 y 1A2. La 6-OH-harmina se produjo principalmente por los citocromos de la subfamilia 1A (1A1 y 1A2) y en menor medida por 3A4. El metabolito 3-OH-harmina se produjo por 1A1 y 1A2 y en menor medida por 2C19. Finalmente, la harmina-2-óxido se produjo principalmente por los citocromos P450 2E1 y 3A4 y en menor medida por 2D6 y 2C19.

A continuación se estudió la formación de los metabolitos por las principales enzimas implicadas a una concentración fija de enzima y variando la concentración de sustrato. Se obtuvieron las curvas de metabolización (**Figura 3.40**) y los parámetros cinéticos (**Tabla 3.13**). El metabolito mayoritario fue el harmol, que se produjo con valores altos de  $V_{max}$  y de eficacia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) por los citocromos P450 2C9, 2C19 y 2D6. Los citocromos P450 1A (1A1 y 1A2) mostraron muy buena afinidad por la harmina (véase los valores relativamente bajos de  $K_m$ ) y dieron harmol, 6-OH-harmina y 3-OH-harmina con buenas eficacias catalíticas en términos de  $V_{max}/K_m$  a pesar de su menor  $V_{max}$  relativa.

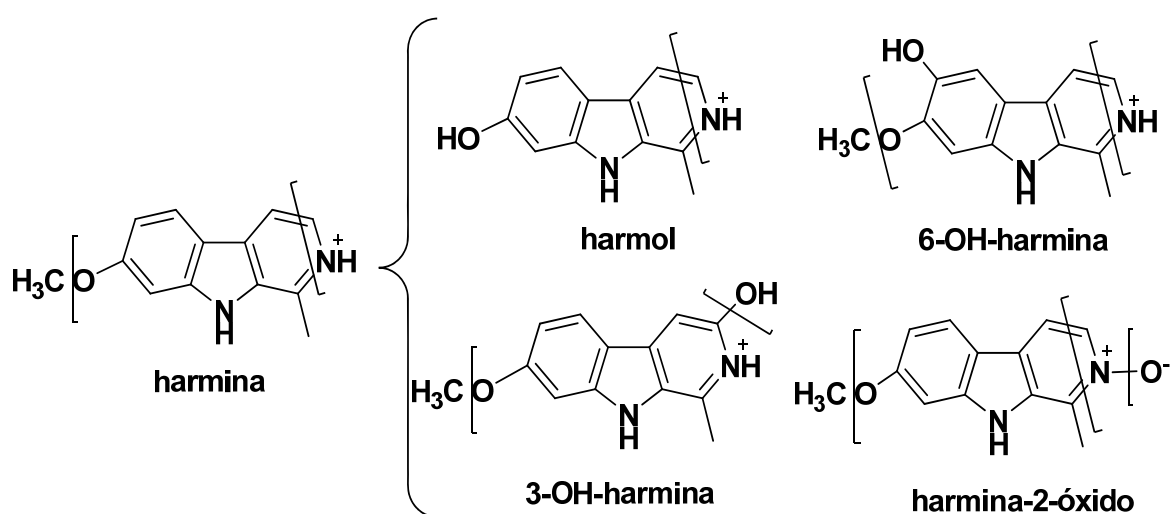


Figura 3.37 Harmina protonada y sus metabolitos detectados en HPLC-MS (electrospray positivo).

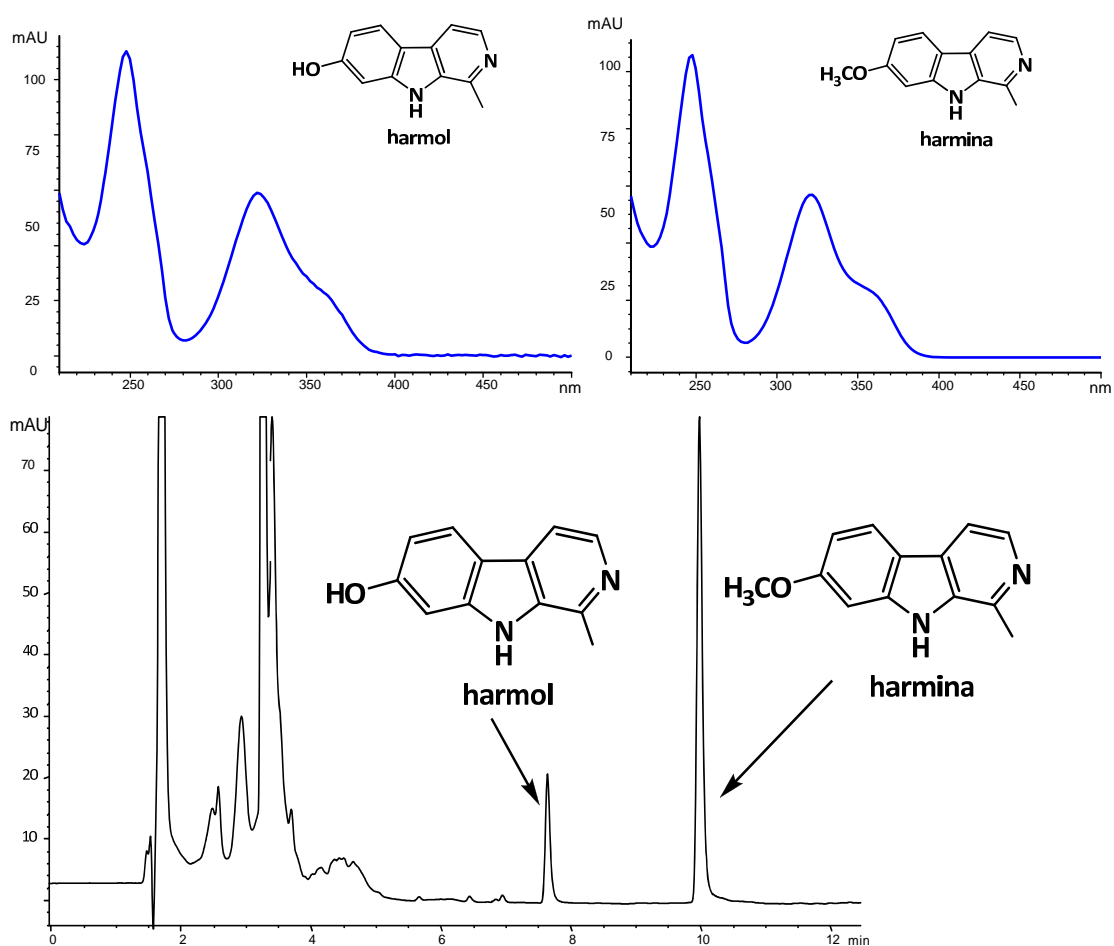
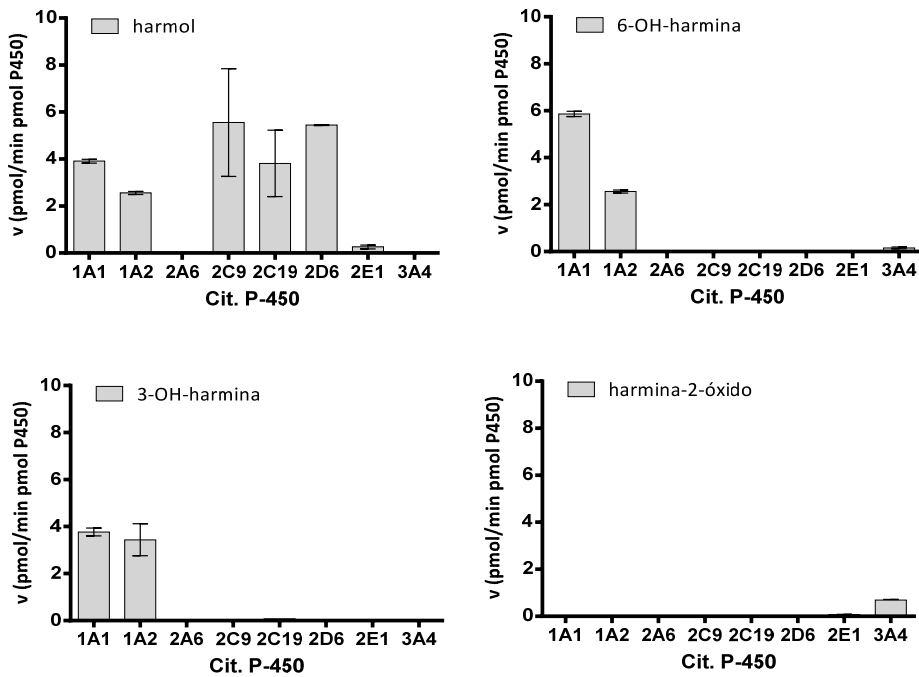
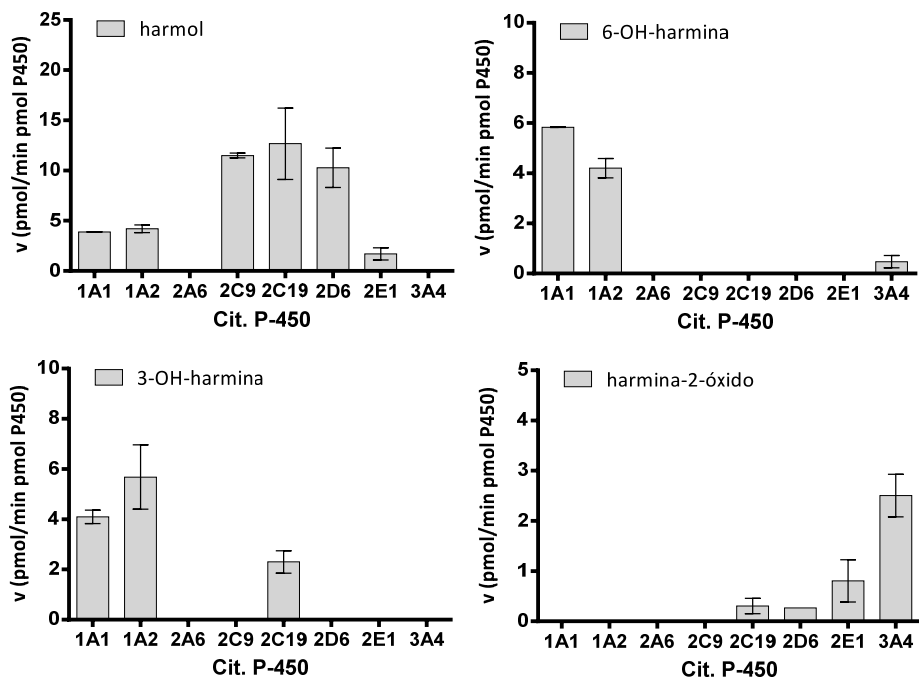


Figura 3.38 Cromatograma de RP-HPLC (254 nm) (col. Novapak C18) correspondiente a la incubación de harmina (25  $\mu$ M) con el citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL) y los espectros pertenecientes a harmol y harmina (sustrato).

### harmina 25 $\mu$ M



### harmina 250 $\mu$ M

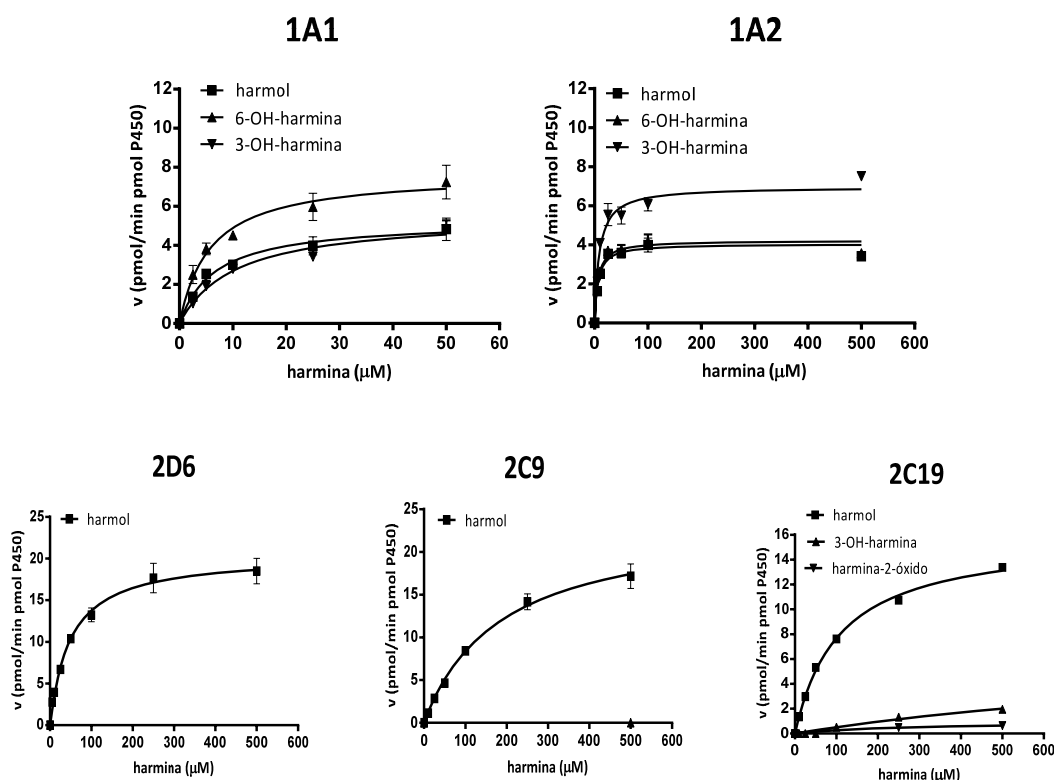


**Figura 3.39.** Perfil de metabolitos correspondiente a la biotransformación de harmina (25  $\mu$ M y 250  $\mu$ M) por citocromos P450 (35 pmoles cit. P450/mL).

Los estudios en presencia de inhibidores selectivos demostraron que:  $\alpha$ -naftoflavona (inhibidor de los citocromos P450 1A1 y P450 1A2), quinidina (inhibidor del 2D6), y fluvoxamina (inhibidor de P450 2C9 y de P450 2C19), inhibieron la biotransformación de harmina a los metabolitos correspondientes (véase la **Figura 3.41**), confirmando la participación de las enzimas señaladas en las reacciones de biotransformación.

Metoxi- $\beta$ c	Metabolitos		
	tr (min)	m/z (%) -ESI (170 V)	Nombre
<b>Harmina</b> tr 12.4 min MS (ESI) (170 V) m/z : 213 (M+H) <sup>+</sup> (100 %), 198 (M+H-15) <sup>+</sup> (45 %), 170 (M+H-15-28) <sup>+</sup> (45 %)	9.3	199 (M+H) <sup>+</sup> (100 %), 171 (M+H-28) <sup>+</sup> (10 %)	harmol
	9.5	229 (M+H) <sup>+</sup> (100 %), 214 (M+H-15) <sup>+</sup> (95 %), 186 (M+H-15-28) <sup>+</sup> (25 %)	6-OH-harmina
	13.1	229 (M+H) <sup>+</sup> (100 %), 211 (M+H-18) <sup>+</sup> (50 %), 214 (M+H-15) <sup>+</sup> (15 %)	3-OH-harmina
	15.1	229 (M+H) <sup>+</sup> (35 %), 212 (M+H-OH) <sup>+</sup> (100 %), 197 (M+H-17-15) <sup>+</sup> (55 %), 169 (M+H-17-15-28) <sup>+</sup> (65 %)	harmina-2- óxido

**Tabla 3.12** Metabolitos identificados por HPLC-MS (electrospray positivo) en los medios de incubación con citocromos P450 (véase más adelante). Columna Zorbax SB-C18 (150 x 2.1 mm), eluyente A: ácido fórmico 0.5 %; eluyente B: 0.5 % ácido fórmico en ACN. Programa: 60 % B en 15 min. \* Los valores de abundancia relativa son indicativos y varían con el voltaje de fragmentación (energía de colisión) (por ej. en 90 V aparece principalmente el ion molecular protonado (M+H)<sup>+</sup> y no se observa fragmentación).



**Figura 3.40** Curvas de Michaelis-Menten correspondientes a la biotransformación de harmina por citocromos P450 para dar los principales metabolitos (17.5 pmoles cit. P450/mL).

	Harmol			6-OH-harmina			3-OH-harmina			Harmina-2-óxido		
	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol P450)	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol P450)	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol P450)	$V_{max}$ (pmol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol P450)
<b>P450 1A1</b>	5.27 ± 0.35	6.6 ± 1.43	0.8	7.7 ± 0.53	5.75 ± 1.33	1.34	5.5 ± 0.44	10.4 ± 2.35	0.53	-	-	-
<b>P450 1A2</b>	4.04 ± 0.18	6.06 ± 1.26	0.66	4.2 ± 0.19	6.06 ± 1.26	0.69	6.96 ± 0.33	8.75 ± 1.74	0.79	-	-	-
<b>P450 2C9</b>	23.9 ± 1.38	185.0 ± 25.1	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>P450 2C19</b>	15.9 ± 0.33	107.8 ± 6.18	0.16	-	-	-	7.4 ± 4.84	1342 ± 1040	0.006	0.98 ± 0.3	261.7 ± 210	0.0038
<b>P450 2D6</b>	20.5 ± 0.78	49.0 ± 5.71	0.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Microsomas hepáticos</b>	6.86 ± 0.45	171.4 ± 28.2	0.04	0.76 ± 0.05	172.3 ± 28.5	0.0044	0.92 ± 0.06	72.4 ± 17.9	0.0127	0.77 ± 0.09	224.9 ± 55.3	0.0034

Tabla 3.13 Parámetros cinéticos del metabolismo de harmina por citocromos P450 y microsomas hepáticos a varios metabolitos.

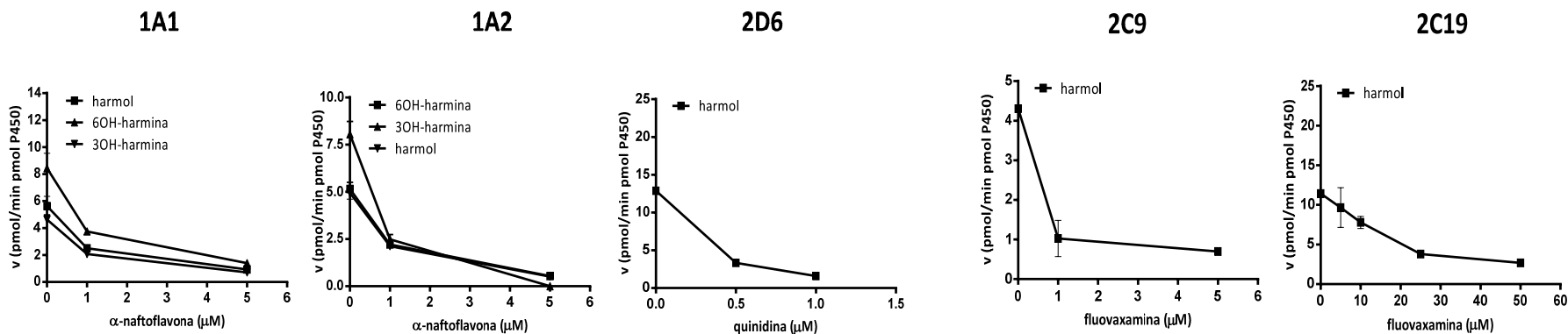
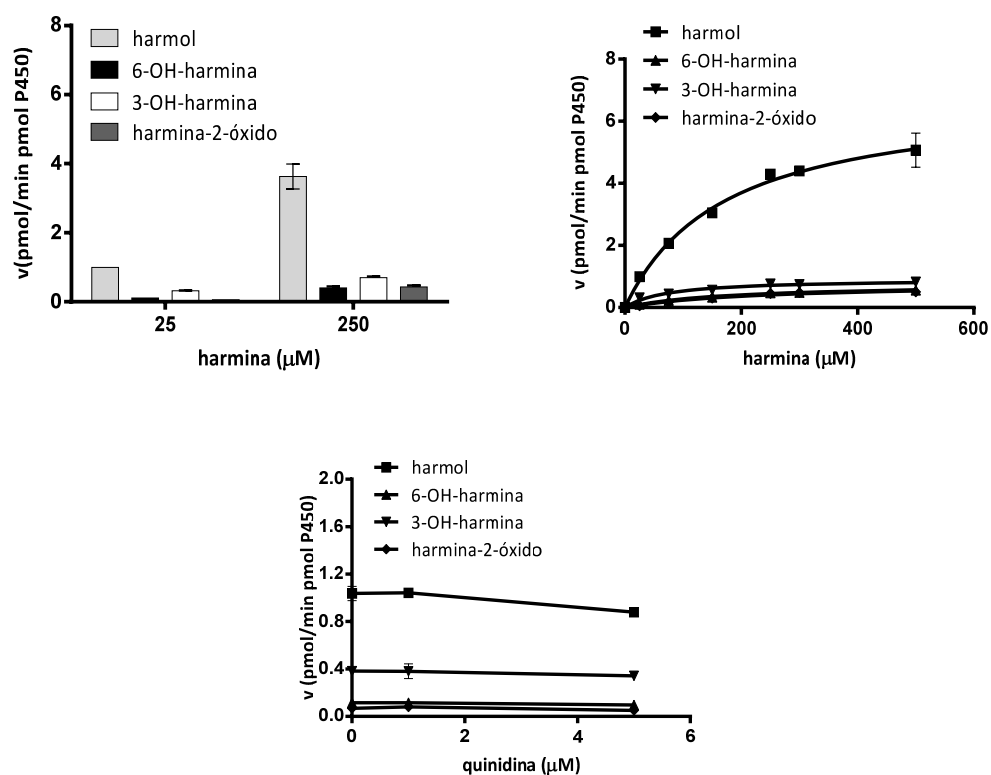


Figura 3.41 Inhibición de la metabolización de harmina (100  $\mu$ M) por los citocromos P450 1A2 y 1A1 con  $\alpha$ -naftoflavona, 2C9 y 2C19 con fluvoxamina, y 2D6 con quinidina (17.5 pmol cit. P450/mL).

### 3.1.3.2.2. Metabolismo de harmina por microsomas hepáticos.

El metabolismo de harmina por microsomas hepáticos proporcionó un perfil metabólico similar al que se obtuvo con los citocromos P450 (**Figura 3.42** y **Tabla 3.13**). La harmina se metabolizó relativamente bien por microsomas, observándose harmol como metabolito claramente mayoritario. Junto a éste, aparecieron 6-OH-harmina, 3-OH-harmina y harmina-2-óxido como metabolitos menos abundantes y con eficacia de formación parecida. No se observó inhibición clara por quinidina (**Figura 3.42**), lo que sugiere que el citocromo P450 2D6 no es crucial en el metabolismo oxidativo de harmina a harmol, y existen otras enzimas implicadas, como se ha visto anteriormente.



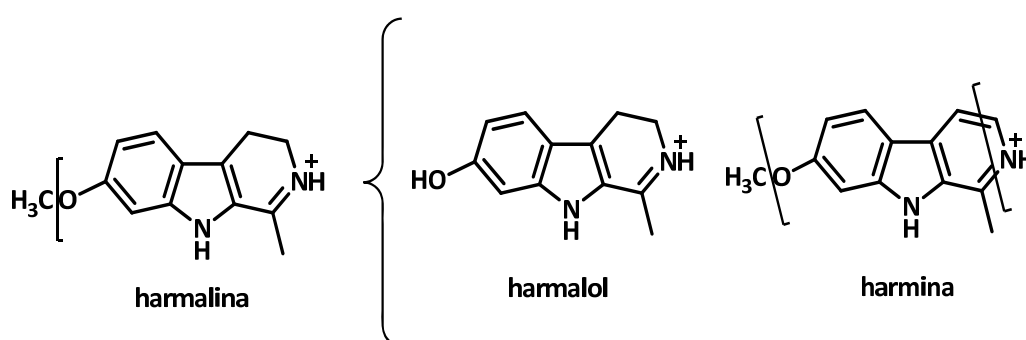
**Figura 3.42** ARRIBA IZQUIERDA. Perfil de biotransformación de harmina por microsomas hepáticos (213 pmoles de cit. P450/mL). ARRIBA DERECHA Curvas de metabolización de harmina por microsomas hepáticos (213 pmoles cit. P450/mL). ABAJO Curvas de inhibición selectiva en presencia de quinidina (0-5  $\mu\text{M}$ ) de la metabolización de harmina (25  $\mu\text{M}$ ) por microsomas hepáticos (231 pmoles cit. P450/mL).

### 3.1.3.2.3. Biotransformación de harmalina por citocromos P450.

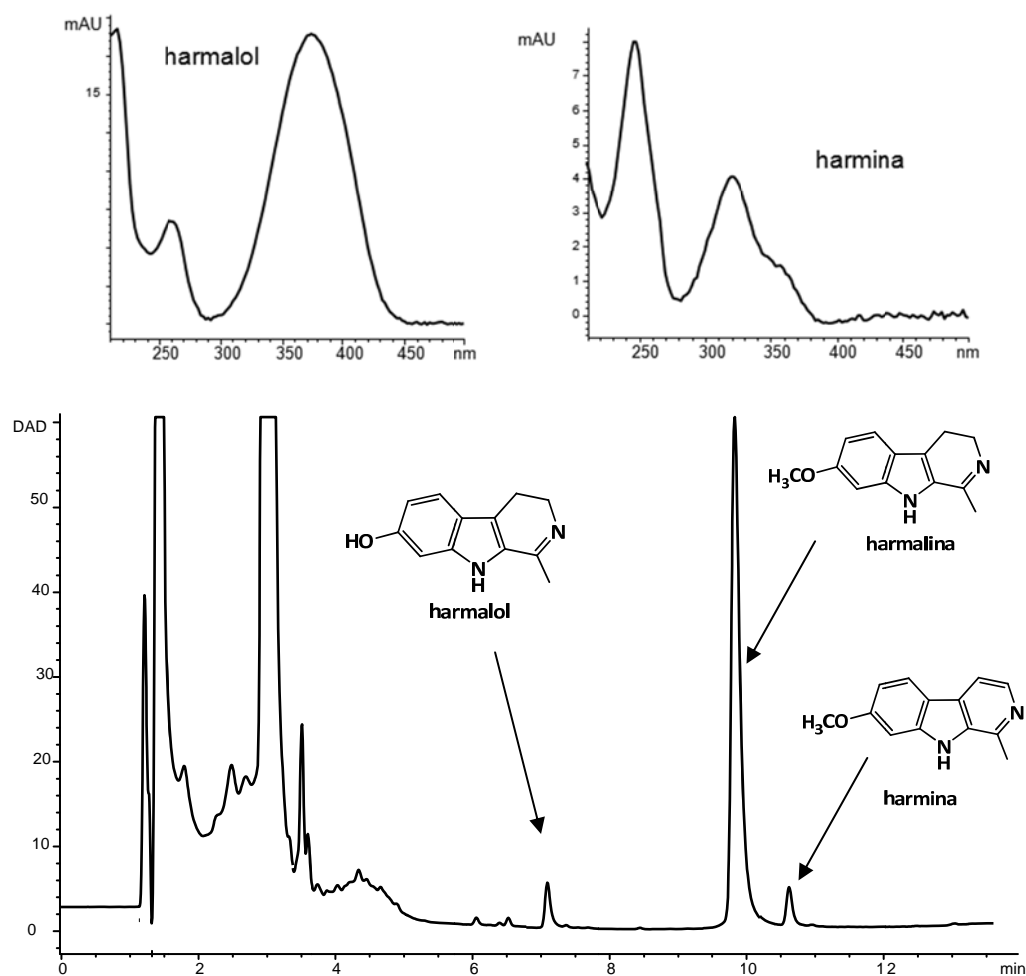
Se incubó harmalina (**Figura 3.44**) con los citocromos P450 (1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) por separado, y tras el correspondiente análisis cromatográfico, y dependiendo de la enzima implicada (véase más adelante), se detectaron dos metabolitos principales que fueron identificados por HPLC-MS (ionización por electrospray), espectros de absorción (DAD) y coelución con los estándares correspondientes como: harmalol (producto de la reacción de *O*-desmetilación de harmalina), y harmina (producto de la oxidación del anillo dihidropiridina de la harmalina) (**Tabla 3.14** y **Figura 3.43**). Junto a éstos, se detectaron los correspondientes metabolitos de la harmina (principalmente con los citocromos P450 de la subfamilia 1A), según se ha visto anteriormente. En la **Figura 3.44** se muestra un cromatograma tipo de la biotransformación de harmalina a harmalol y a harmina por el citocromo P450 2D6.

Metoxi-βc	Metabolitos		
	tr (min)	m/z (%) -ESI (170 V)	Nombre
<b>Harmalina</b> tr 12.03 min. MS (ESI) (170 V) m/z: 215 (M+H) <sup>+</sup> (100%); 200 (M+H -15) <sup>+</sup> (35 %), 172 (15%), 174 (15 %)	8.86	201 (M+H) <sup>+</sup> (100 %) 160 (45 %), 184, 186	Harmalol
	12.4	213 (M+H) <sup>+</sup> (100 %) 198 (M+H-15) <sup>+</sup> (45 %), 170 (50 %)	Harmina
	harmol, 6-OH-harmina, 3-OH-harmina (metabolitos de harmina)		

**Tabla 3.14** Metabolitos identificados por HPLC-MS (electrospray positivo) en los medios de incubación con citocromos P450. Columna Zorbax SB-C18 (150 x 2.1 mm), eluyente A: ácido fórmico 0.5 %; eluyente B: 0.5 % ácido fórmico en acetonitrilo. Programa: 60 % B en 15 min. \* Los valores de abundancia relativa son indicativos y varían con el voltaje (energía de colisión). Por ejemplo, en 90 V se obtuvo principalmente el ion molecular protonado (M+H)<sup>+</sup>.



**Figura 3.43.** Harmalina y sus metabolitos principales detectados por HPLC-MS en los medios de biotransformación con citocromos P450.



**Figura 3.44** Cromatograma y espectros obtenidos por RP-HPLC (254 nm) (columna Novapak C18, eluyentes pH 5.5) correspondiente a la biotransformación de harmalina (250  $\mu$ M) por el citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL).

	harmalol			harmina		
	$V_{\max}$ ( $\mu$ mol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{\max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol P450)	$V_{\max}$ ( $\mu$ mol/min pmol P450)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{\max}/K_m$ ( $\mu$ L/min pmol P450)
<b>P450 1A2</b>	$1.23 \pm 0.16$	$113 \pm 35.7$	0.011	$12.6 \pm 4.6$	$1370 \pm 634$	0.0091
<b>P450 2D6</b>	$7.15 \pm 0.47$	$18.99 \pm 3.35$	0.376	$1.1 \pm 0.08$	$23 \pm 4.1$	0.0480
<b>P450 3A4</b>	-	-	-	$5.85 \pm 1.2$	$895 \pm 263$	0.0065
<b>Microsomas hepáticos</b>	$0.62 \pm 0.015$	$22.7 \pm 2$	0.027	$0.39 \pm 0.07$	$150 \pm 73$	0.0026

**Tabla 3.15** Parámetros cinéticos del metabolismo de harmalina por citocromos P450 y por microsomas hepáticos humanos para dar harmalol y harmina.

El perfil de metabolitos y la contribución específica de cada citocromo P450 se recogen en la **Figura 3.45**. La biotransformación principal correspondió a la formación de harmalol, que se produjo principalmente por acción del citocromo P450 2D6 y con contribuciones pequeñas por parte de P450 1A1 y P450 1A2 y aun menores de P450 2C9 y P450 2E1. El segundo metabolito en importancia fue la harmina que se produjo por los citocromos P450 1A1, P450 1A2, P450 2D6 y P450 3A4.

A continuación se estudió la formación de metabolitos por las principales enzimas implicadas fijando la concentración de enzima y variando la concentración de sustrato. Las curvas se recogen en la **Figura 3.46** y los correspondientes parámetros cinéticos en la **Tabla 3.15**. La biotransformación de harmalina a harmalol por el citocromo P450 2D6 se produjo con buena eficacia en términos de  $V_{\max}/K_m$  y fue muy superior (34 veces) a la del P450 1A2. Con respecto a la harmina, los citocromos P450 1A2 y P450 3A4 dan mayor  $V_{\max}$  de formación de este metabolito que P450 2D6. Sin embargo, en estas dos enzimas, los valores de  $K_m$  fueron altos (baja afinidad por harmalina), y por ello la eficacia catalítica ( $V_{\max}/K_m$ ) fue inferior al 2D6. La biotransformación por el citocromo P450 2D6 fue más eficaz en términos de  $V_{\max}/K_m$  (aprox. ocho veces) para dar harmalol que para dar harmina.

Los estudios con inhibidores selectivos confirmaron que la  $\alpha$ -naftoflavona (inhibidor selectivo de los citocromos P450 1A1 y P450 1A2), quinidina (inhibidor selectivo del citocromo P450 2D6), y el ketoconazol (inhibidor selectivo del citocromo P450 3A4) inhibieron el metabolismo de harmalina a los metabolitos correspondientes (véase la **Figura 3.47**), confirmando la participación de las respectivas enzimas.

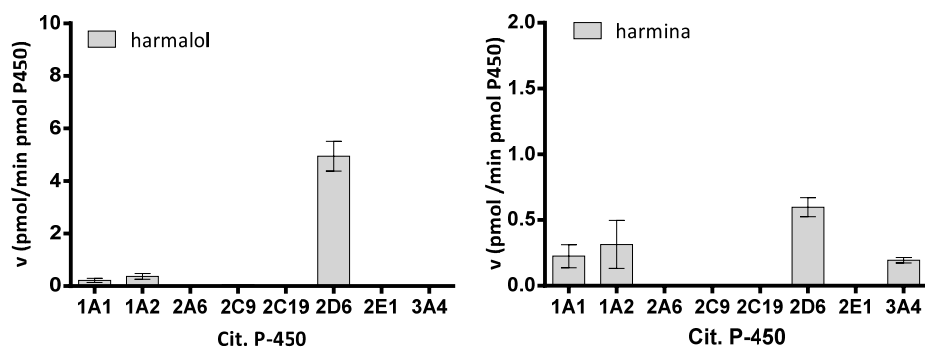
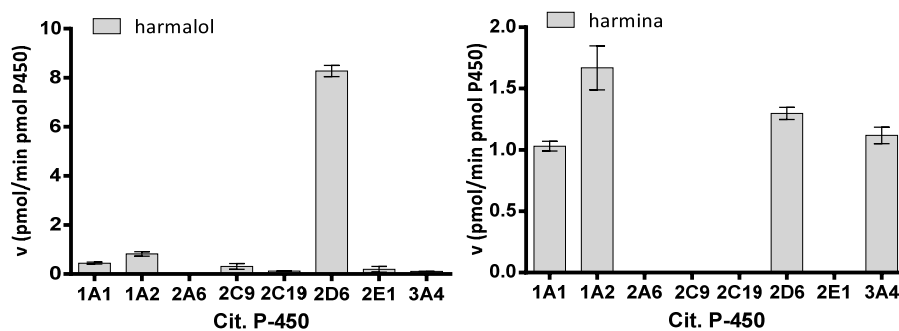
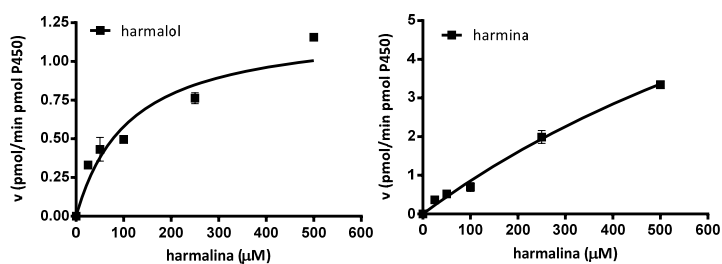
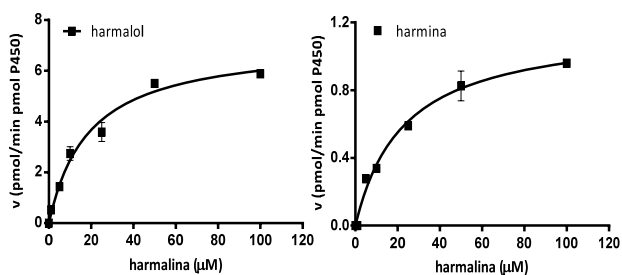
harmalina 25  $\mu\text{M}$ harmalina 250  $\mu\text{M}$ 

Figura 3.45 Biotransformación de harmalina (25 y 250  $\mu\text{M}$ ) por citocromos P450 (35 pmoles cit. P450/mL).

## 1A2



## 2D6



## 3A4

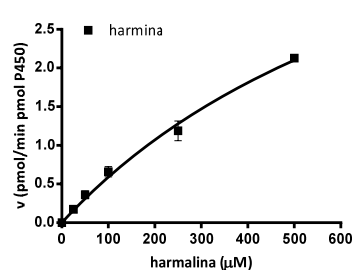
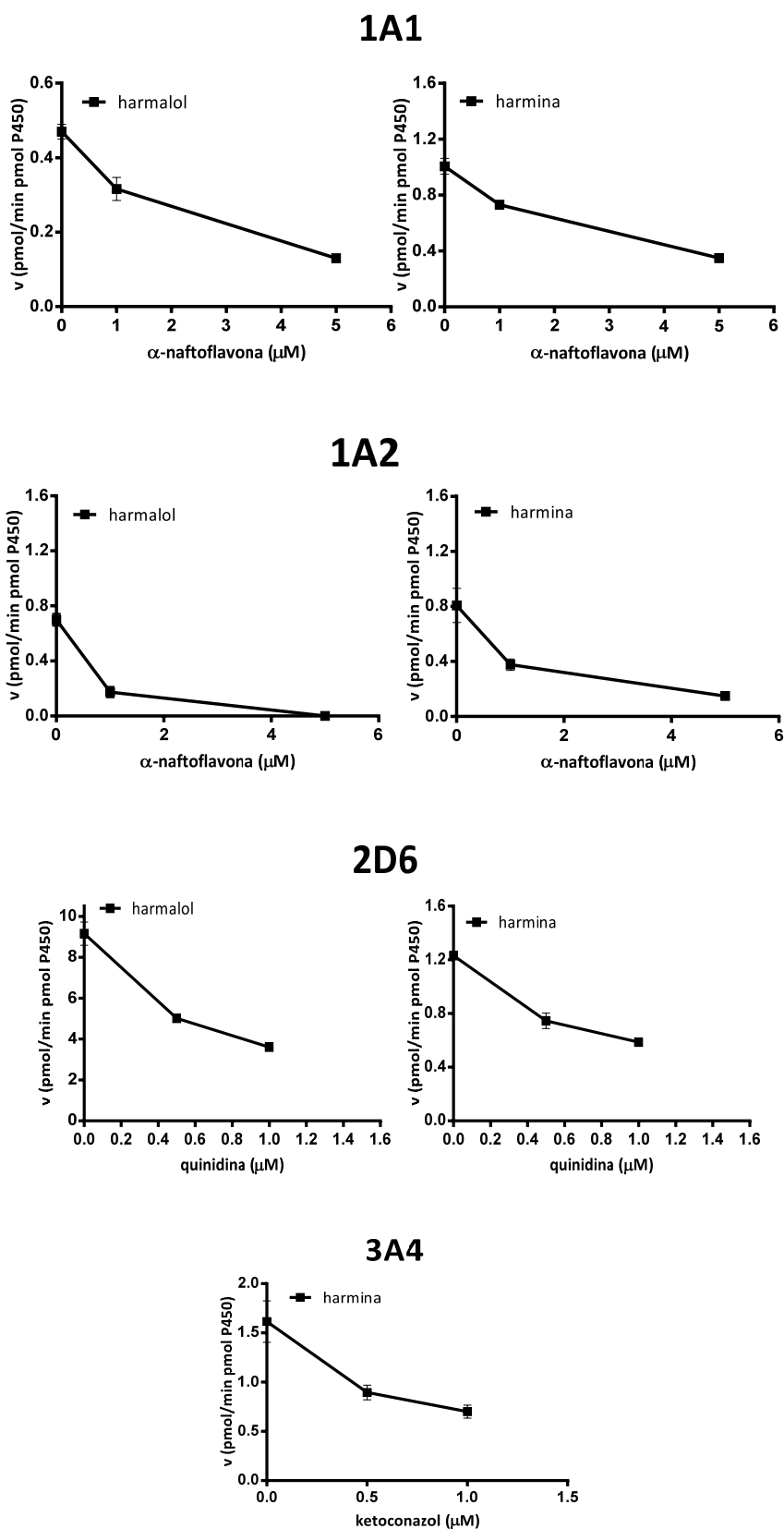


Figura 3.46 Curvas de Michaelis-Menten correspondientes a la metabolización de harmalina por los citocromos P450 1A2 (35 pmoles cit. P450/mL), 2D6 (7.5 pmoles cit. P450/mL) y 3A4 (35 pmoles cit. P450/mL).

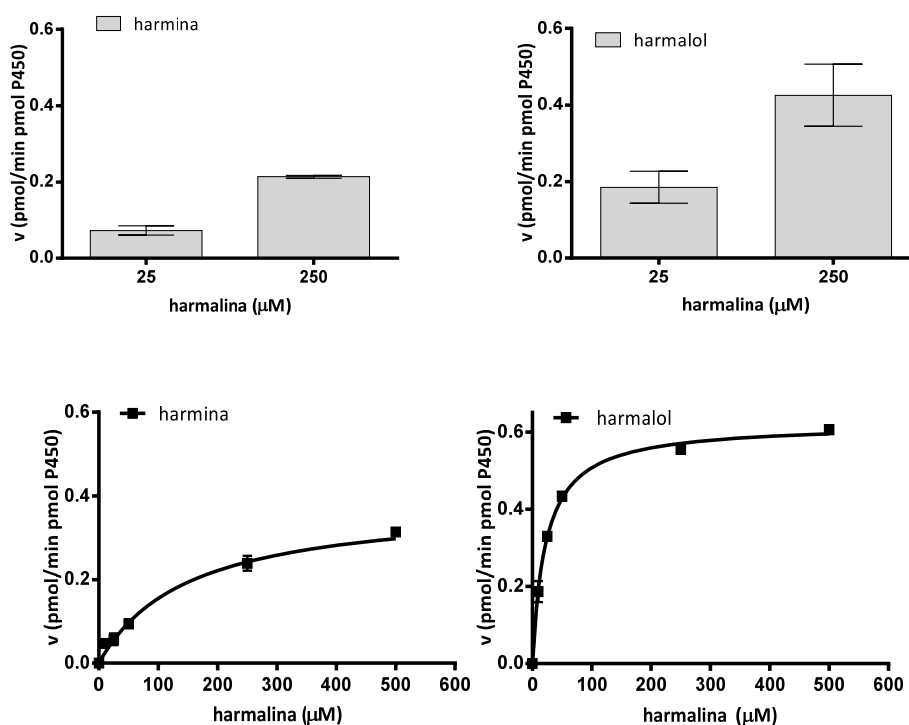


**Figura 3.47** Inhibición de la biotransformación de harmalina (250  $\mu\text{M}$ ) por citocromo P450 1A1 en presencia de naftoflavona; de harmalina (100  $\mu\text{M}$ ) por citocromo P450 1A2 en presencia de  $\alpha$ -naftoflavona; de harmalina (250  $\mu\text{M}$ ) por citocromo P450 2D6 en presencia de quinidina y de harmalina (500  $\mu\text{M}$ ) por citocromo P450 3A4 en presencia de ketoconazol (35 pmoles cit. P450/mL).

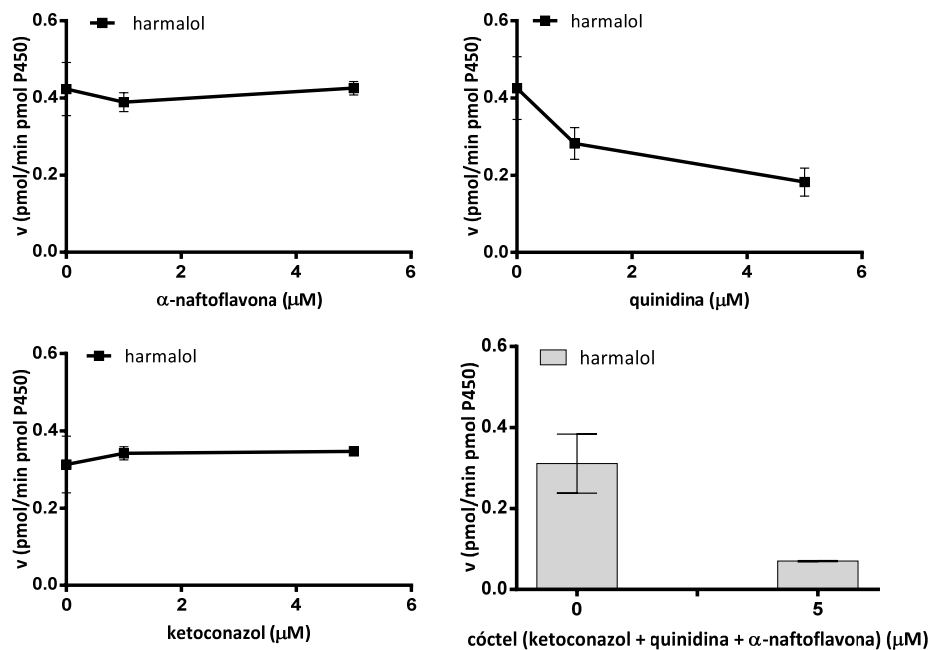
### 3.1.3.2.4. Metabolismo de harmalina por microsomas hepáticos.

El metabolismo de harmalina por microsomas hepáticos proporcionó un perfil metabólico similar al obtenido previamente con los citocromos P450 aislados. Se observó ligeramente mayor metabolización hacia harmalol (vía de *O*-desmetilación) que hacia harmina (vía oxidación aromática) (**Tabla 3.15** y **Figura 3.48**). Sin embargo, en términos de eficacia catalítica ( $V_{\max}/K_m$ ), la metabolización de harmalina para dar harmalol fue notablemente superior (10 veces). Al igual que con los citocromos aislados, también se detectaron trazas de los metabolitos producidos desde harmina.

Los resultados de los estudios con inhibidores selectivos se recogen en la **Figura 3.49**. La formación de harmalol se inhibió claramente en presencia de quinidina, mientras que no se inhibió en presencia de  $\alpha$ -naftoflavona o ketoconazol. Un coctel equimolar de los tres inhibidores produjo un porcentaje de inhibición mayor. Por tanto, el citocromo P450 2D6 es el responsable mayoritario de la metabolización de harmalina a harmalol, aunque sin descartar cierta contribución de otros citocromos.



**Figura 3.48** ARRIBA Biotransformación de harmalina (25 y 250 μM) por microsomas hepáticos (231 pmoles cit. P450/mL). ABAJO Curvas de metabolización de harmalina (0-500 μM) por microsomas hepáticos humanos (175 pmoles cit. P450/mL) para dar harmina y harmalol.



**Figura 3.49** Inhibición de la metabolización de harmalina (250  $\mu\text{M}$ ) a harmalol por microsomas hepáticos (231 pmoles cit. P450/mL) con  $\alpha$ -naftoflavona, quinidina, ketoconazol y un cóctel equimolar de los anteriores inhibidores.

En resumen, los resultados anteriores demuestran que las metoxi- $\beta\text{c}_5$  (harmina y harmalina), se metabolizan eficazmente por citocromos P450 y por microsomas hepáticos. Estos resultados están de acuerdo con resultados previos que sugerían que harmina y harmalina podrían sufrir reacciones de hidroxilación aromática y de *O*-desmetilación por enzimas P450<sub>s</sub><sup>248</sup> 252. Los esquemas de metabolización correspondientes se recogen en la **Figura 3.50** y en la **Figura 3.51**. La metabolización de harmina dio lugar a cuatro metabolitos principales: harmol (ruta de *O*-desmetilación), 6-OH-harmina y 3-OH-harmina (rutas de hidroxilación aromática) y harmina-2-óxido (formación de *N*-óxido). Los citocromos P450 1A1, P450 1A2, P450 2D6, P450 2C9 y P450 2C19 fueron los principales responsables de la formación de harmol que aparece como metabolito mayoritario. El metabolismo de la harmina por hidroxilación a 6-OH-harmina y 3-OH-harmina se llevó cabo por los citocromos P450 1A2 y P450 1A1, mientras que la formación del *N*-óxido se produjo principalmente por las enzimas citocromo P450 2E1 y P450 3A4.

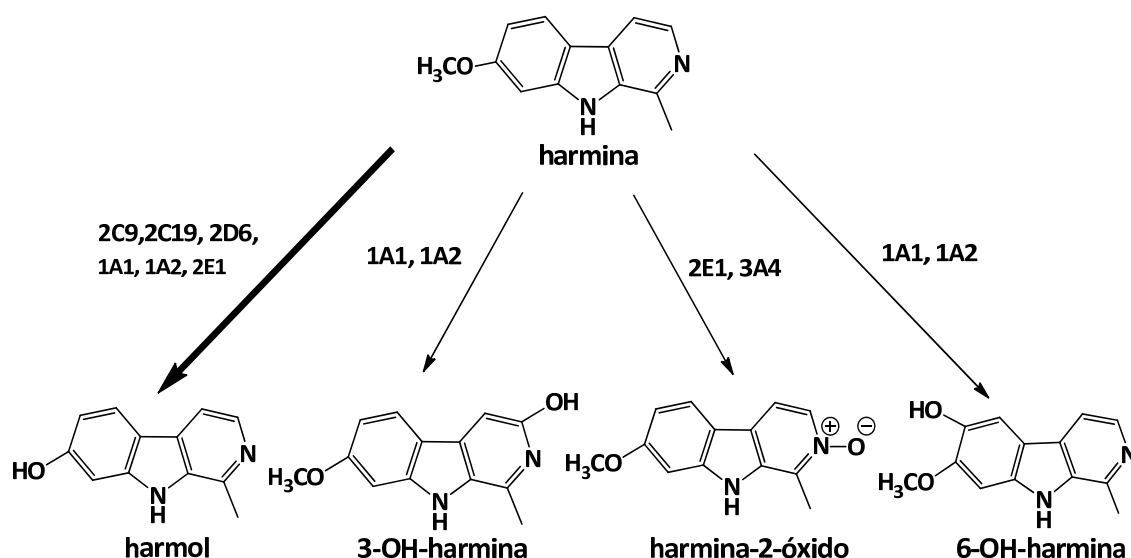


Figura 3.50 Esquema del metabolismo de harmina por citocromos P450

Con excepción del citocromo P450 1A1, las mismas enzimas anteriores son las responsables del metabolismo en microsomas hepáticos. La proporción relativa de citocromos P450 en éstos es aproximadamente: 30 % (3A4), 20 % (2C9), 15 % (1A2), 10 % (2E1), 5 % (2D6) y 5% (2C19)<sup>141</sup>. Por ello, basándonos en esta abundancia, el citocromo P450 2C9 podría ser el principal contribuyente al metabolismo de harmina para dar harmol en hígado. En todo caso, existe superposición y otros citocromos P450s como P450 1A2, P450 2C19, P450 2D6 y P450 2E1 participan asimismo en la metabolización de harmina a harmol. Los metabolitos 6-OH-harmina y 3-OH-harmina deben provenir en mayor medida del citocromo P450 1A2 y la harmina-2-óxido del P450 3A4. No obstante, el perfil metabólico en microsomas hepáticos no es extrapolable a otros tejidos donde pueden ejercer su acción estas  $\beta$ -carbolicinas. Por ejemplo, los citocromos P450 1A1, 2D6 y 2E1 se expresan en pulmón<sup>253</sup> y en cerebro<sup>254</sup> pudiendo, por tanto, participar en la biotransformación de harmina en estos tejidos.

El metabolismo de la harmina podría variar sustancialmente como consecuencia de la variabilidad de expresión genética de los citocromos P450 mencionados afectando con ello a su biodisponibilidad y efectos biológicos. Como se ha comentado, esta variabilidad se produce en el citocromo P450 1A2, y sobre todo, en los citocromos P450 polimórficos como P450 2D6 y P450 2C19. Por otro lado, los fenómenos de inducción química pueden afectar a los niveles de expresión de los citocromos P450 1A1, P450 1A2, P450 2C19 y P450 2E1, y en consecuencia, también, al metabolismo de la harmina por éstos.

En lo que respecta a la harmalina (véase **Figura 3.51**), su metabolismo se produjo por el citocromo P450 2D6 para dar el metabolito principal harmalol como producto de reacción de *O*-desmetilación y una contribución minoritaria de los citocromos P450 1A1 y P450 1A2. Por otro lado, hay que destacar la conversión de harmalina a harmina (deshidrogenación aromática) catalizada por P450 3A4, P450 1A1, P450 1A2 y P450 2D6. A su vez, la harmina se metaboliza dando lugar a sus metabolitos correspondientes: 3-hidroxiharmina, 6-hidroxiharmina, y harmol.

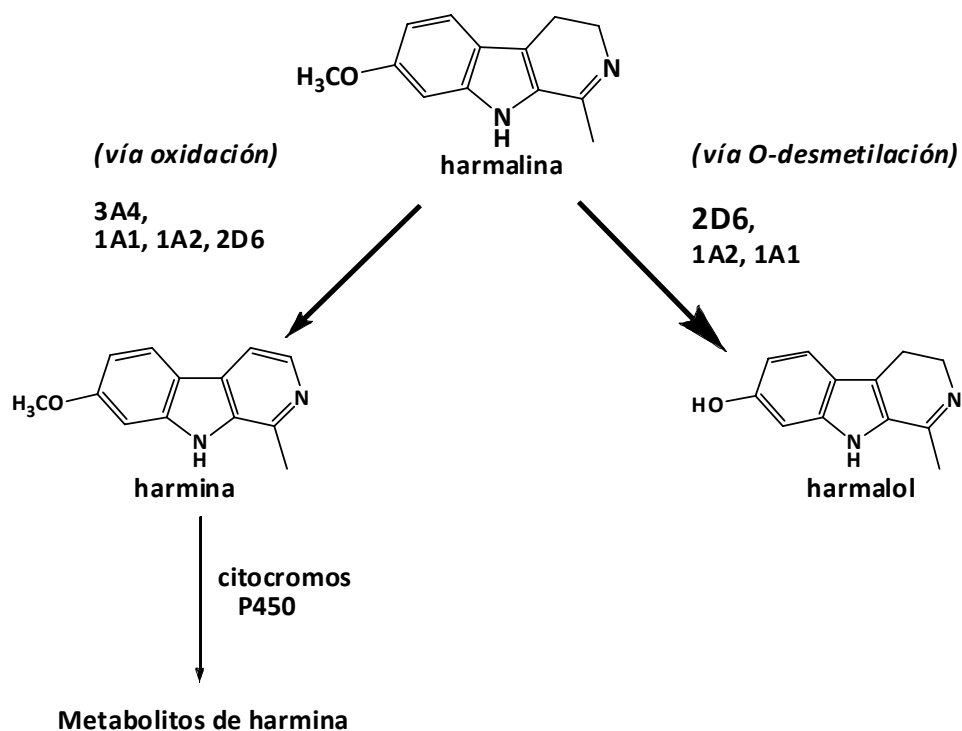
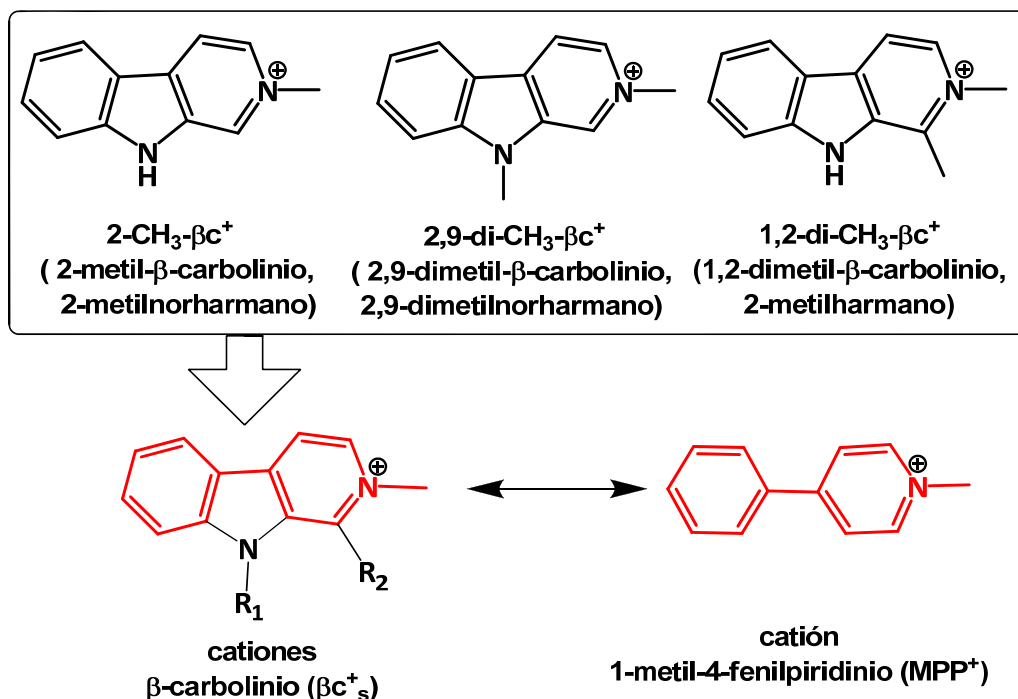


Figura 3.51 Esquema del metabolismo de harmalina por citocromos P450.

En suma, en microsomas hepáticos, el metabolismo de harmalina se debe principalmente al citocromo P450 2D6 con contribuciones menores de P450 1A2 y de P450 3A4. Al ser el citocromo P450 2D6 polimórfico, el metabolismo de esta sustancia podría variar sustancialmente entre individuos<sup>141 148</sup>. La harmina en cambio, no depende para su metabolización solo del citocromo P450 2D6, por lo que en este caso el polimorfismo de esta enzima no es determinante.

### 3.1.4. Los cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+$ ).

Los cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+$ ) son compuestos que tienen semejanza estructural y funcional con el catión 1-metil-4-fenilpiridinio ( $MPP^+$ ) (véase **Figura 3.52**). Al igual que éste, son sustancias neurotóxicas e inhiben la respiración mitocondrial, provocando la muerte celular<sup>117 221</sup>. Su formación *in vivo* puede ocurrir a partir de las  $\beta c_s$  o  $\text{th}\beta c_s$  por acción de enzimas *N*-metiltransferasas<sup>120</sup> y/o enzimas hemoperoxidasas<sup>108</sup>. De hecho, los cationes  $\beta c^+$  se han encontrado en muestras biológicas, incluido el cerebro humano<sup>102 106 119 120 121</sup> siendo su concentración relativa más elevada en muestras de enfermos de Parkinson<sup>102 121 223</sup>.



**Figura 3.52** Compuestos catiónicos  $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+$ ) y su analogía con la neurotoxina  $MPP^+$  (1-metil-4-fenilpiridinio).

Así pues, investigar y conocer la biotransformación y el metabolismo de los cationes  $\beta c^+$  tóxicos reviste indudable interés. A pesar de ello, no conocemos la existencia de estudios previos al respecto. En este apartado se investigó la biotransformación de los cationes  $\beta c^+$  (2-metil- $\beta$ -carbolinio) por los citocromos P450. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

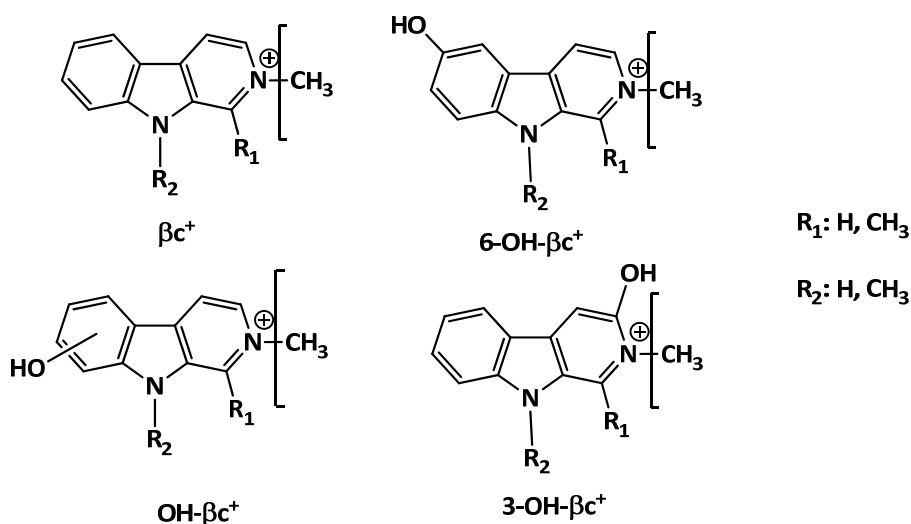
#### 3.1.4.1. Biotransformación de los cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+$ ) por citocromos P450.

Se incubaron los cationes  $\beta c^+$  con enzimas citocromo P450 (1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) por separado, y tras el análisis cromatográfico de los medios de incubación se detectaron varios metabolitos que dependieron de la enzima implicada (véase más adelante), y que se identificaron por sus espectros de masas (ionización en electrospray), espectros de absorción obtenidos por DAD y coelución con estándares como metabolitos de hidroxilación aromática (véase **Tabla 3.16** y **Figura 3.53**). Así, el 2-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  (2-metilnorharmano) dio lugar al 6-OH-2-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  y al 3-OH-2-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$ ; el 1,2-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  (2-metilharmano) proporcionó 6-OH-1,2-di-CH<sub>3</sub>-

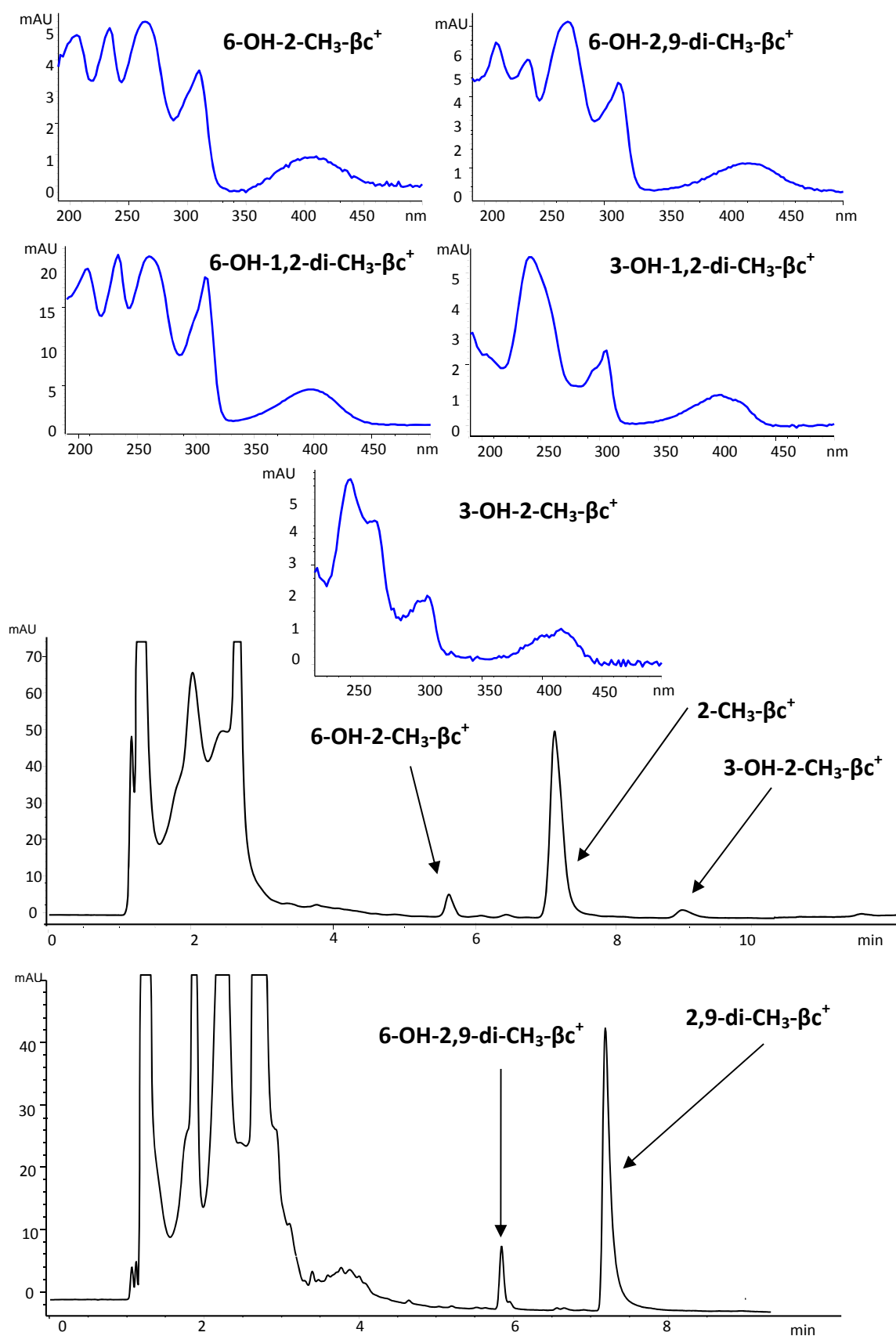
$\beta c^+$  y 3-OH-1,2-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$ , mientras que el 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  (2,9-dimetilnorharmano) dio lugar al 6-OH-2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  como principal metabolito. Junto a éstos se detectó un compuesto de hidroxilación adicional minoritario en una posición de hidroxilación no establecida. No se detectó reacción de *N*-desmetilación de los cationes 2-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  a las correspondiente  $\beta c_s$  aromáticas por acción de los citocromos P450 estudiados. En la **Figura 3.54** se muestran cromatogramas de la biotransformación del 2-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  y del 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  por los citocromos P450 1A1 y 2D6, respectivamente.

Compuestos ( $\beta c_s^+$ )	Metabolitos (ESI- positivo)				Nombre
	tr (min)	m/z (%)			
		(M) <sup>+</sup> (%)	M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> (100 V) <sup>1</sup>	M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> (170 V) <sup>1</sup>	
<b>2-CH<sub>3</sub>-<math>\beta c^+</math></b> (2-metilnorharmano) (tr 9.3 min) MS (m/z) (ESI +) (170 V): 183, M <sup>+</sup> ; 168, M <sup>+</sup> -15	7.6	199 (100 %)	-	184 (30 %)	6-OH-2-CH <sub>3</sub> - $\beta c^+$
	8.6	199 (100 %)	-	184 (25 %)	OH-2-CH <sub>3</sub> - $\beta c^+$
	13.5	199 (100 %)	-	184 (30 %)	3-OH-2-CH <sub>3</sub> - $\beta c^+$
<b>1,2-di-CH<sub>3</sub>-<math>\beta c^+</math></b> (2-metilharmano) (tr 10.48 min) MS (m/z) (170 V): 197, M <sup>+</sup> ; 182, M <sup>+</sup> -15	8.3	213 (100 %)	-	198 (15 %)	6-OH-1,2-di-CH <sub>3</sub> - $\beta c^+$
	9.4	213 (100 %)	-	198 (20 %)	OH-1,2-di-CH <sub>3</sub> - $\beta c^+$
	14.2	213 (100 %)	-	198 (18 %), 185 (5%), 170 (5 %)	3-OH-1,2-di-CH <sub>3</sub> - $\beta c^+$
<b>2,9-di-CH<sub>3</sub>-<math>\beta c^+</math></b> (2,9-dimetilnorharmano) (tr 10.05 min) MS (m/z) (ESI +) (170 V): 197, M <sup>+</sup> ; 182, M <sup>+</sup> -15	8.6	213 (100 %)	-	198 (55 %)	6-OH-2,9-di-CH <sub>3</sub> - $\beta c^+$
	9.5	213 (100 %)	-	198 (40 %)	OH-2,9-di-CH <sub>3</sub> - $\beta c^+$

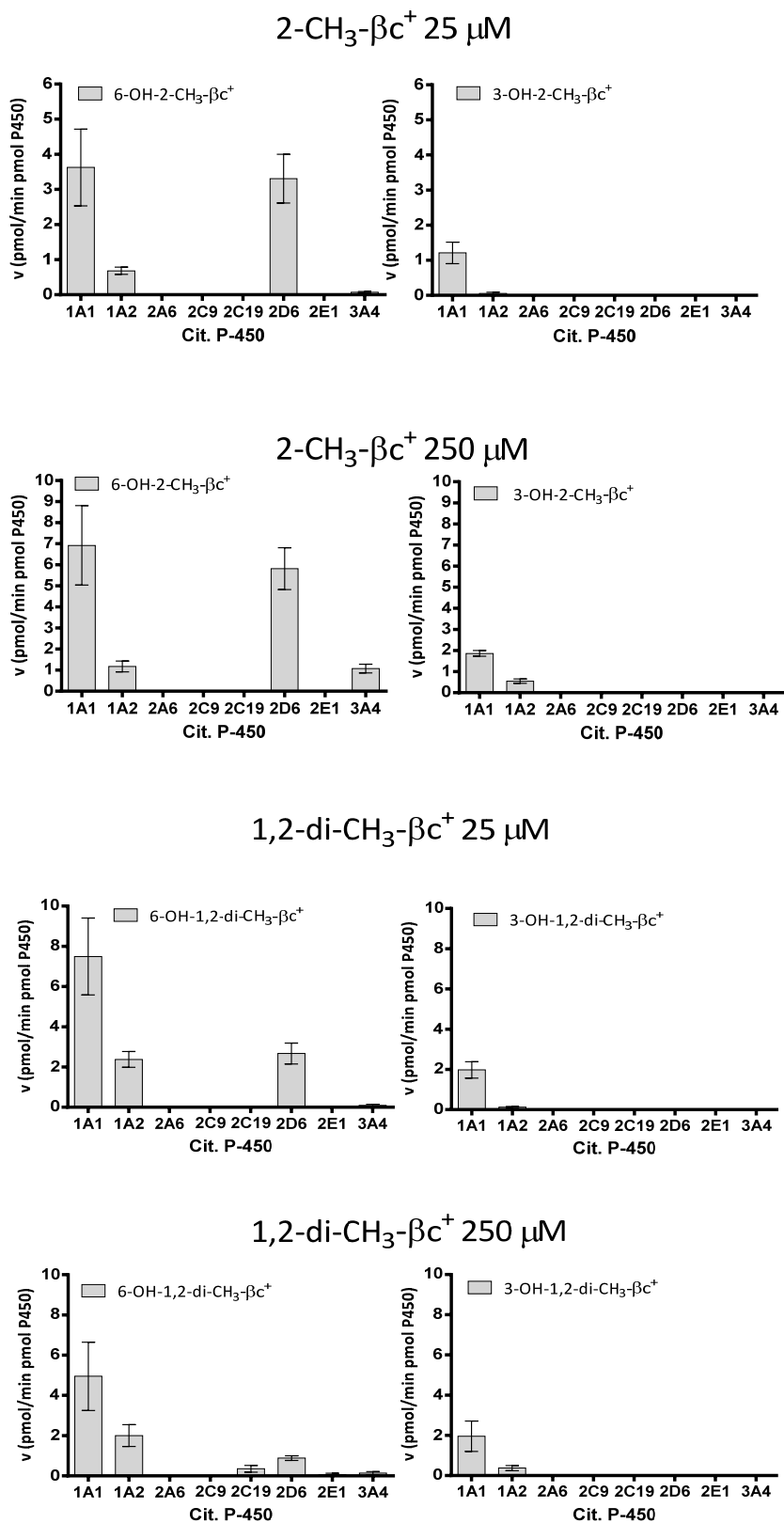
**Tabla 3.16** Metabolitos identificados por HPLC-MS (electrospray positivo) en los medios de incubación con enzimas de citocromo P450 con cationes  $\beta c_s^+$ . <sup>1</sup>Los valores de abundancia relativa son indicativos y varían con el voltaje de ionización (energía de colisión). A 100 V no se detectó pérdida de CH<sub>3</sub> pero sí a 170 V. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna Zorbax SB-C18 (150 x 2.1 mm) (0.3 mL/min) con eluyentes A: ácido fórmico 0.1 % (A) y B: 0.1 % ácido fórmico en ACN. 70 % B en 30 min. Los compuestos y metabolitos se recogen en la **Figura 3.52 y 3.53**.



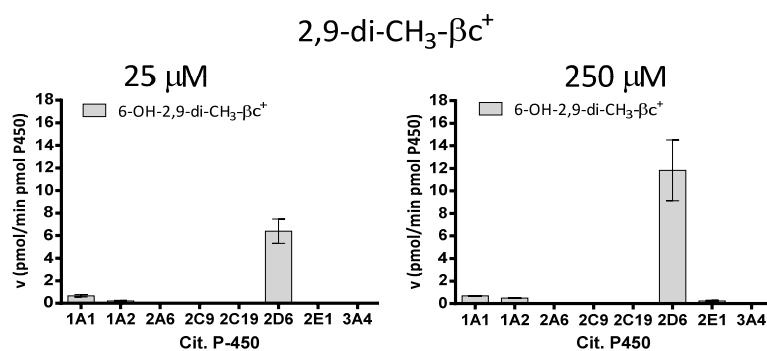
**Figura 3.53** Sustratos  $\beta c_s^+$  y sus metabolitos. Estos compuestos dan un prominente ion molecular al estar cargados (cationes piridinio) y pierden el metilo con una alta energía de ionización (170 V) (véase **Tabla 3.16**).



**Figura 3.54 ARRIBA** Espectros de los metabolitos detectados. **MEDIO** Cromatograma obtenido por RP-HPLC (Novapak C18) (Absorbancia 243 nm) de la biotransformación metabólica de 2-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (2-metil-β-carbolinio) (50 μM) con citocromo P450 1A1 (35 pmoles cit. P450/mL). **ABAJO** Cromatograma obtenido por RP-HPLC (Absorbancia a 243 nm) de la biotransformación metabólica de 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (2,9-dimetil-β-carbolinio) (50 μM) con citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL).



**Figura 3.55** Biotransformación de 2-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> y de 1,2-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (25 y 250 μM) por enzimas citocromo P450 (35 pmoles cit. P450/mL). Se produjeron problemas de solubilidad en 1,2-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (250 μM).



**Figura 3.56** Biotransformación del catión 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (25 y 250 μM) por enzimas citocromo P450 (35 pmoles cit. P450/mL).

En la **Figura 3.55** y en la **Figura 3.56** se recoge el perfil de metabolitos generado por los distintos citocromos P450. El 2-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (2-metilnorharmano) dio lugar al derivado hidroxilado 6-OH-2-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (6-OH-2-metilnorharmano) como metabolito mayoritario y se produjo principalmente por los citocromos P450 2D6 y 1A1 y en menor medida por 1A2 y 3A4. El segundo metabolito en importancia fue el 3-OH-2-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (3-OH-2-metilnorharmano) producido por el citocromo P450 1A1 y en menor grado por 1A2. El resto de citocromos P450 no metabolizó este catión βc<sup>+</sup> de manera significativa. El compuesto 1,2-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (2-metilharmano) produjo el 6-OH-1,2-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> como metabolito mayoritario por acción de los citocromos 1A1, 1A2 y 2D6, y en mucha menor medida por 2C19 y 3A4. La formación del 3-OH-1,2-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> se produjo por los citocromo P450 1A1 y 1A2. En lo que respecta al 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (2,9-dimetilnorharmano), se observó como metabolito prácticamente único, el 6-OH-2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup>, producido por el citocromo P450 2D6. No se observó formación del 3-OH-derivado de esta β-carbolina (**Figura 3.56**).

A continuación se estudiaron las principales reacciones metabólicas anteriores, ajustando la concentración de enzima y variando la concentración de sustrato. Tras este estudio se construyeron las correspondientes curvas de metabolización y se calcularon los parámetros cinéticos (véase **Figura 3.57** y **Tabla 3.17**). Los citocromos P450 2D6 y 1A1 produjeron el correspondiente metabolito 6-OH-derivado del 2-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> con buena eficacia catalítica en términos de V<sub>max</sub> y de V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>. La formación del 3-OH derivado por 1A1 se produjo con una V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub> menor que para el 6-OH derivado. En el 1,2-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup>, la formación de 6-OH- y 3-OH-1,2-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> por acción del citocromo P450 1A1, y del 6-OH derivado por 2D6, se produjo con buena eficacia catalítica en términos de V<sub>max</sub> y de V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>. El citocromo P450 2D6 metabolizó el 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> para dar el correspondiente 6-OH derivado con valores relativamente altos de V<sub>max</sub> y valores bajos de K<sub>m</sub> (buena afinidad) y como consecuencia se produjo una buena eficacia catalítica en términos de V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>.

La participación del citocromo P450 2D6 en la biotransformación de los cationes βc<sup>+</sup>s se confirmó con los correspondientes estudios de inhibición en presencia de quinidina (**Figura 3.58**).

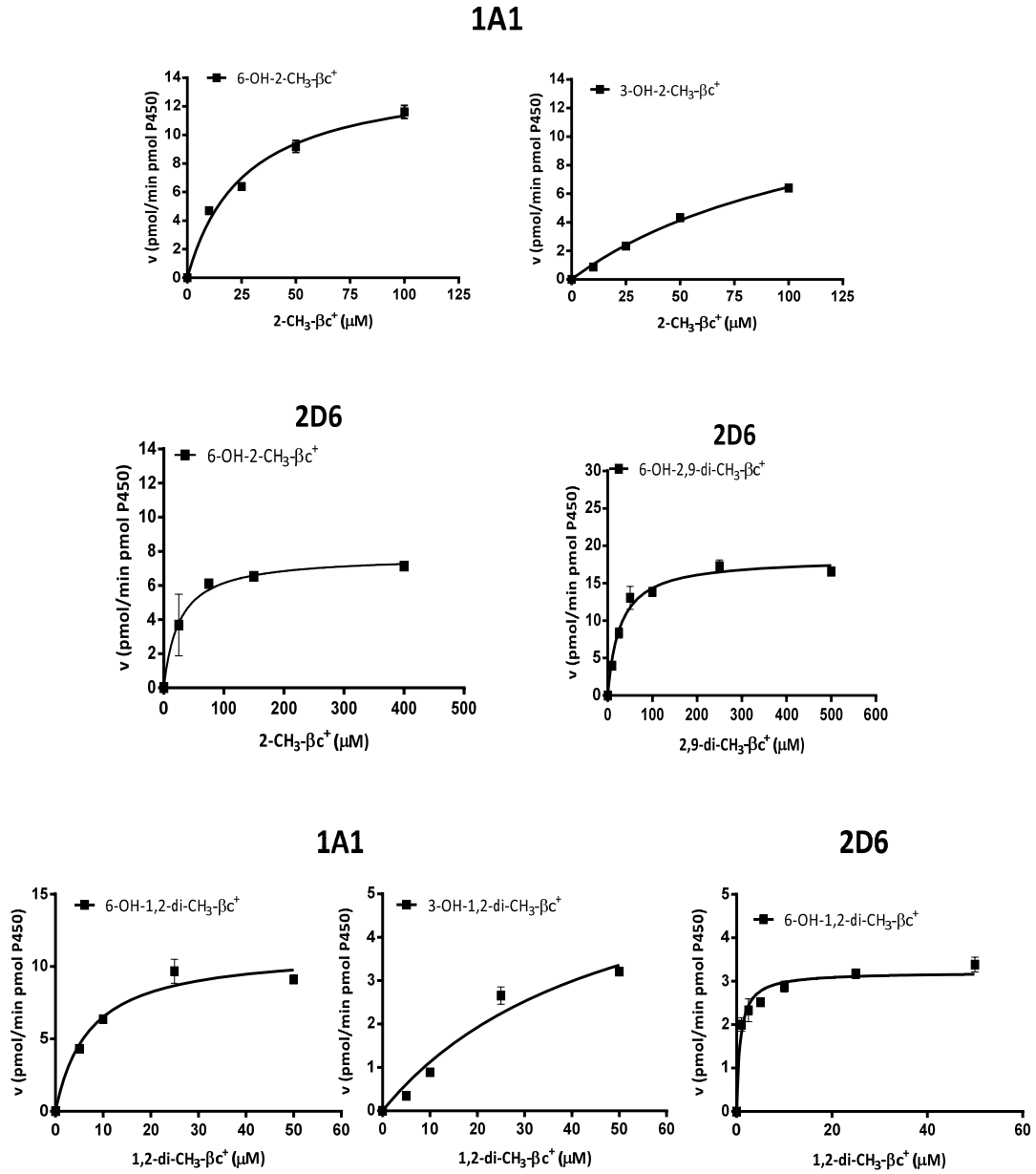
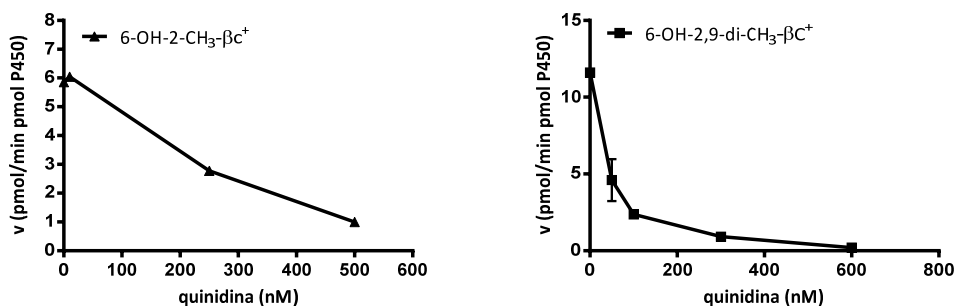


Figura 3.57 Curvas de metabolización de 2-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> por los citocromos P450 1A1 (ARRIBA) y 2D6 (MEDIO IZQUIERDA); curva de metabolización de 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> por el citocromo P450 2D6 (MEDIO DERECHA); curvas de metabolización de 1,2-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> por los citocromos P450 1A1 y 2D6 (hubo problemas de solubilidad en este catión por encima de 50 μM) (ABAJO) (35 pmoles cit. P450/mL).



**Figura 3.58** Inhibición de la biotransformación de 2-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (100 μM) (IZQUIERDA) y 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (100 μM) (DERECHA) por el citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL) en presencia de quinidina.

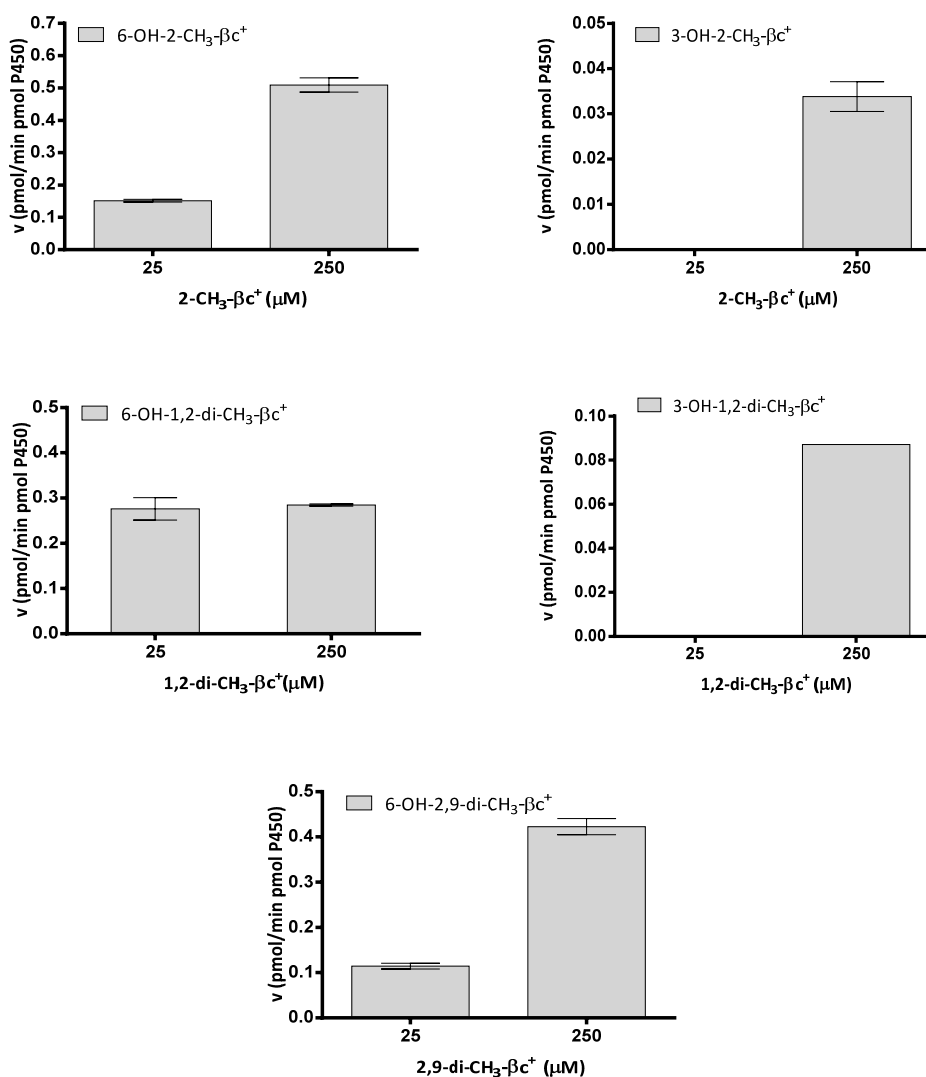
		2-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup>				
Cit. P450	6-OH-2-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup>			3-OH-2-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup>		
	V <sub>max</sub> (pmol/min pmol P450)	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (μL/min pmol P450)	V <sub>max</sub> (pmol/min pmol P450)	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (μL/min pmol P450)
<b>1A1</b>	14.30 ± 0.83	26.3 ± 4.20	0.54	14.80 ± 1.30	129.4 ± 29	0.11
<b>2D6</b>	7.72 ± 0.84	25.97 ± 10.8	0.30	-	-	-
		2,9-di-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup>				
Cit. P450	6-OH-2,9-di-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup>			3-OH-2,9-di-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup>		
	V <sub>max</sub> (pmol/min pmol P450)	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (μL/min pmol P450)	V <sub>max</sub> (pmol/min pmol P450)	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (μL/min pmol P450)
<b>2D6</b>	18.36 ± 0.62	27.96 ± 3.74	0.66	-	-	-
		1,2-di-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup> <sup>1</sup>				
Cit. P450	6-OH-1,2-di-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup>			3-OH-1,2-di-CH <sub>3</sub> -βc <sup>+</sup>		
	V <sub>max</sub> (pmol/min pmol P450)	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (μL/min pmol P450)	V <sub>max</sub> (pmol/min pmol P450)	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (μL/min pmol P450)
<b>1A1</b>	11.16 ± 0.70	7.15 ± 1.67	1.56	6.70 ± 1.77	49.70 ± 22.30	0.13
<b>2D6</b>	3.21 ± 0.09	0.78 ± 0.15	4.1	-	-	-

**Tabla 3.17** Parámetros cinéticos de la biotransformación metabólica de 2-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup>, 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup>, y 1,2-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup>.

<sup>1</sup> Los parámetros de este catión pueden estar afectados por problemas de solubilidad.

### 3.1.4.2. Metabolismo de los cationes $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+_s$ ) por microsomas hepáticos.

Los microsomas hepáticos metabolizaron los cationes  $\beta c^+_s$  y dieron lugar a los mismos metabolitos de hidroxilación que se detectaron con los citocromos P450 aislados (véase **Figura 3.59**). En el caso del  $2\text{-CH}_3\text{-}\beta c^+$ , el principal metabolito fue el  $6\text{-OH-}2\text{-CH}_3\text{-}\beta c^+$ , mientras que el  $3\text{-OH-}2\text{-CH}_3\text{-}\beta c^+$  se produjo minoritariamente. En el caso del  $2,9\text{-di-CH}_3\text{-}\beta c^+$ , los microsomas hepáticos metabolizaron este compuesto dando como principal metabolito el  $6\text{-OH}$  derivado. En este caso no se detectó el correspondiente  $3\text{-OH}$  derivado. El  $1,2\text{-di-CH}_3\text{-}\beta c^+$  dio lugar al  $6\text{-OH}$  derivado como metabolito principal y al  $3\text{-OH}$  derivado como metabolito minoritario de manera similar al  $2\text{-CH}_3\text{-}\beta c^+$ .

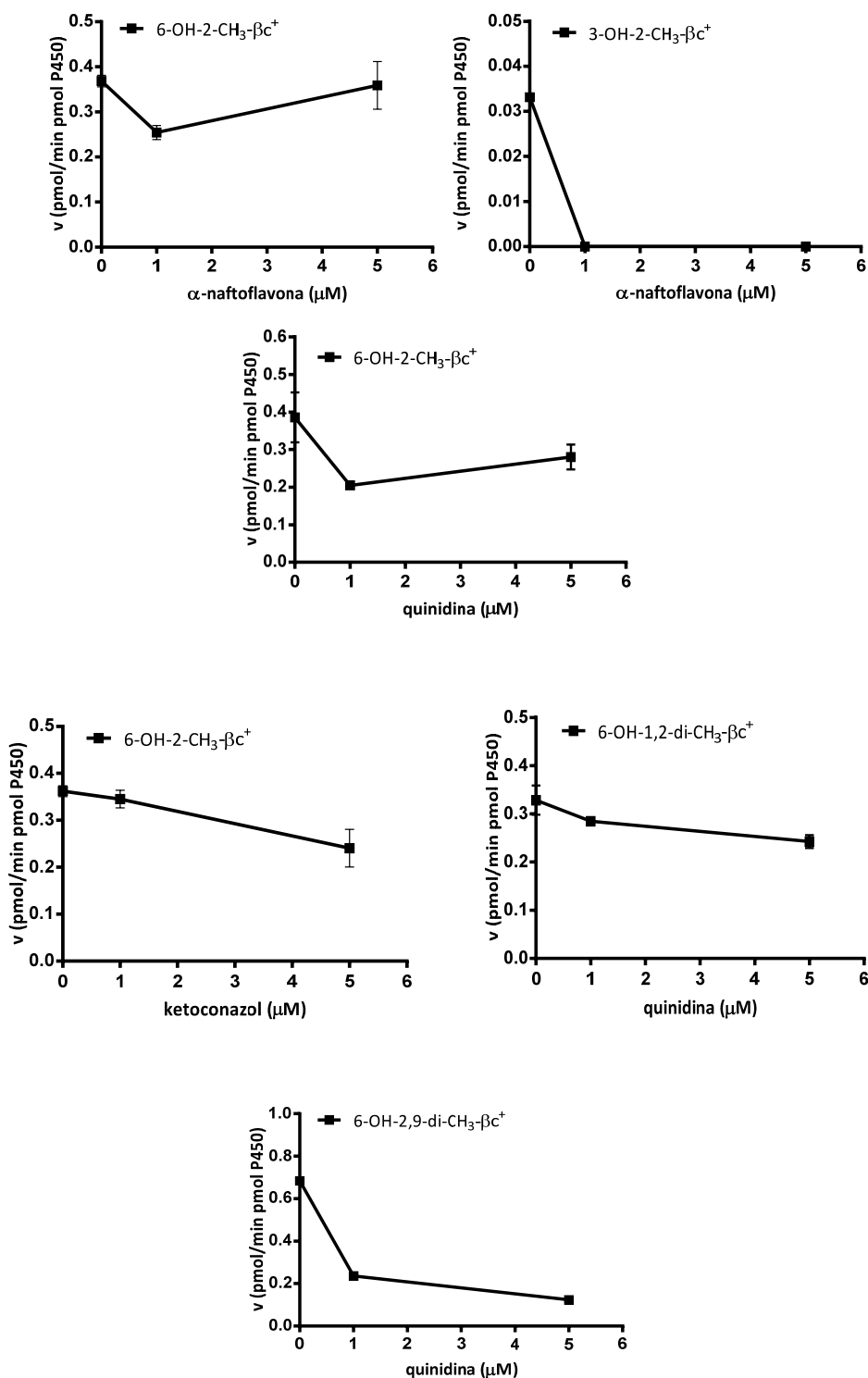


**Figura 3.59** ARRIBA Metabolización de  $2\text{-CH}_3\text{-}\beta c^+$  ( $2\text{-CH}_3\text{-}\beta$ -carbolinio) por microsomas hepáticos humanos (175 pmoles cit. P450/mL). MEDIO Metabolismo de  $1,2\text{-di-CH}_3\text{-}\beta c^+$  ( $1,2\text{-di-CH}_3\text{-}\beta$ -carbolinio) por microsomas (175 pmoles cit. P450/mL) (problemas de solubilidad en 250  $\mu\text{M}$  de  $1,2\text{-di-CH}_3\text{-}\beta c^+$ ). ABAJO Metabolización de  $2,9\text{-di-CH}_3\text{-}\beta c^+$  ( $2,9\text{-di-CH}_3\text{-}\beta$ -carbolinio) por microsomas (175 pmoles cit. P450/mL).

Los resultados en presencia de inhibidores selectivos se recogen en la **Figura 3.60**. La  $\alpha$ -naftoflavona inhibió claramente la formación del 3-OH-derivado del 2-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup> pero no la formación del correspondiente 6-OH derivado. Por su parte, la quinidina inhibió parcialmente la formación de 6-OH-2-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup>, pero no inhibió el 3-OH-derivado (no mostrado en la figura). Estos datos sugieren que la formación del 3-OH derivado por microsomas hepáticos ocurre principalmente con la participación del citocromo P450 1A2 mientras que la del 6-OH derivado puede ocurrir con la participación del citocromo P450 2D6 y de otros. El ketoconazol inhibió ligeramente la formación del 6-OH derivado, sugiriendo que esta hidroxilación puede ocurrir con intervención del citocromo P450 3A4 (véase en los resultados con enzimas). Del mismo modo, la formación del 6-OH derivado del 1,2-di-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup> se inhibió solo ligeramente por quinidina, indicando que este metabolito no se forma exclusivamente por P450 2D6, lo que está de acuerdo con los datos obtenidos anteriormente. En cambio, el metabolismo de 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup> por microsomas hepáticos para dar 6-OH-2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup> se inhibió sustancialmente en presencia de quinidina (véase **Figura 3.60**), indicando la participación principal del citocromo P450 2D6.

En resumen, la biotransformación de cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta$ c<sup>+</sup><sub>s</sub>) se recoge en el esquema de la **Figura 3.61**. El 2-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup> dio lugar a los metabolitos de hidroxilación aromática, 6-OH-2-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup> y 3-OH-2-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup>. La formación del 6-OH derivado se produjo principalmente por acción de los citocromos P450 2D6 y P450 1A1, y en mucha menor medida por los citocromos P450 1A2 y P450 3A4. La formación del 3-OH derivado se produjo en exclusiva por los citocromos P450 1A1 y P450 1A2. No se detectaron reacciones de *N*-desmetilación. El mismo comportamiento se produjo con el catión 1,2-di-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup>. Estas mismas enzimas participan en el metabolismo por microsomas hepáticos exceptuando el citocromo P450 1A1 que no se encuentra en estos microsomas hepáticos. Entre los compuestos estudiados se produjo una diferencia interesante: los citocromos P450 1A1 y P450 1A2 metabolizaron los compuestos 2-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup> y 1,2-di-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup> pero no el 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup>. Este último, se metabolizó principalmente por el citocromo P450 2D6. Una posible explicación a este hecho, es que los dos primeros cationes  $\beta$ c<sup>+</sup> se pueden encontrar a pH fisiológico (pH 7.4) como compuestos en forma de base desprotonada, perdiendo su carácter catiónico (véase **Figura 3.62**)<sup>119</sup>. Este hecho facilitaría la actividad de los citocromos P450 1A1 y 1A2, como ocurre en el caso de las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas (véase apartado 3.1.3 de esta memoria). Sin embargo, el 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup> se comporta de manera distinta al no formar anhidrobase y permanecer sólo como catión<sup>119</sup>, metabolizándose exclusivamente por el citocromo P450 2D6. El comportamiento de esta sustancia recuerda más a las th $\beta$ c<sub>s</sub> del apartado 3.1.1, las cuales necesitan un átomo de nitrógeno con carga positiva para la interacción en el centro activo del citocromo 2D6. El comportamiento singular observado con el catión 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta$ c<sup>+</sup> podría ser relevante en cuanto a su toxicidad y/o detoxificación. En efecto, entre los cationes  $\beta$ -carbolinio, este catión es la neurotoxina más potente *in vivo*<sup>106 223</sup>. Su metabolismo oxidativo (detoxificación) podría estar más desfavorecido al depender en exclusiva del citocromo P450 2D6. Este hecho podría incrementar la estabilidad de este catión y por lo tanto su toxicidad en comparación con otros cationes  $\beta$ c<sup>+</sup>, que son hidroxilados también por varias enzimas, dando lugar a 6-OH y 3-OH derivados. La

participación en exclusiva del citocromo P450 2D6 en el metabolismo de la toxina 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> es asimismo interesante debido al carácter polimórfico de esta enzima y a su gran variabilidad entre individuos, así como a su alteración en estados patológicos<sup>212</sup>.



**Figura 3.60** Inhibición de la metabolización de 2-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (250 μM) (gráficas 1 a 4), 1,2-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (250 μM) (gráfica 5) y de 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> (250 μM) (gráfica 6) por microsomas hepáticos (175 pmoles cit P450/mL) en presencia de varios inhibidores.

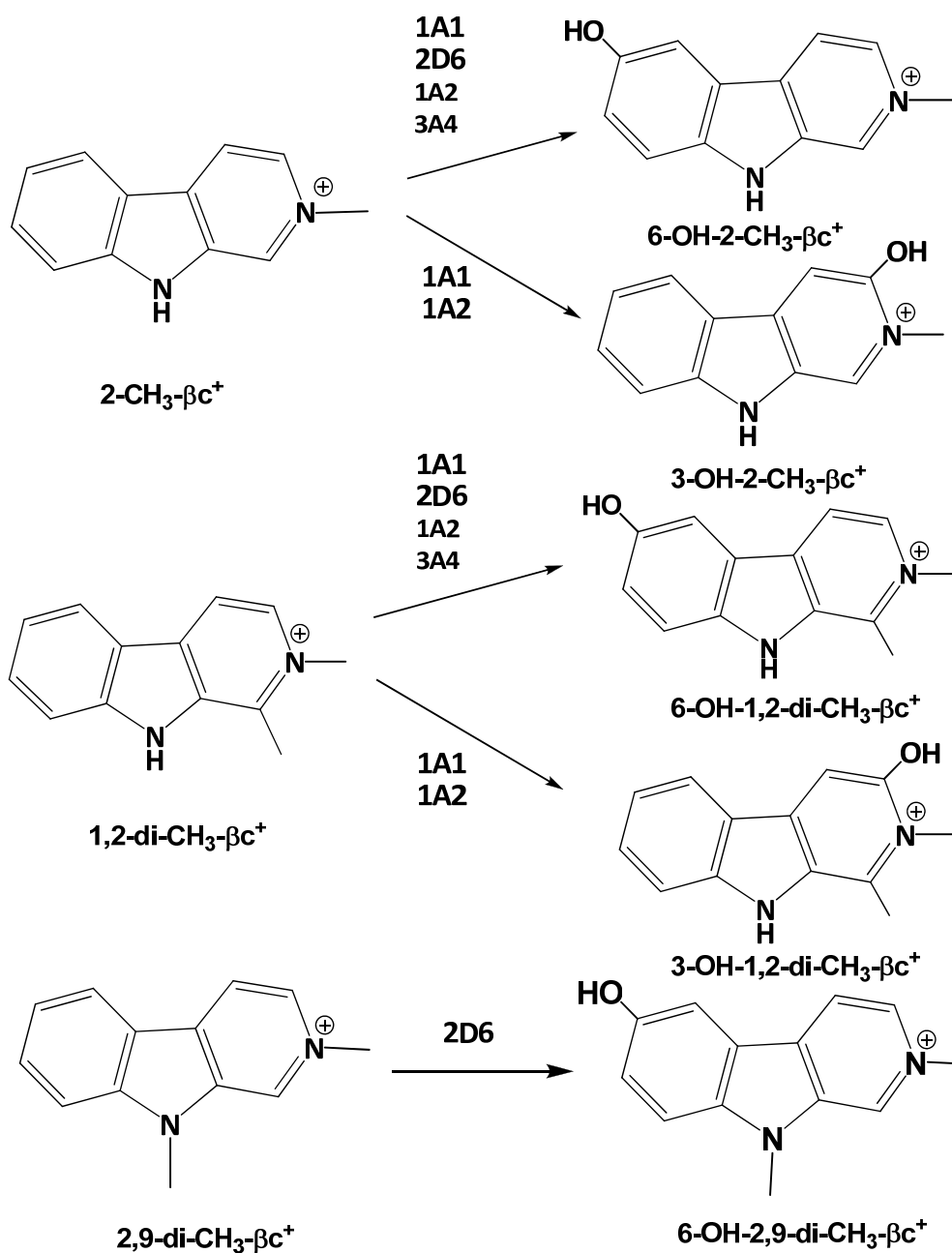
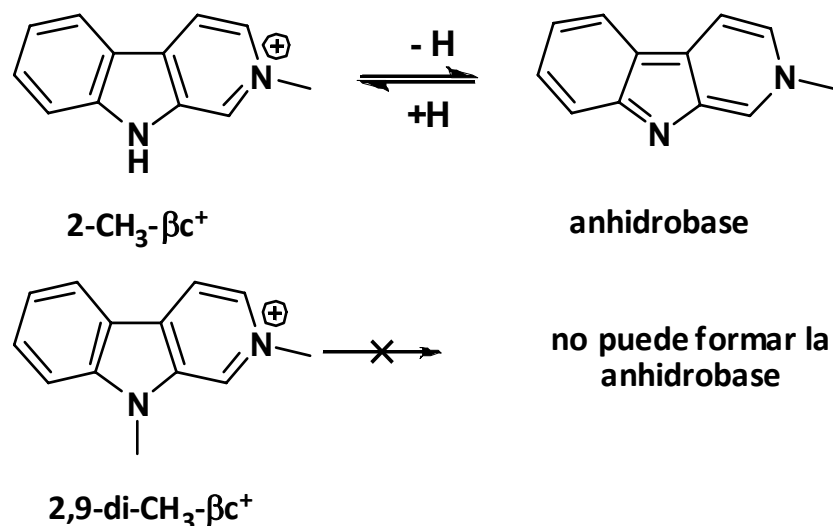


Figura 3.61 Esquema de metabolización de los cationes  $\beta c^+$ , por citocromos P450.



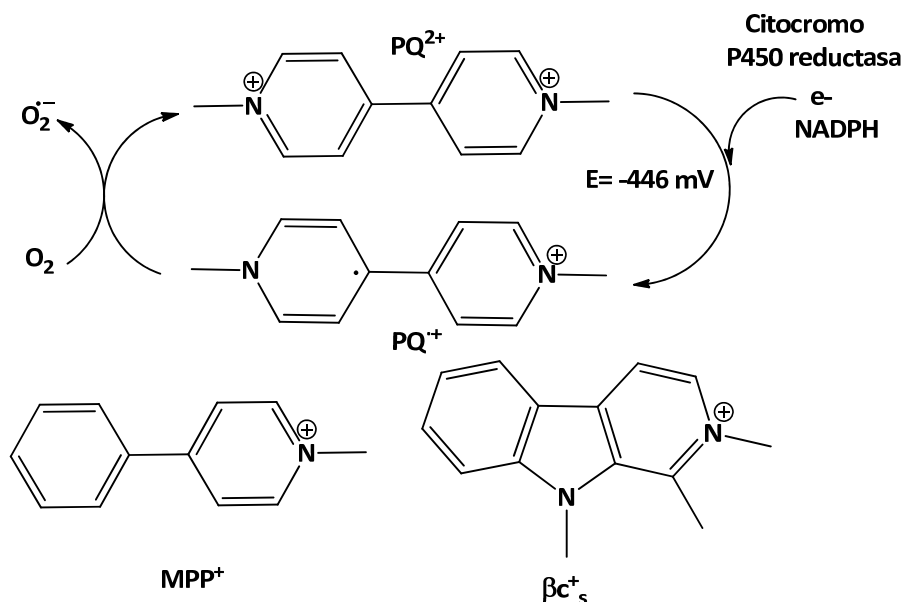
**Figura 3.62** Equilibrio entre la base desprotonada (neutra) y la forma protonada (catiónica) del 2-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup>. El 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> no puede establecer dicho equilibrio al no disponer de un hidrógeno en posición 9.

Un análisis comparado entre las βc<sub>s</sub> neutras (apartado 3.1.3) y los cationes βc<sup>+</sup>, indica que estos últimos se metabolizan por citocromos P450 con una eficacia metabólica en términos de V<sub>max</sub> y de V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub> notablemente menor (4-10 veces menor para el 6-OH-derivado y aun menor para el 3-OH-derivado) que las primeras. Este hecho indica por tanto una mayor estabilidad metabólica relativa de los cationes βc<sup>+</sup>, lo cual podría tener alguna relación con su mayor toxicidad *in vivo*. Además, en los cationes βc<sup>+</sup> el metabolismo se produjo con una mayor participación relativa del citocromo P450 2D6 (más aun en el catión 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup>), y esta enzima está en menor proporción relativa que otras enzimas implicadas en la metabolización de βc<sub>s</sub> como el citocromo P450 1A2.

En suma, los resultados obtenidos aportan nueva información sobre el metabolismo y la biotransformación de los cationes βc<sup>+</sup> por citocromos P450. Estas sustancias son toxinas que se retienen en el interior de la mitocondria provocando inhibición mitocondrial y muerte celular<sup>106 223</sup>. Estos cationes se producen desde las correspondientes βc<sup>+</sup> aromáticas o desde thβc<sub>s</sub> por acción de *N*-metiltransferasas<sup>107 120</sup> o hemoperoxidasas<sup>108</sup> y se han detectado en mayor concentración en muestras de cerebro humano post-mortem y en el fluido cerebroespinal de enfermos de Parkinson<sup>106 102</sup>. Según se desprende de los resultados obtenidos aquí, el citocromo P450 2D6 podría participar en la protección contra los cationes tóxicos βc<sup>+</sup> al igual que ocurre con el MPTP. En este sentido, resultados recientes sugieren que este citocromo ejerce un papel en neuroprotección<sup>212</sup>.

### 3.1.5. Reducción de los cationes $\beta\text{c}^+_s$ y piridinio.

Algunas sustancias tóxicas ejercen su acción a través de la generación de radicales libres producidos por reducción del oxígeno molecular. Son ejemplos de ello: el paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio o metil viológeno), un herbicida que causa fibrosis pulmonar y neurotoxicidad en mamíferos<sup>255 256 257 258</sup> (véase **Figura 3.63**), y las quinonas<sup>259</sup>.



**Figura 3.63** El paraquat (PQ<sup>2+</sup>) se reduce enzimáticamente dando lugar al radical PQ<sup>•+</sup> que reacciona con O<sub>2</sub> generando el radical anión superóxido. El MPP<sup>+</sup> y los cationes  $\beta\text{c}^+_s$  tienen cierta analogía con el paraquat.

El paraquat y sus análogos<sup>256 260</sup> se reducen enzimáticamente por la enzima citocromo P450 reductasa y por distintos complejos mitocondriales<sup>260</sup>, interceptando un electrón y dando lugar a un radical que reacciona con el oxígeno molecular del medio y genera el radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (véase **Figura 3.63**). Como consecuencia de este mecanismo, se genera un ciclo redox acoplado al consumo del cofactor NADPH que produce especies reactivas de oxígeno (ROS) (anión superóxido, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y radical hidroxilo).

La neurotoxina MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridinio) es también un catión de piridinio<sup>257</sup>, y por tanto, al igual que el paraquat, podría participar en la generación de radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y ROS mediante reducción por reductasas<sup>261 262 263 264</sup>. Los cationes  $\beta\text{c}^+_s$  son análogos estructurales y funcionales del MPP<sup>+</sup> (véase **Figura 3.64**) y como éste, son potentes toxinas. En el apartado anterior se ha demostrado que estos compuestos se metabolizan por citocromos P450. Este metabolismo lleva asociado la participación de la enzima citocromo P450 reductasa como dadora-transportadora de electrones desde el cofactor NADPH hasta la enzima citocromo P450 (véase **Figura 1.7**). Hipotéticamente, durante su biotransformación enzimática, los cationes  $\beta\text{c}^+_s$  podrían generar especies reactivas de oxígeno (ROS) si se reducen por la citocromo P450 reductasa, siguiendo el mismo esquema de la **Figura 3.63**. En este apartado se investigó esta posibilidad, evaluando la reducción enzimática de los cationes  $\beta\text{c}^+_s$  (2-CH<sub>3</sub>- $\beta\text{c}^+_s$ , 1,2-di-CH<sub>3</sub>- $\beta\text{c}^+_s$ , 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta\text{c}^+_s$  y 1,2,9-tri-CH<sub>3</sub>- $\beta\text{c}^+_s$ ; véase **Figura 3.64**) por

enzimas reductasas, y particularmente por citocromo P450 reductasa, así como su comparación con el MPP<sup>+</sup>, paraquat y quinonas.

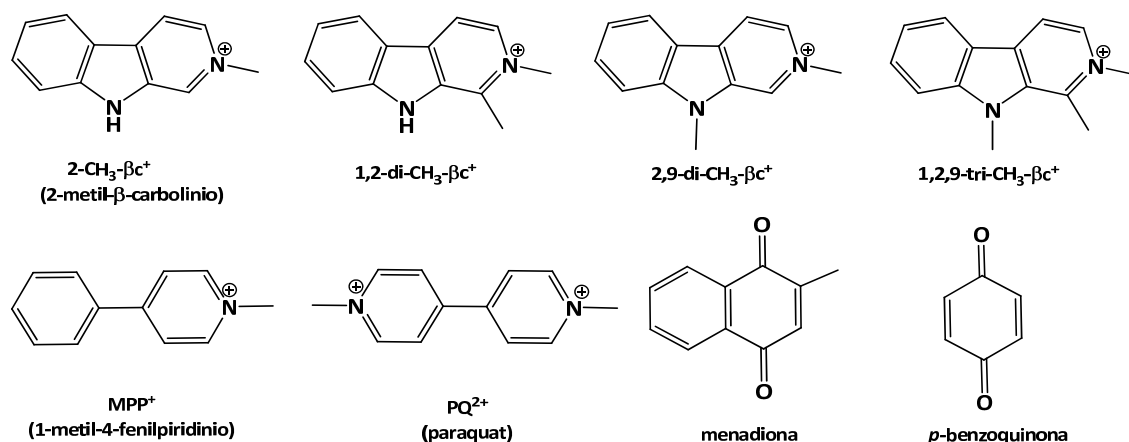


Figura 3.64 Compuestos evaluados como sustratos de reductasas y generadores de especies reactivas de oxígeno (ROS).

### 3.1.5.1. Reducción de cationes βc<sup>+</sup> y piridinio. Voltametría cíclica y Resonancia de Espín Electrónico (REE).

El paraquat proporcionó valores de reducción en voltametría correspondientes a sus dos transiciones monoeléctricas (-0.45 y -0.8 V)<sup>265 266 267</sup>. La reducción del MPP<sup>+</sup> y de los cationes βc<sup>+</sup> proporcionó voltamogramas con potenciales de reducción más negativos que el paraquat (véase **Figura 3.65**). En la literatura se ha descrito un voltaje de reducción del MPP<sup>+</sup> por un electrón de -1.1 V<sup>268</sup>.

El paraquat dio lugar a un radical estable azul por reducción con un reductor químico (ditionito sódico) similar al detectado en REE en la reacción electroquímica (**Figura 3.66**). La reducción enzimática del paraquat por citocromo P450 reductasa y NADPH en presencia del secuestrador de radicales DMPO proporcionó especies radicálicas que cualitativamente se podrían asignar a una mezcla de radicales hidroxilo, superóxido y radicales centrados en carbono (es decir señales de DMPO-OH, DMPO-OOH, y DMPO-R) (**Figura 3.66**). Por tanto, el paraquat dio lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS) vía reducción enzimática, lo cual está de acuerdo con los datos de la literatura<sup>269</sup>.

El MPP<sup>+</sup> y los cationes βc<sup>+</sup> no dieron radicales estables mediante reducción química. En el MPP<sup>+</sup> se detectó la formación de un radical por reducción electroquímica parecido al descrito en la literatura<sup>270</sup>. En el ensayo de reducción del MPP<sup>+</sup> con citocromo P450 reductasa y NADPH en presencia del atrapador DMPO, se detectaron señales de REE que no se asignan a radicales de oxígeno (**Figura 3.67**). Por reducción electroquímica de βc<sup>+</sup>, solo se observó la formación aparente de un radical en 1,2-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup> y 1,2,9-tri-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup>. Sin embargo, en el ensayo enzimático de reducción con citocromo P450 reductasa-NADPH en presencia del atrapador de radicales DMPO, no se detectaron radicales de oxígeno cuando se compararon con un control sin enzima (**Figura 3.67**).

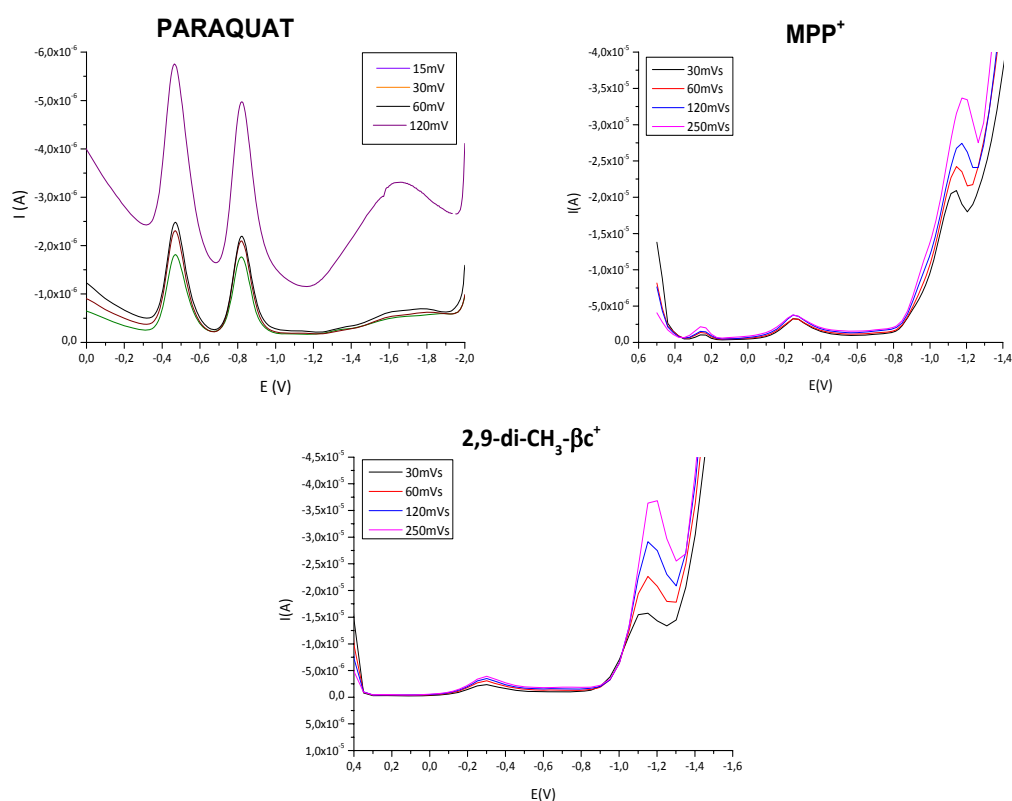


Figura 3.65 Voltametrías de pulso diferencial de paraquat (DMSO) y de los cationes  $MPP^+$  y de  $2,9\text{-di-CH}_3\text{-}\beta c^+$  (tampón fosfato).

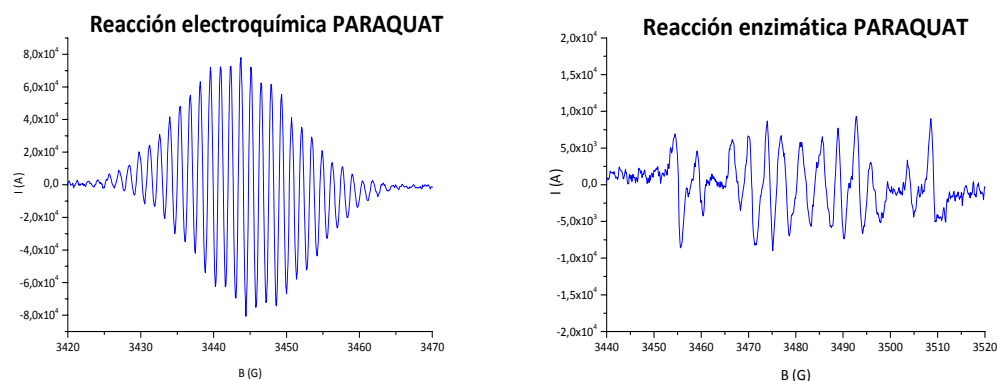


Figura 3.66 Espectro de REE del radical del paraquat (sustrato 2 mM) en los ensayos electroquímicos y espectro de REE de los ensayos enzimáticos con citocromo P450 reductasa (0,15 mg prot./mL), paraquat (500  $\mu\text{M}$ ), NADPH (1mM) y atrapador DMPO (5 mM).

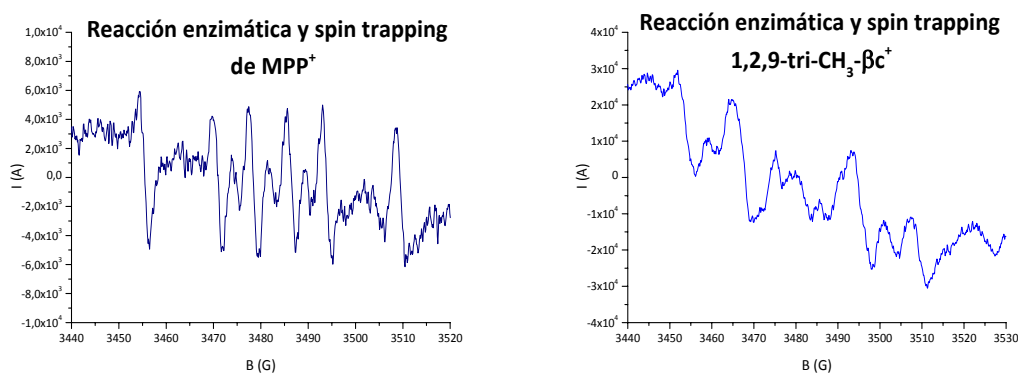


Figura 3.67. Espectro de REE en los ensayos enzimáticos en presencia de citocromo P450 reductasa (0.15 mg prot. /mL),  $MPP^+$  (500  $\mu\text{M}$ ), o catión  $1,2,9\text{-tri-CH}_3\text{-}\beta c^+$  (500  $\mu\text{M}$ ), NADPH (1 mM) y del atrapador DMPO (5 mM).

Los resultados obtenidos confirmaron que el paraquat tras su reducción enzimática puede dar lugar a radicales de oxígeno. Este hecho no se reprodujo con el MPP<sup>+</sup> o los cationes  $\beta\text{c}_s^+$ . Sin embargo, los resultados de los experimentos de REE resultaron complejos debido a las dificultades experimentales intrínsecas no permitiendo descartar por completo la posible generación de radicales superóxido tras la reducción enzimática de estos compuestos por reductasas. Con el fin de aclarar este punto, se realizaron estudios espectrofotométricos de detección de radicales, que se presentan a continuación.

### 3.1.5.2. Reducción de los cationes $\beta\text{c}_s^+$ , piridinio y quinonas. Estudios espectrofotométricos.

Se llevaron a cabo estudios de reducción enzimática de los compuestos objeto de estudio (véase **Figura 3.64**), y se evaluó la generación del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Para ello se realizaron dos tipos de estudios:

- a) Estudios de la oxidación (consumo) del cofactor NADPH durante la reducción de los compuestos objeto de estudio.
- b) Estudios de la formación del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) durante la reducción enzimática de los compuestos objeto de estudio. Para ello, se siguió la reducción del citocromo C o del citocromo C acetilado en presencia o ausencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD). La diferencia entre la reducción del citocromo C en presencia y en ausencia de SOD (actividad de reducción restante) se atribuye al anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) generado durante la reducción de los compuestos objeto de estudio<sup>195</sup>. Por otro lado, la reducción del citocromo C acetilado se produce por acción del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  generado en el medio pues esta proteína no se reduce por la reductasa.

En primer lugar se utilizó una reductasa de *Lactobacillus plantarum* clonada recientemente y caracterizada en nuestro laboratorio como una nitrobenzoato reductasa que utiliza NADPH como cofactor<sup>185</sup>. Esta enzima es una flavoproteína con capacidad para reducir *p*-nitrobenzoato y 2,4-dinitrobenzoato. En presencia de quinonas (*p*-benzoquinona y menadiona) como sustratos, se observó oxidación del NADPH durante la incubación con esta reductasa (véase **Figura 3.68**). Sin embargo, no se observó apenas actividad de reducción (medida indirectamente como oxidación de NADPH) en presencia del paraquat, MPP<sup>+</sup> o cationes  $\beta\text{c}_s^+$ . Deducimos por tanto que esta enzima no utilizó los cationes  $\beta\text{c}_s^+$ , MPP<sup>+</sup> o el paraquat como sustratos, aunque sí las quinonas, menadiona y *p*-benzoquinona. Durante la biotransformación por citocromos P450, la transferencia de electrones desde el cofactor NADPH a los citocromos P450 se realiza mediante la enzima citocromo P450 reductasa, y es esta misma reductasa la que participa en la generación de ROS en compuestos susceptibles de dar ciclos redox (véase **Figura 3.63**). En los experimentos realizados para esta Tesis Doctoral observamos que la enzima citocromo P450 reductasa humana expresada en microsomas utilizó como sustratos las quinonas (menadiona y *p*-benzoquinona) y el paraquat, posibilitando con ello la oxidación del NADPH (véase **Figura 3.68**). En cambio, la misma enzima no mostró actividad en presencia de MPP<sup>+</sup> o de los cationes  $\beta\text{c}_s^+$ . Con la enzima citocromo P450 reductasa

humana purificada se obtuvieron resultados similares, si bien en este caso la actividad enzimática con los sustratos activos fue superior (véase **Figura 3.68**). En cualquier caso, no se detectó la utilización de los cationes  $\beta c_s^+$  o del catión MPP<sup>+</sup> (catión piridinio) como sustratos de esta reductasa.

La reducción catalizada por citocromo P450 reductasa de compuestos que dan lugar a ciclos redox (reducción por un electrón) como el paraquat, se acompaña de la generación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) por transferencia de un electrón al oxígeno. Por ello, si los cationes piridinio (MPP<sup>+</sup>) o  $\beta c_s^+$  dieran lugar a un ciclo redox similar al paraquat, la reducción de éstos se debería acompañar de la generación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Para determinar si se genera  $O_2^{\bullet-}$  en el medio, se estudió la reducción del citocromo C y del citocromo C acetilado, en presencia o ausencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y de los cationes  $\beta c_s^+$  y de piridinio.

Los resultados obtenidos sobre la reducción enzimática del citocromo C en presencia y ausencia de SOD y de los compuestos objeto de estudio se muestran en la **Figura 3.69**. En estos experimentos la diferencia entre la reducción del citocromo C en presencia o ausencia de SOD se atribuye a la presencia del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) generado en la reacción. No se apreció generación de  $O_2^{\bullet-}$  en presencia de MPP<sup>+</sup>,  $\beta c_s^+$  o benzoquinona. En cambio, sí se apreció generación  $O_2^{\bullet-}$  con menadiona y paraquat. En efecto, la menadiona y el paraquat incrementaron la reducción del citocromo C (inhibible por SOD), indicando la generación del  $O_2^{\bullet-}$ . En cambio los cationes  $\beta c_s^+$  o el catión MPP<sup>+</sup> no incrementaron de manera significativa la reducción del citocromo C, inhibible por SOD, sugiriendo que estas sustancias no generan radicales superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) por acción de la enzima citocromo P450 reductasa.

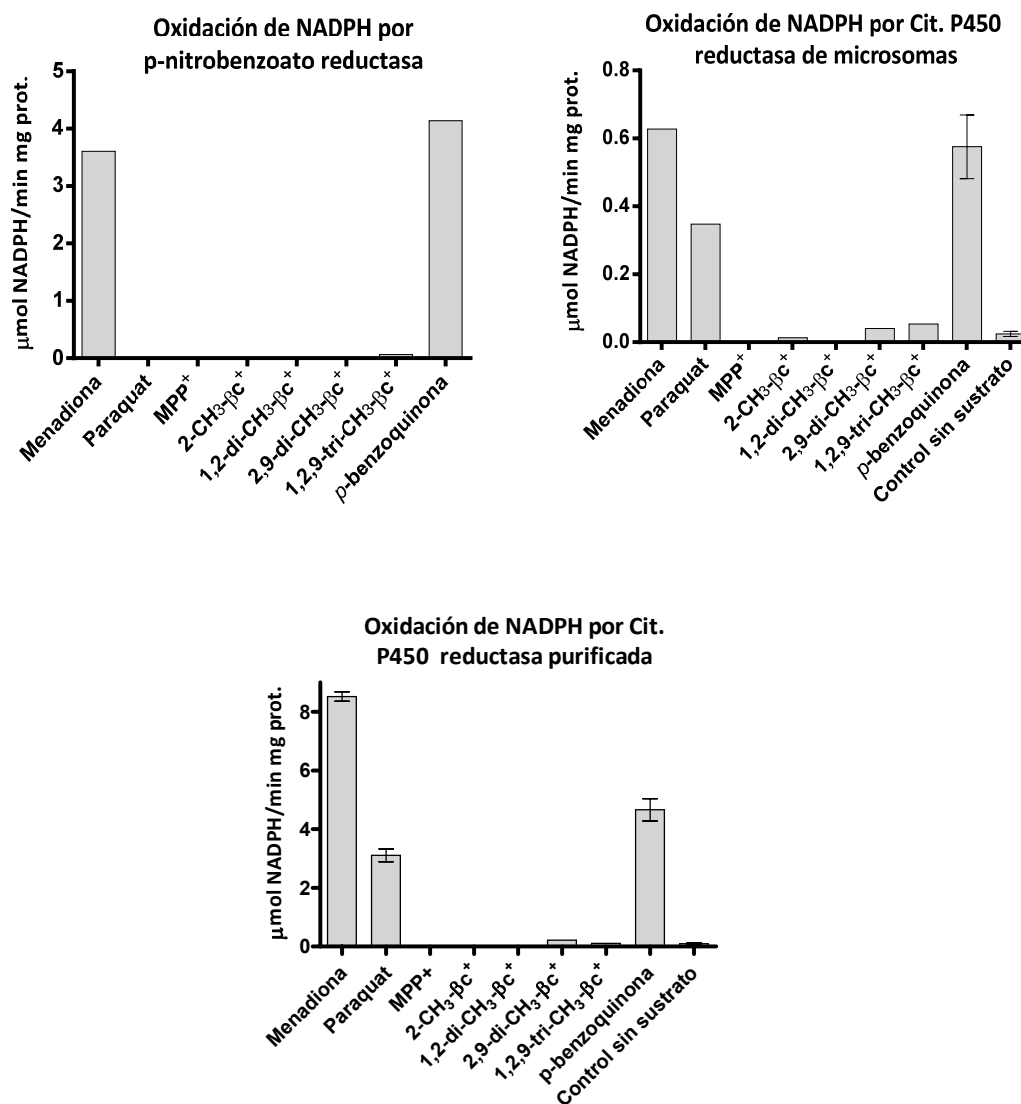
En otros experimentos, se sustituyó el citocromo C por citocromo C acetilado (véase **Figura 3.70**). El citocromo C acetilado no es un sustrato de la enzima citocromo P450 reductasa, mientras que sí se reduce por el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Con menadiona, la reducción de citocromo C acetilado disminuyó en presencia de SOD (pasó de 11  $\mu\text{mol}$  citocromo C acetilado reducido/min mg en ausencia de SOD a 5  $\mu\text{mol}$  citocromo C acetilado reducido/min mg prot. en presencia de SOD). Con paraquat, la reducción del citocromo C acetilado disminuyó en presencia de SOD (pasó de 9  $\mu\text{mol}$  citocromo C acetilado reducido/min mg en ausencia de SOD a 2.5  $\mu\text{mol}$  citocromo C acetilado reducido/min mg prot. en presencia de SOD). Para el resto de compuestos, las diferencias fueron muy pequeñas y no significativas ( $p < 0.05$ ). La diferencia entre la utilización o no de SOD en la reducción de citocromo C acetilado se muestra en la misma figura (**Figura 3.70**). Los resultados indican que la menadiona y el paraquat incrementaron la reducción del citocromo C acetilado debido a la generación del  $O_2^{\bullet-}$  y esta reducción se inhibió en presencia de la enzima SOD que elimina este radical. Sin embargo, el MPP<sup>+</sup>, las  $\beta c_s^+$ , o la *p*-benzoquinona no promovieron la reducción del citocromo C acetilado vía generación de  $O_2^{\bullet-}$ .

Por tanto, el comportamiento de los cationes  $\beta c_s^+$  y del catión MPP<sup>+</sup> es distinto al del paraquat (catión bipyridinio) o la menadiona. En efecto, la menadiona y el paraquat generan anión superóxido por reducción con citocromo P450 reductasa. En cambio, las  $\beta c_s^+$  y el MPP<sup>+</sup> no generan radical superóxido por acción de la enzima citocromo P450 reductasa. El comportamiento de la *p*-benzoquinona fue una

excepción. Esta quinona es más fácilmente reducible que la menadiona (potencial 0.090 V), y aunque consume NADPH y se reduce por acción de las reductasas (véase **Figura 3.68**), no genera anión superóxido debido a que continúa reduciéndose preferentemente a hidroquinona y no traspasa su electrón al O<sub>2</sub> molecular<sup>271 272</sup>.

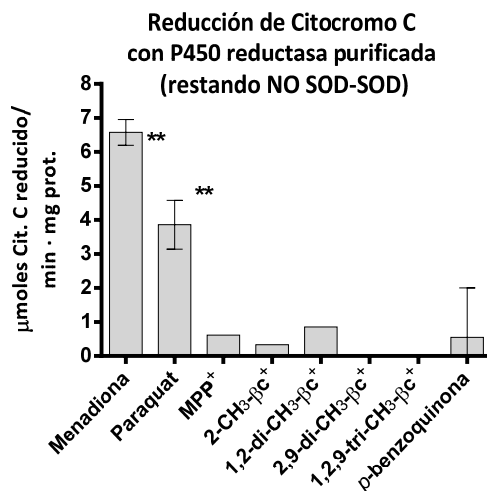
La capacidad de una molécula para generar ROS mediante un ciclo redox depende de su capacidad de reducción monoeléctrica y de la transferencia de un electrón al oxígeno molecular (véase **Figura 3.71**). La generación del anión superóxido y ROS mediante un ciclo redox depende del potencial de reducción del compuesto<sup>273 274 275</sup>. Los resultados anteriores indican que tanto el paraquat como la menadiona producen especies ROS en un ciclo redox catalizado por reductasas. Los cationes bipyridinio (paraquat) y las quinonas se reducen por un electrón con potenciales de reducción generalmente entre -0.2 y -0.5 V (la menadiona tiene un potencial de -0.16 V y la transición PQ<sup>2+</sup>/PQ<sup>•+</sup> del paraquat -0.44 V). Estos potenciales se consideran adecuados para su reducción por reductores biológicos como las reductasas NADPH-citocromo P450 reductasa, NADH-citocromo b5 oxidoreductasa y NADH-coenzima Q oxidoreductasa<sup>260 273 276</sup>. Por el contrario, los compuestos con potenciales de reducción por debajo de -0.55 V (por ejemplo el MPP<sup>+</sup> tiene un potencial cercano a -1 V) en general, no se reducirán fácilmente por vía enzimática, y por lo tanto no serán buenos agentes de ciclo redox.

Así pues, los resultados obtenidos no indican la generación de radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) por acción de la enzima citocromo P450 reductasa u otras reductasas durante el metabolismo de los cationes βc<sup>+</sup><sub>s</sub> (análogos funcionales del MPP<sup>+</sup>) o del catión MPP<sup>+</sup>. Por tanto, el mecanismo asociado a la toxicidad de estas sustancias no será por generación de ROS vía ciclo redox sino debido a otras propiedades, como por ejemplo, su acción como inhibidores mitocondriales. En el pasado, algunos estudios han sugerido que el MPP<sup>+</sup> podría participar en la generación del anión superóxido por reducción enzimática<sup>261 262 277</sup>. Sin embargo, esta posibilidad no se ha confirmado en este estudio ni en otros<sup>274</sup>. Generalmente, los estudios que atribuyen al MPP<sup>+</sup> acciones tóxicas por ciclo redox provienen de evidencias indirectas, como el hecho de que los antioxidantes disminuyen los efectos del MPP<sup>+</sup><sup>263 264 278 279</sup>. En un estudio se observó la formación de radicales desde MPP<sup>+</sup> mediante REE y técnicas de atrapamiento en presencia de citocromo P450 reductasa<sup>190</sup>. Sin embargo, los autores reconocían que se formaban mucho menos radicales que con paraquat y éstos podrían atribuirse a un exceso de enzima o a la propia reducción directa del oxígeno.



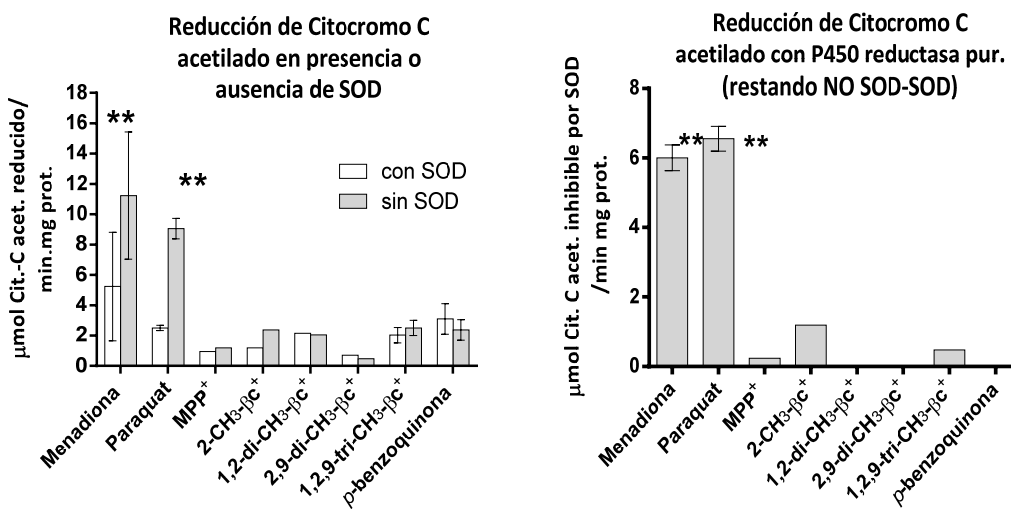
**Figura 3.68** Consumo de NADPH (μmol de NADPH oxidado/min mg prot.) por reductasas en presencia de cationes βC<sup>+</sup>, MPP<sup>+</sup>, paraquat y quinonas (concentración de los compuestos: 100 μM con excepción de menadiona que fue 50 μM). **ARRIBA IZQUIERDA** Enzima p-nitrobenzoato reductasa. **ARRIBA DERECHA** Enzima citocromo P450 reductasa de microsomas. **ABAJO** Enzima citocromo P450 reductasa purificada. En todos los ensayos se han realizado los correspondientes controles restando la contribución de la oxidación química del NADPH. Temperatura 25-30 °C.

En conclusión, el MPP<sup>+</sup> y los cationes βC<sup>+</sup> no generan radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) o especies reactivas de oxígeno vía reducción enzimática por citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH. Estos cationes se metabolizan por los citocromos P450, según se ha demostrado en el Apartado 3.1.4, pero no son buenos sustratos de la enzima citocromo P450 reductasa asociada a éstos. Por el contrario, el paraquat y la menadiona sí generan anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) por acción de la enzima citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH.



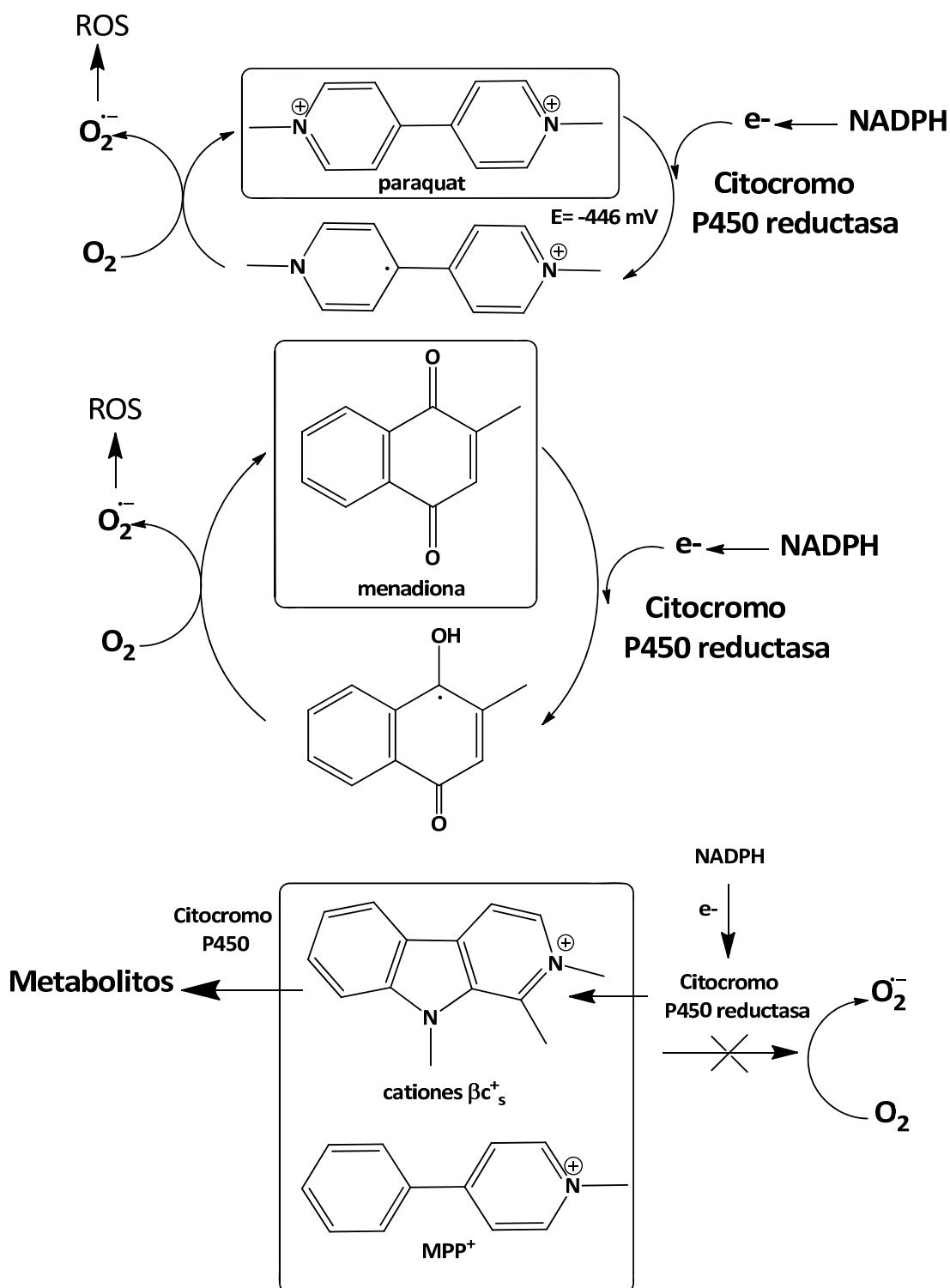
**Figura 3.69** Reducción del citocromo C (0.95 mg prot./mL) por citocromo P450 reductasa (1 µg prot./mL) y diferentes sustratos (500 µM) en ausencia y presencia de superóxido dismutasa (SOD) (40 µg prot./mL.) y NADPH (500 µM) (30 °C). En el eje de ordenadas se muestra los µmoles de citocromo C reducido que se inhiben por SOD (es decir reducción del citocromo C en ausencia de SOD restando de la reducción del citocromo C en presencia de SOD). La diferencia entre SOD y no SOD se atribuye a la generación de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) en el ensayo (es decir reducción ocasionada por el anión superóxido generado en el ensayo).

\*\* Diferencias significativas (p < 0.01) entre SOD y no SOD.



**Figura 3.70 IZQUIERDA.** Reducción del citocromo C acetilado (0.95 mg/mL) con citocromo P450 reductasa purificada (1 µg/mL) y NADPH (500 µM) en presencia de los compuestos objeto de estudio (500 µM) y con o sin superóxido dismutasa (SOD) (40 µg prot./mL). **DERECHA.** Reducción del citocromo C acetilado (0.95 mg/mL) con citocromo P450 reductasa (1 µg prot./mL) y NADPH (500 µM) en presencia de los compuestos objeto de estudio (500 µM) que es inhibible en presencia de SOD (40 µg prot./mL); es decir reducción del citocromo C acetilado atribuible a la reducción producida por el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) generado. Ensayos realizados a 30°C.

\*\* Diferencias significativas entre SOD y no SOD (p < 0.01).



**Figura 3.71** Reducción enzimática de paraquat y menadiona por la enzima citocromo P450 reductasa en presencia de NADPH asociada a un ciclo redox de generación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los cationes MPP<sup>+</sup> y  $\beta c_s^+$  no se reducen por la enzima citocromo P450 reductasa y no generan anión superóxido por este medio. Los cationes  $\beta c_s^+$  sí se metabolizan por citocromos P450 que llevan asociada la enzima citocromo P450 reductasa y NADPH como dador de electrones (véase apartado 3.1.4 de esta memoria).

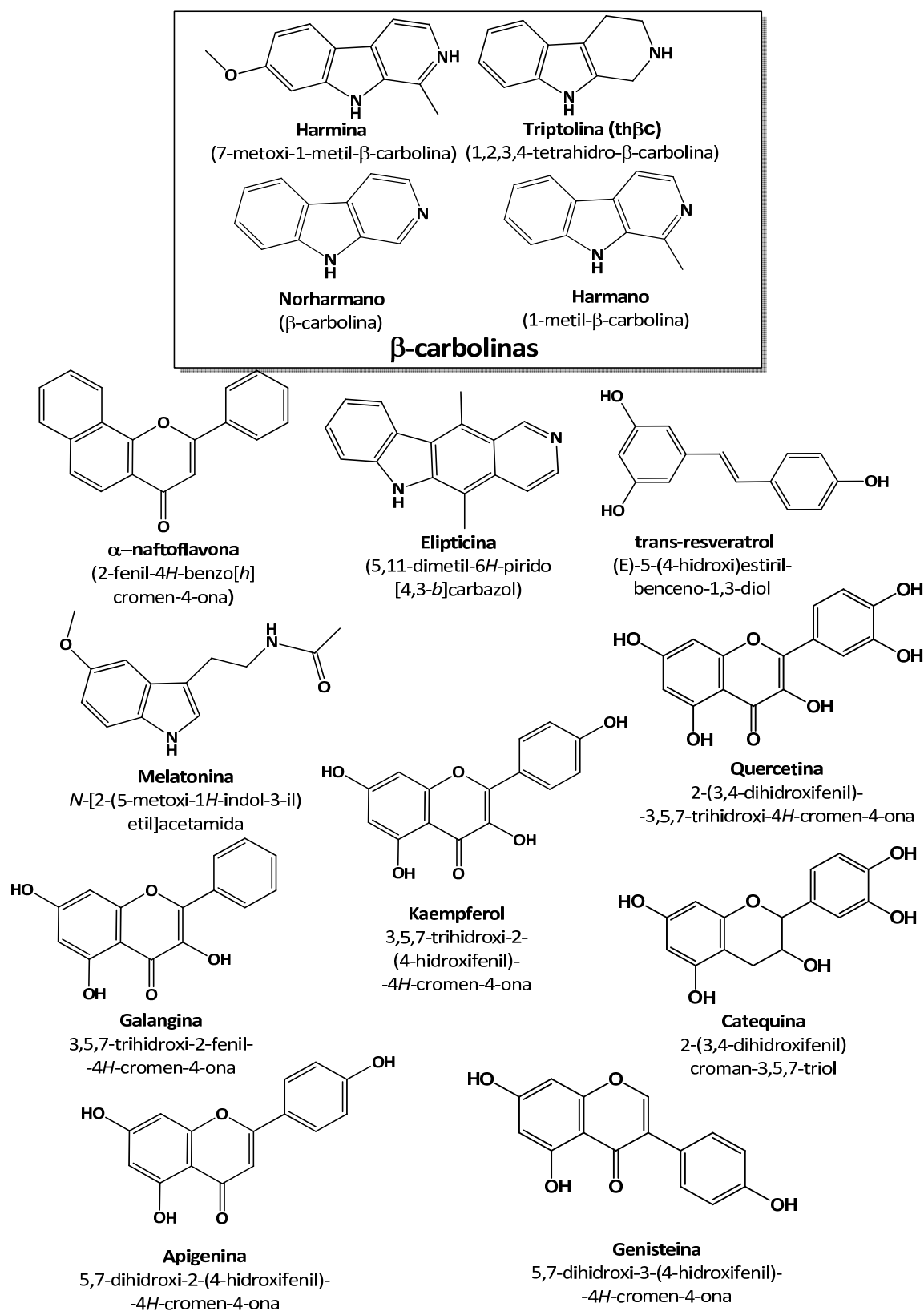
### 3.2. Inhibición del citocromo P450 por $\beta$ -carbolinas.

#### 3.2.1. Inhibición de citocromos P450 de la subfamilia 1A (1A1 y 1A2) por $\beta$ -carbolinas y antioxidantes.

Los citocromos P450 1A1 y 1A2 comparten identidad de secuencia en un 72%. El 1A2 se expresa en el hígado y el 1A1 en tejidos extrahepáticos. El citocromo P450 1A1 interviene en la activación de carcinógenos tales como el benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos<sup>141 163</sup>. El citocromo P450 1A2, por su parte, es responsable del metabolismo de un 10% de los fármacos actuales y participa en la bioactivación de arilaminas carcinogénicas tales como las aminas heterocíclicas aromáticas presentes en las carnes y pescados muy hechos<sup>141</sup>. Por esta razón se cree que la inhibición de estos citocromos podría ser un mecanismo quimioprotector contra la activación metabólica de tóxicos y carcinógenos<sup>163</sup>.

Ya sabemos que las  $\beta$ -carbolinas interaccionan con los citocromos P450 de la subfamilia 1A. En el apartado anterior se ha demostrado que las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas (norharmano y harmano) y las metoxi- $\beta$ c<sub>s</sub> (harmina y harmalina) se metabolizan por citocromos P450 dando lugar a metabolitos de hidroxilación, y de *O*-desmetilación. Hipotéticamente, como resultado de esta interacción, las  $\beta$ c<sub>s</sub> podrían llegar a disminuir la acción metabólica de los citocromos P450 1A sobre sustancias tóxicas que son sustrato de estas enzimas. De hecho, algunas  $\beta$ -carbolinas se han descrito como posibles inhibidores de la acción de sustancias mutagénicas y carcinogénicas<sup>97 280</sup>.

El propósito de este apartado consistió en evaluar la actividad de las  $\beta$ -carbolinas como inhibidores de los citocromos P450 de la subfamilia 1A, y compararla con la actividad de sustancias antioxidantes que se han propuesto previamente como quimioprotectores<sup>281 282</sup>. Entre estos últimos se incluyen polifenoles y flavonoides, el indol melatonina, y el agente antitumoral elipticina<sup>89 283 284</sup> (**Figura 3.72**). Con este fin, se han utilizado varios modelos experimentales que incluyen los citocromos P450 1A1 y P450 1A2, y tres sustratos distintos: fenacetina, fármaco metabolizado por este tipo de enzimas<sup>285</sup>, y dos agentes mutagénicos y carcinógenos que se activan por los citocromos P450 1A: benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) y 2-amino- $\alpha$ -carbolina (A $\alpha$ C). A continuación se presentan los resultados obtenidos.



**Figura 3.72** β-Carbolinas y sustancias antioxidantes evaluadas como inhibidores de los citocromo P450 de la subfamilia 1A (1A1 y 1A2) (quimioprotectores).

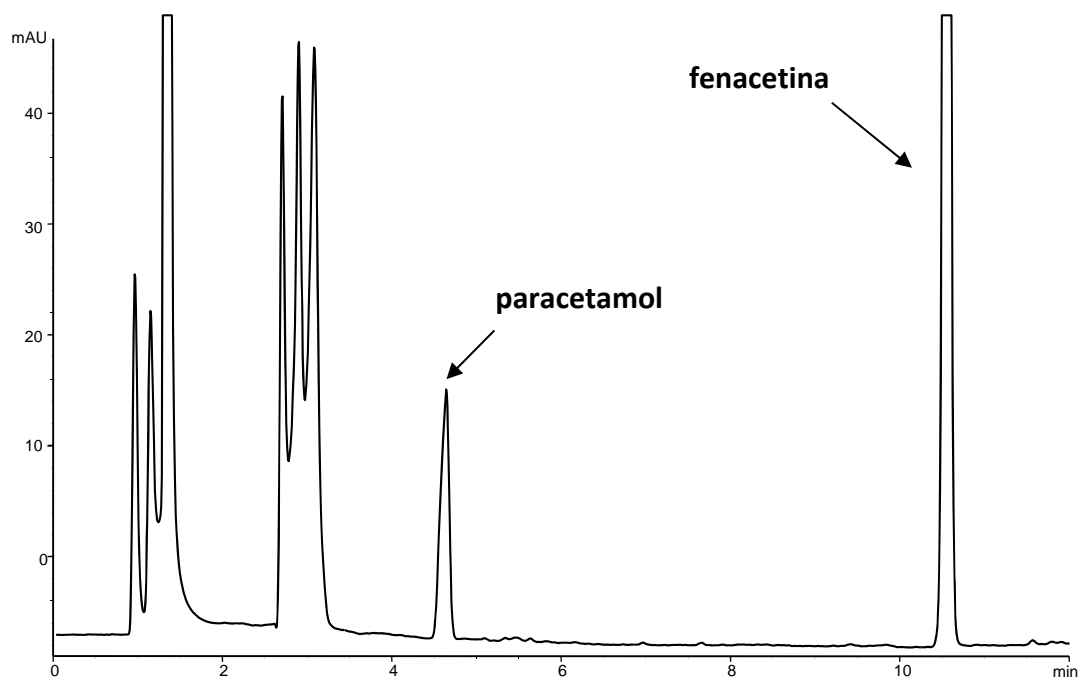
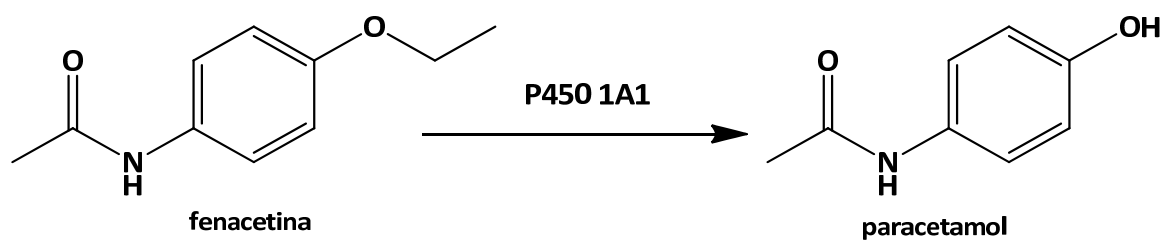
### 3.2.1.1. Biotransformación de fenacetina por el citocromo P450 1A1. Inhibición por $\beta$ -carbolinas y antioxidantes.

La fenacetina se metabolizó por el citocromo P450 1A1 mediante la reacción de *O*-desetilación descrita en la **Figura 3.73**. Tras la correspondiente incubación de fenacetina con la enzima citocromo P450 1A1 se identificó *p*-acetamidofenol (paracetamol o acetaminofeno) como su principal metabolito mediante espectrometría UV-VIS, espectrometría de masas ( $m/z$  152 (M+H)<sup>+</sup> en ESI (+) y 150 (M-H)<sup>-</sup> en ESI (-)) y coelución con el estándar correspondiente. En la **Figura 3.74** se muestra la curva de metabolización de fenacetina-*O*-desetilasa del citocromo P450 1A1.

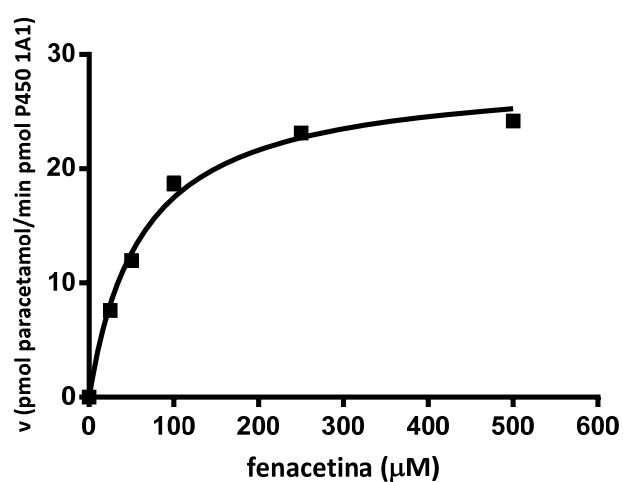
Las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas (harmano, norharmano, y harmina) fueron inhibidores moderados del citocromo P450 1A1 (véase **Figura 3.75**). El norharmano inhibió la biotransformación de fenacetina a paracetamol con una IC<sub>50</sub> de 6.6  $\mu$ M ( $K_i$  de 1.3  $\mu$ M). Esta inhibición se acompañó de la formación de los principales metabolitos del norharmano por el citocromo P450 1A1 (es decir 6-OH-norharmano y 3-OH-norharmano) (resultados no mostrados). Por tanto, el norharmano se une al centro activo de la enzima, siendo la naturaleza de su inhibición sobre fenacetina de carácter competitivo. Resultados similares se obtuvieron para el harmano con una IC<sub>50</sub> de 5.4  $\mu$ M ( $K_i$  = 1.24  $\mu$ M) y para la harmina, que resulto ser el mejor inhibidor, con una IC<sub>50</sub> de 0.54  $\mu$ M ( $K_i$  de 0.12  $\mu$ M).

En el mismo sistema, th $\beta$ c (triptolina), melatonina y los compuestos fenólicos catequina, genisteina y kaempferol fueron inhibidores muy débiles del citocromo P450 1A1 (IC<sub>50</sub> > 25  $\mu$ M de compuesto) (**Figura 3.76**). En cambio, los polifenoles: quercetina, resveratrol, apigenina y galangina se comportaron como buenos inhibidores del citocromo P450 1A1 (**Figura 3.76**), y proporcionaron IC<sub>50</sub> de 4.2, 0.86, 3.3 y 7.9  $\mu$ M, respectivamente. La elipticina fue un potente inhibidor con una IC<sub>50</sub> de 0.38  $\mu$ M, mientras que la  $\alpha$ -naftoflavona, que es un inhibidor de referencia del citocromo P450 1A1, dio IC<sub>50</sub> de 0.55  $\mu$ M.

Los resultados obtenidos se engloban en la **Tabla 3.18**, y de ellos se concluye que la potencia de la inhibición de la biotransformación de fenacetina por el citocromo P450 1A1 siguió el siguiente orden decreciente: elipticina >  $\alpha$ -naftoflavona = harmina > resveratrol > apigenina > quercetina > harmano > norharmano > galangina. La catequina, genisteina, kaempferol, melatonina y triptolina (th $\beta$ c) no mostraron inhibición significativa.



**Figura 3.73.** ARRIBA Reacción metabólica de biotransformación de fenacetina para dar paracetamol por el citocromo P450 1A1. ABAJO Cromatograma de RP-HPLC (243 nm) (columna Novapak-C18) correspondiente a la metabolización de fenacetina por el citocromo P450 1A1.



**Figura 3.74** Curva de metabolización de fenacetina para dar paracetamol por citocromo P450 1A1 (12.5 pmoles cit. P450/mL). Parámetros cinéticos:  $V_{\text{max}}$ :  $28.48 \pm 1.1$  pmoles/min pmol cit. P450 y  $K_m$ :  $62.6 \pm 6.6$   $\mu\text{M}$ .

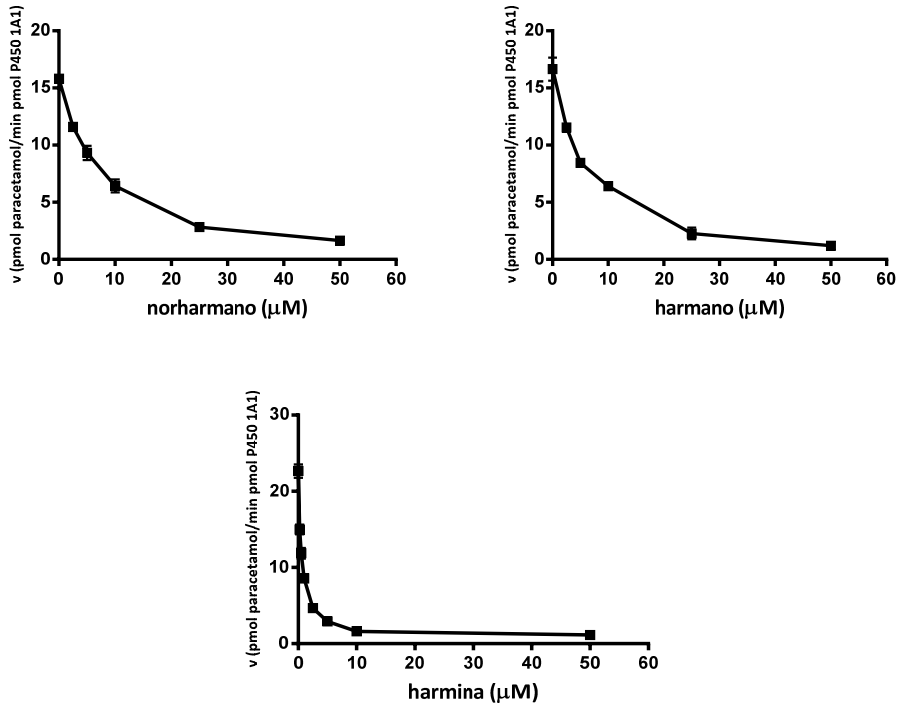


Figura 3.75 Inhibición de la biotransformación de fenacetina (250 μM) por citocromo P450 1A1 (25 pmoles cit. P450/mL) en presencia de β<sub>3</sub> aromáticas.

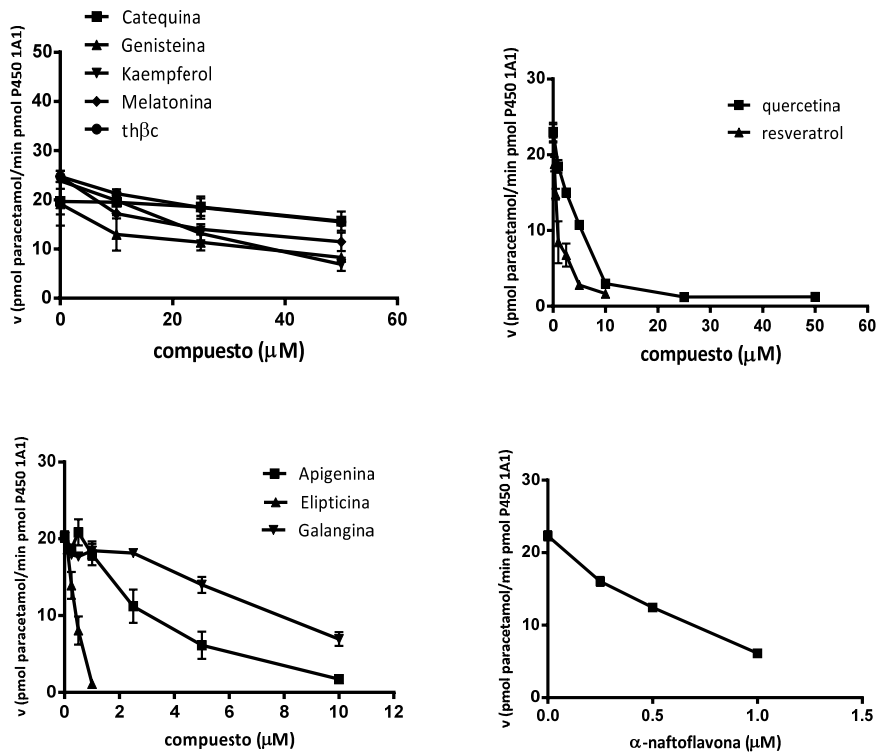


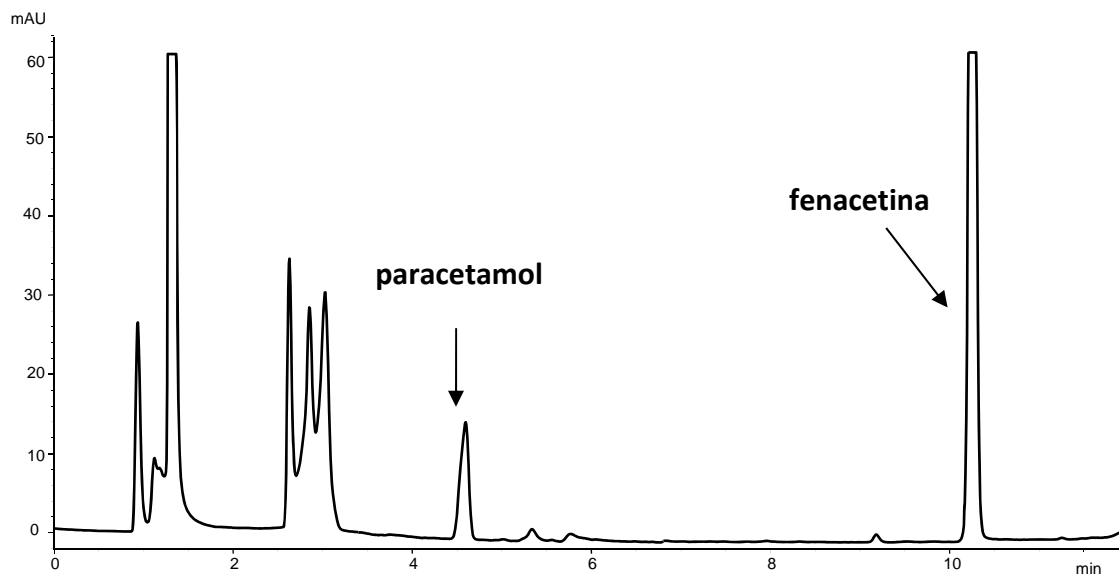
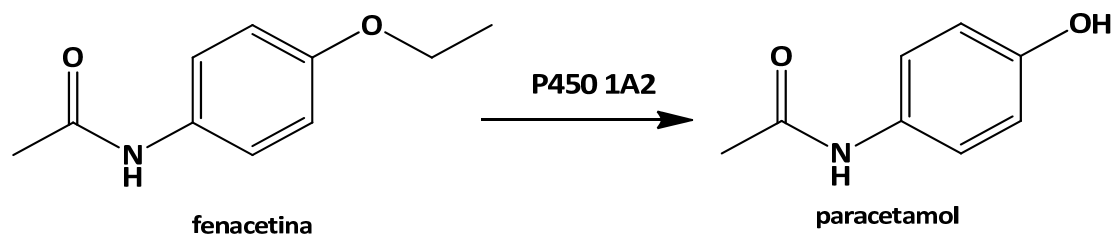
Figura 3.76 Inhibición de la formación de paracetamol a partir de fenacetina (250 μM) por el citocromo P450 1A1 (25 pmoles cit. P450/mL) en presencia de varios antioxidantes.

	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>1</sup>	K <sub>i</sub> (μM) <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>1</sup>	K <sub>i</sub> (μM) <sup>3</sup>
	P450 1A1	P450 1A1	P450 1A2	P450 1A2
Norharmano	6.63 ± 0.66	1.3	13.8 ± 2.7	5.6
Harmano	5.43 ± 0.64	1.1	15.8 ± 4.5	6.4
Harmina	0.54 ± 0.02	0.11	3.2 ± 0.7	1.3
Catequina	> 25	-	> 25	-
Genisteina	> 25	-	> 25	-
Kaempferol	> 25	-	> 25	-
Melatonina	> 25	-	> 25	-
Triptolina (thβc)	> 25	-	> 25	-
Quercetina	4.24 ± 0.97	0.85	> 25	-
Resveratrol	0.86 ± 0.19	0.17	8.8 ± 4.4	3.5
Apigenina	3.32 ± 1.7	0.66	6.42 ± 0.96	2.6
Galangina	7.9 ± 4.6	1.6	1.37 ± 0.4	0.55
Elipticina	0.38 ± 0.27	0.076	0.99 ± 0.17	0.4
α-Naftoflavona	0.55 ± 0.23	0.11	0.2 ± 0.03	0.08

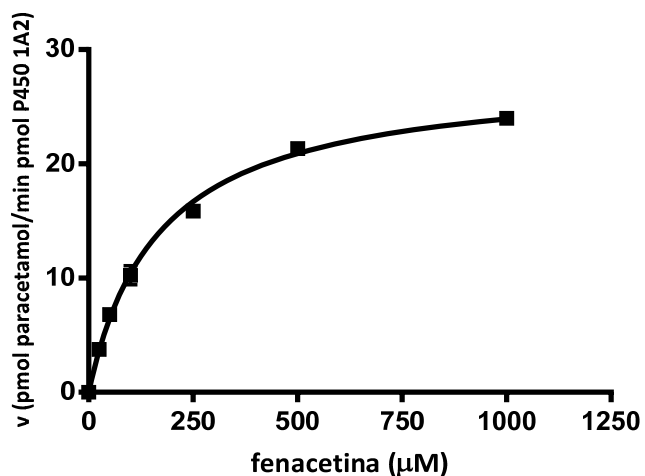
**Tabla 3.18** Valores de IC<sub>50</sub> determinados para las β-carbolinas y los compuestos antioxidantes fenólicos e indólicos como inhibidores de los citocromos P450 de la subfamilia 1A. <sup>1</sup>Valores determinados utilizando fenacetina (250 μM) como sustrato. <sup>2</sup>Valores calculados suponiendo inhibición competitiva y K<sub>m</sub> 62.6 μM (ecuación de Cheng-Prusoff: IC<sub>50</sub> = K<sub>i</sub> (1+S/K<sub>m</sub>)). <sup>3</sup>Valores suponiendo inhibición competitiva y K<sub>m</sub> 169 μM (ecuación de Cheng-Prusoff).

### 3.2.1.2. Biotransformación de fenacetina por el citocromo P450 1A2. Inhibición por β-carbolinas y sustancias antioxidantes.

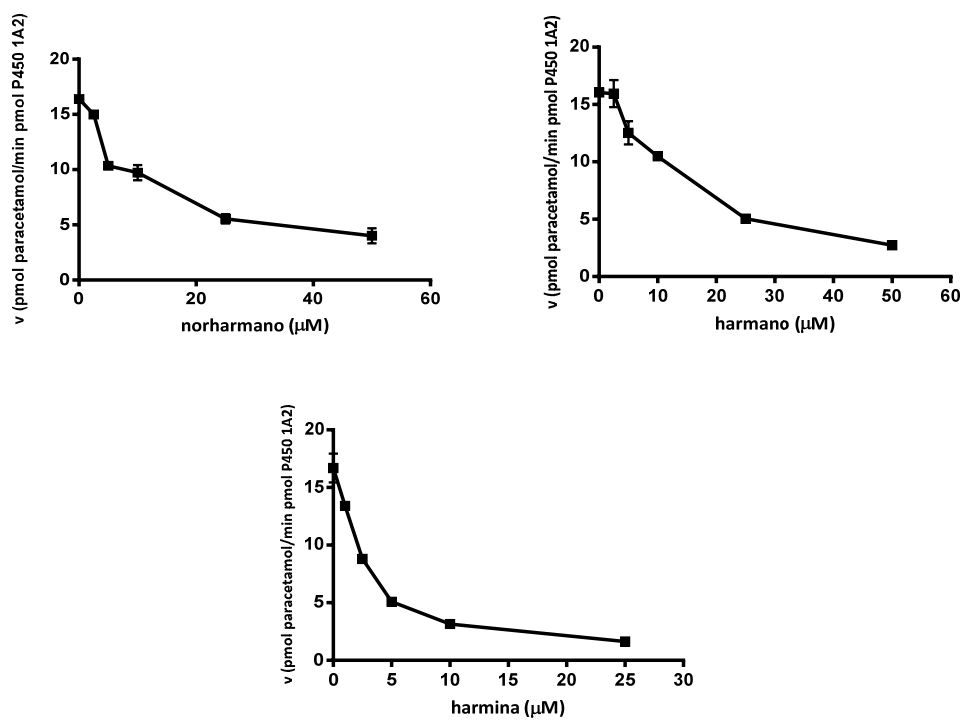
Se estudió la reacción de biotransformación de fenacetina por el citocromo P450 1A2. Tras la correspondiente incubación de fenacetina con esta enzima en presencia de NADPH se identificó como principal metabolito el paracetamol, al igual que ocurría con el P450 1A1 (**Figura 3.77**). La curva de Michaelis-Menten correspondiente a la actividad fenacetina-*O*-desetilasa del citocromo P450 1A2 se recoge en la **Figura 3.78**. Los compuestos norharmano, harmano y harmina fueron inhibidores de la actividad fenacetina-*O*-desetilasa catalizada por citocromo P450 1A2, aunque en menor medida que en el caso del P450 1A1, y proporcionaron valores de IC<sub>50</sub> de 13.8 μM, 15.8 μM, y 3.2 μM, respectivamente (**Tabla 3.18** y **Figura 3.79**). Al igual que ocurrió con el citocromo P450 1A1, la inhibición de la biotransformación de fenacetina se acompañó de la metabolización de las β<sub>c</sub>s a sus correspondientes metabolitos por acción del citocromo P450 1A2 (véase apartado 3.1 de esta memoria), sugiriendo que las β<sub>c</sub>s y la fenacetina se unen al centro activo como sustratos y compiten en su metabolización. Catequina, genisteina, kaempferol, quercetina, melatonina y triptolina (thβc) mostraron escasa o nula actividad como inhibidores del citocromo P450 1A2 (véase **Figura 3.80**). En cambio, apigenina, resveratrol, galangina y elipticina fueron buenos o potentes inhibidores. Los valores de IC<sub>50</sub> fueron: 0.99 μM (elipticina), 1.37 μM (galangina), 6.42 μM (apigenina) y 8.8 μM (resveratrol). La α-naftoflavona se comportó como un potente inhibidor de esta biotransformación con una IC<sub>50</sub> de 0.2 μM. Tras estos resultados se puede concluir que la potencia de inhibición de las sustancias estudiadas sobre la metabolización de fenacetina por citocromo P450 1A2, siguió el siguiente orden decreciente: α-naftoflavona > elipticina > galangina > harmina > apigenina > resveratrol > harmano > norharmano. El resto de compuestos no fueron inhibidores.



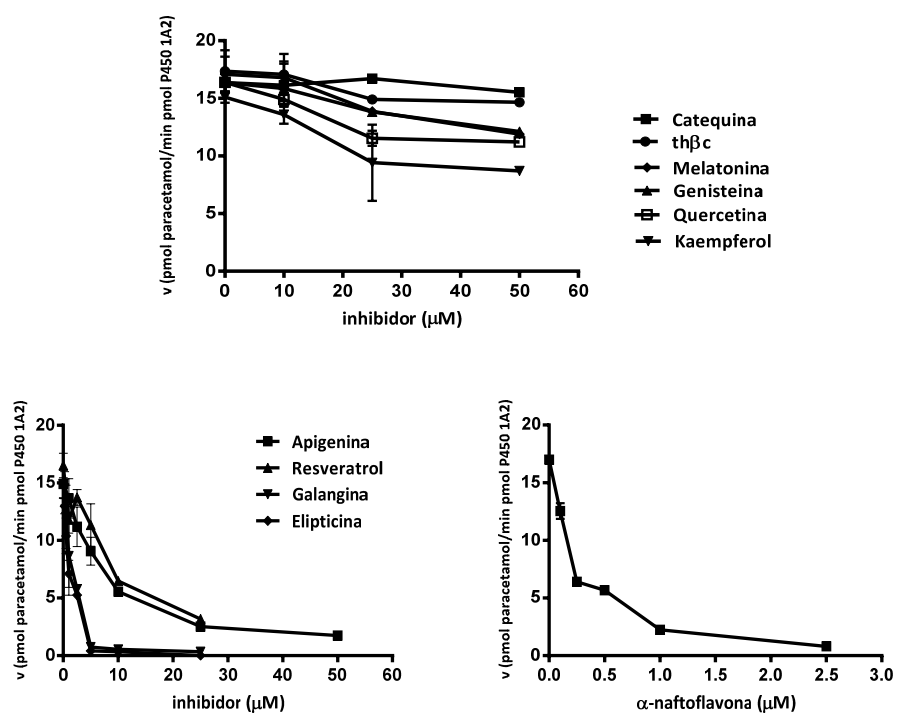
**Figura 3.77 ARRIBA** Reacción metabólica de fenacetina para dar paracetamol por citocromo P450 1A2. **ABAJO** Cromatograma de RP-HPLC (DAD 243 nm) (columna Novapak-C18) correspondiente al metabolismo de fenacetina por P450 1A2 (12.5 pmoles cit. P450/mL).



**Figura 3.78** Curva de metabolización de fenacetina para dar paracetamol por citocromo P450 1A2 (25 pmoles cit. P450/mL). Parámetros cinéticos:  $V_{max}$ :  $27.97 \pm 1.67$  pmoles/min pmol cit. P450 y  $K_m$ :  $169 \pm 11.60$  μM



**Figura 3.79** Inhibición de la biotransformación de fenacetina (250  $\mu\text{M}$ ) por el citocromo P450 1A2 en presencia de norharmano, harmano y harmina.



**Figura 3.80** Inhibición de la biotransformación de fenacetina (250  $\mu\text{M}$ ) por citocromo P450 1A2 en presencia de antioxidantes.

### 3.2.1.3. Biotransformación de benzo[*a*]pireno por citocromos P450 1A (1A1 y 1A2). Inhibición por $\beta$ -carbolinas y antioxidantes.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPAs) son potentes mutágenos y carcinógenos que se generan en los procesos de combustión (por ej. el tabaco, ahumado de alimentos y durante el cocinado de carnes o pescados a la plancha o en barbacoas). La exposición humana a estos tóxicos se produce por ingestión, inhalación y absorción cutánea. El benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) es uno de los principales contaminantes de este tipo. Su acción toxicológica ocurre tras un proceso de activación molecular, catalizada inicialmente por citocromos P450 (subfamilias 1A y 1B), que en su etapa inicial producen compuestos hidroxilados del B[*a*]P, y que finalmente conduce a los llamados dihidrodiolepóxidos (por ej. 7,8-dihidrodiol-9,10-epóxi-B[*a*]P), que interaccionan con el ADN generando aductos y produciendo genotoxicidad. El papel último de los citocromos P450 en la bioactivación (toxificación) o en la eliminación-detoxificación del B[*a*]P y de otros carcinógenos es controvertido<sup>141</sup>; sin embargo, se cree que la inhibición de los citocromos P450 1A y/o 1B podría servir como mecanismo de quimioprotección contra la activación metabólica de estos mutágenos y carcinógenos<sup>286 287 288 289 290</sup>.

En esta memoria se estudió la biotransformación del B[*a*]P por citocromos P450 de la subfamilia 1A (1A1 y 1A2), así como su inhibición por  $\beta$ -carbolinas y compuestos antioxidantes (**Figura 3.72**). La incubación del B[*a*]P con el citocromo P450 1A1 produjo varios metabolitos, que se identificaron en base a sus espectros de masas (electrospray negativo y positivo), UV-VIS (DAD), retención en HPLC y por comparación con los datos publicados en la literatura<sup>291 292</sup> como los hidroxid derivados, dionas y dihidrodioles del B[*a*]P (**Figura 3.81**). Los principales metabolitos fueron: 3-OH-B[*a*]P ( $m/z=267$  (M-H)<sup>-</sup> (ESI negativo)), 9-OH-B[*a*]P ( $m/z=267$  (M-H)<sup>-</sup> (ESI negativo), dos B[*a*]P dionas ( $m/z=283$  (M+H)<sup>+</sup> (ESI positivo) y  $m/z=281$  (M-H)<sup>-</sup> (ESI negativo) y dihidrodioles (B[*a*]P-dihidrodioles ( $m/z=269$  (M+H-18)<sup>+</sup> (ESI positivo)) (véase **Figura 3.82**). En las mismas condiciones experimentales, el citocromo P450 1A2 dio lugar a una biotransformación mucho menor del B[*a*]P (hasta 6-8 veces menor que el P450 1A1). Por tanto, el metabolismo de B[*a*]P se atribuye principalmente a la actividad del citocromo P450 1A1.

En la **Figura 3.83** se recogen las curvas de metabolización del B[*a*]P por el citocromo P450 1A1 para dar 3-OH-B[*a*]P y 9-OH-B[*a*]P. Aunque no se muestran resultados, el resto de metabolitos (dionas y dihidrodioles) siguió la misma tendencia cualitativa de metabolización. Los valores de  $V_{\max}$  y  $K_m$  para la formación de 3-OH-B[*a*]P fueron 5.2 pmol de producto/min pmol P450 y 8.6  $\mu$ M, respectivamente. Por tanto, el B[*a*]P posee alta afinidad por el citocromo P450 1A1 como lo demuestra su baja  $K_m$ .

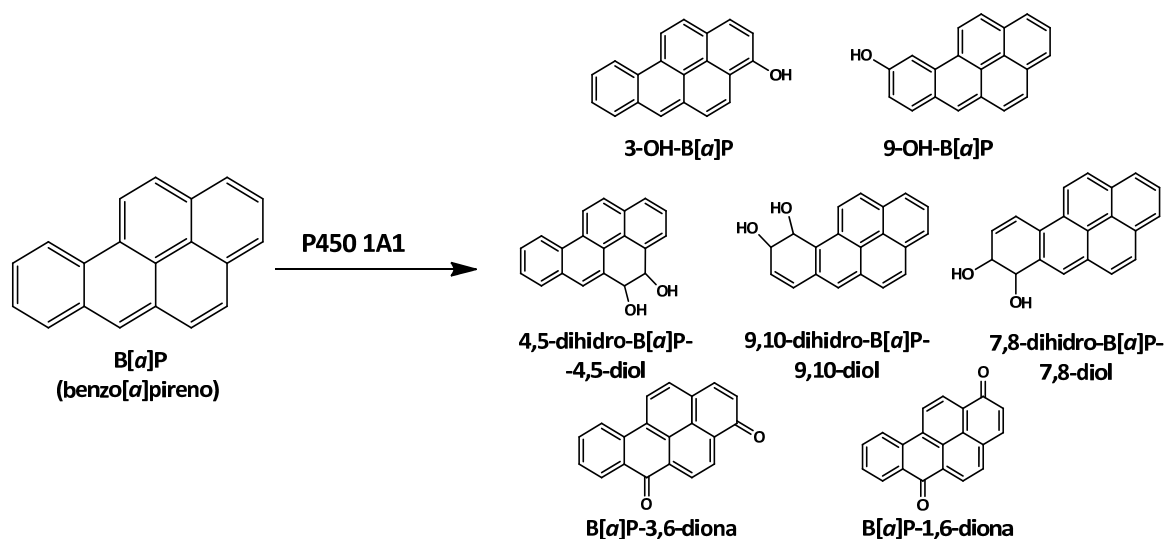


Figura 3.81 Biotransformación del benzo[a]pireno por el citocromo P450 1A1.

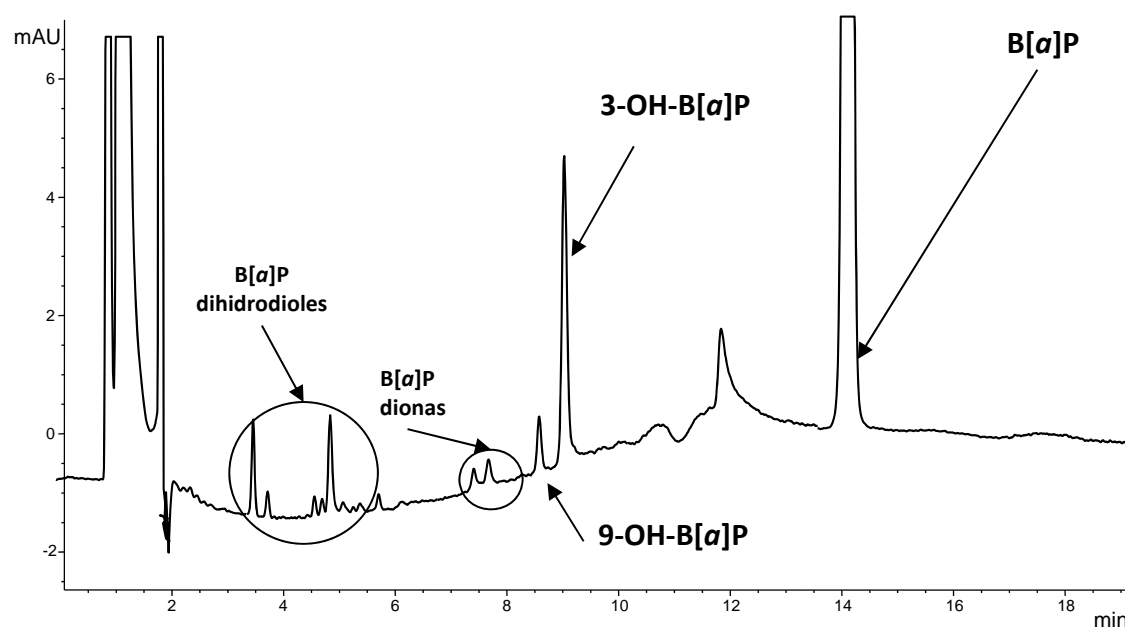


Figura 3.82 Análisis cromatográfico por RP-HPLC (absorbancia a 265 nm) (columna Novapak-C18) del B[a]P (50  $\mu$ M) incubado con citocromo P450 1A1 (25 pmoles cit. P450/mL).

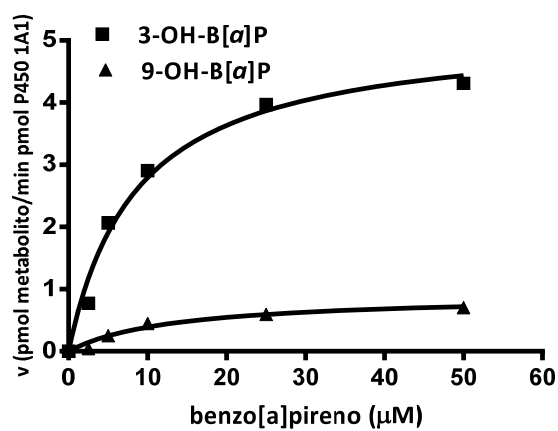


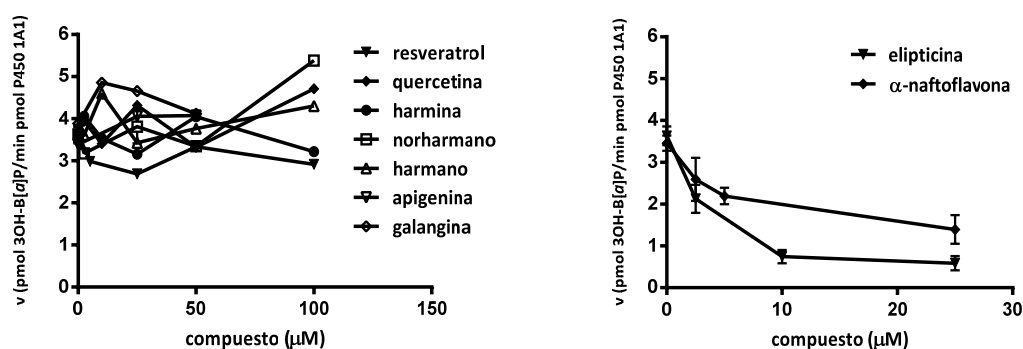
Figura 3.83 Curva de metabolización del B[a]P por el citocromo P450 1A1 (25 pmoles cit. P450/mL).

El estudio de la metabolización del B[a]P por el citocromo P450 1A1, en presencia de  $\beta$ -carbolicinas y de antioxidantes, puso de manifiesto que la mayoría de los compuestos investigados no inhibieron la metabolización del B[a]P por el citocromo P450 1A1 (véase **Tabla 3.19**). Los compuestos: kaempferol, triptolina (th $\beta$ c), melatonina, catequina y genisteina, que no proporcionaban inhibición en el ensayo con fenacetina, tampoco inhibieron la biotransformación del B[a]P. Sin embargo, las  $\beta$ -carbolicinas harmina, harmano y norharmano, y los compuestos fenólicos resveratrol, quercetina, apigenina y galangina, que sí proporcionaron inhibición con fenacetina, no mostraron inhibición significativa con B[a]P (véase **Figura 3.84**). En cambio, sí mostraron inhibición la elipticina (IC<sub>50</sub> de 3.5  $\mu$ M) y la  $\alpha$ -naftoflavona (IC<sub>50</sub> de 10.6  $\mu$ M) (**Figura 3.84** y **Tabla 3.19**). Asumiendo que el mecanismo de inhibición es competitivo, se calculó mediante la ecuación de Cheng-Prusoff una constante de inhibición K<sub>i</sub> de 0.5  $\mu$ M (elipticina) y de 1.5  $\mu$ M ( $\alpha$ -naftoflavona) (**Tabla 3.19**).

En resumen, los resultados obtenidos en este apartado indican que el B[a]P tiene alta afinidad de sustrato por el citocromo P450 1A1, siendo tal vez por ello, difícil inhibir su biotransformación catalizada por este citocromo. Compuestos que fueron inhibidores con fenacetina como sustrato no proporcionaron inhibición con B[a]P. Tan sólo elipticina y  $\alpha$ -naftoflavona fueron inhibidores significativos. En otros estudios, se ha observado que los hidrocarburos aromáticos, como el propio B[a]P, son buenos inhibidores de los citocromos P450 1A<sup>239 288</sup>. Esos resultados que están de acuerdo con los obtenidos aquí, sugieren que la alta afinidad del B[a]P por el citocromo P450 1A1 limita las posibilidades reales de reducir su biotransformación catalizada por esta enzima y por tanto las posibilidades de utilizar con éxito esta estrategia como mecanismo de quimioprotección. Las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas que se metabolizan en parte por el citocromo P450 1A1<sup>175</sup> (véase apartado anterior) y que inhiben este citocromo (véase los resultados usando fenacetina como sustrato) no funcionaron como inhibidores *in vitro* de la metabolización del B[a]P. Al contrario, sí se detectó inhibición de la biotransformación de las propias  $\beta$ c<sub>s</sub> por el citocromo P450 1A1 en presencia de B[a]P. Estos resultados sugieren que la reducción de la mutagenicidad del B[a]P en presencia de  $\beta$ -carbolicinas<sup>241</sup> no se debe a la inhibición de su biotransformación por P450 1A1. Los resultados obtenidos también cuestionan la utilidad de los compuestos fenólicos evaluados en este estudio como inhibidores de la biotransformación del B[a]P. La protección que ofrecen estas sustancias podría deberse a otros mecanismos de actuación, como por ejemplo su actividad antioxidante<sup>281</sup>.

	B[a]P		AαC	
	IC <sub>50</sub> (μM)	K <sub>i</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	K <sub>i</sub> (μM)
	P450 1A1 <sup>1</sup>	P450 1A1 <sup>2</sup>	P450 1A2 <sup>3</sup>	P450 1A2 <sup>4</sup>
Norharmano	> 50	-	> 50	-
Harmano	> 50	-	> 50	-
Harmina	> 50	-	8.1 ± 3.7	3.9
Catequina	> 50	-	> 50	-
Genisteina	> 50	-	> 50	-
Kaempferol	> 50	-	> 50	-
Melatonina	> 50	-	> 50	-
thβc	> 50	-	> 50	-
Quercetina	> 50	-	> 50	-
Resveratrol	> 50	-	> 25	-
Apigenina	> 50	-	24.8 ± 13.5	11.8
Galangina	> 50	-	0.34 ± 0.12	0.16
Elipticina	3.5 ± 0.7	0.5	0.55 ± 0.09	0.26
α-Naftoflavona	10.6 ± 1.45	1.5	0.13 ± 0.02	0.06

**Tabla 3.19** Valores de inhibición (IC<sub>50</sub>) y de constantes de inhibición K<sub>i</sub> determinados para las β-carbolinas y antioxidantes en los distintos modelos experimentales de biotransformación por citocromos P450 1A utilizados.<sup>1</sup>Valores determinados para 3-OH-B[a]P utilizando B[a]P como sustrato (50 μM). <sup>2</sup>Valor de K<sub>i</sub> asumiendo inhibición competitiva y K<sub>m</sub> 8.6 μM. <sup>3</sup>Valores determinados utilizando AαC como sustrato (50 μM). <sup>4</sup> Valor determinado asumiendo inhibición competitiva y K<sub>m</sub> 45.5 μM.

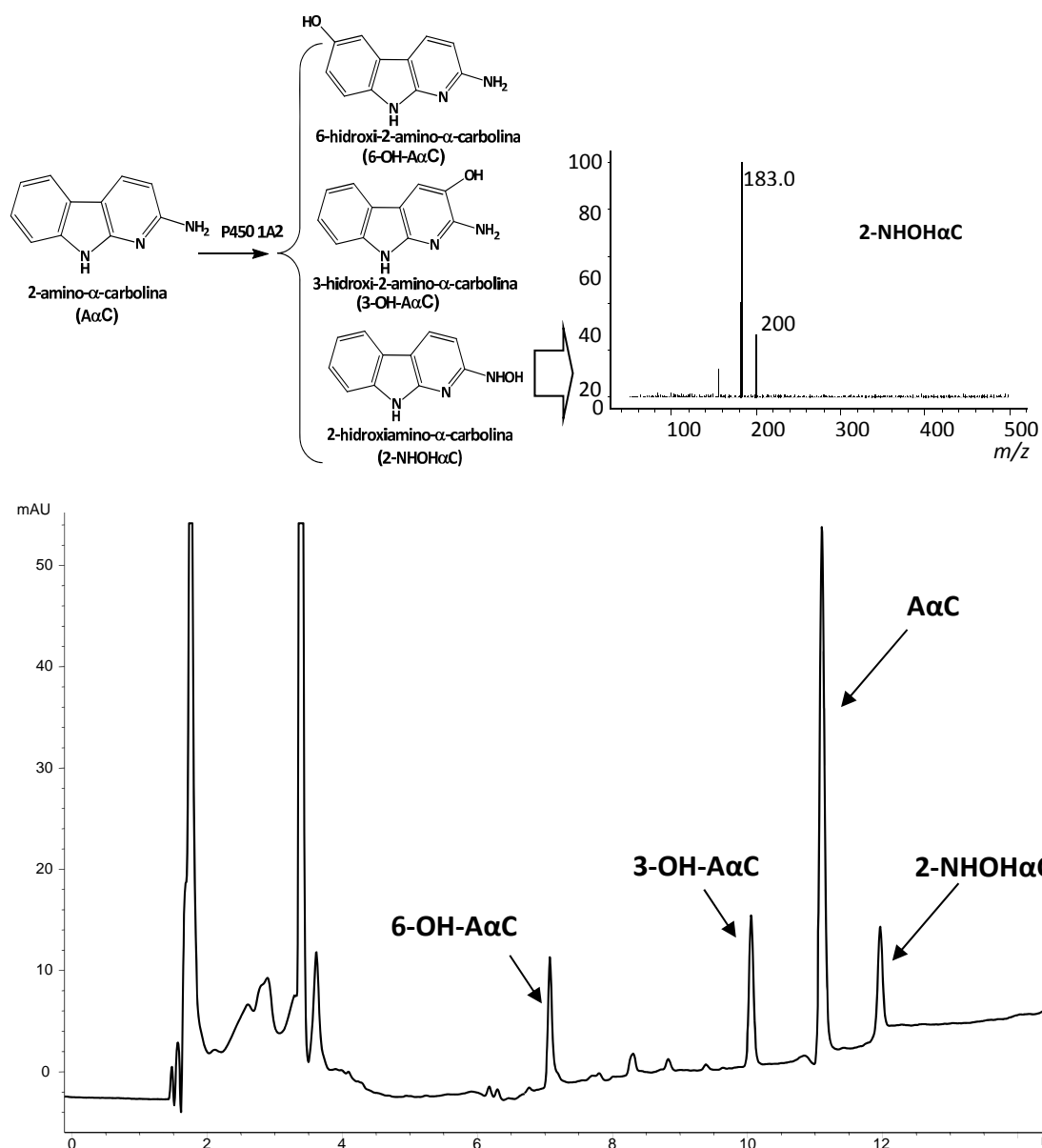


**Figura 3.84** IZQUIERDA Inhibición de la biotransformación del B[a]P (50 μM) por el citocromo P450 1A1 en presencia de βc<sub>s</sub> aromáticas y polifenoles. DERECHA Inhibición de la biotransformación del B[a]P (50 μM) por citocromo P450 1A1 en presencia de elipticina y α-naftoflavona. Los resultados se dan para la formación de 3-OH-B[a]P, aunque resultados cualitativamente similares se obtuvieron para otros metabolitos como 9-OH-B[a]P, dionas o dihidrodioles del B[a]P.

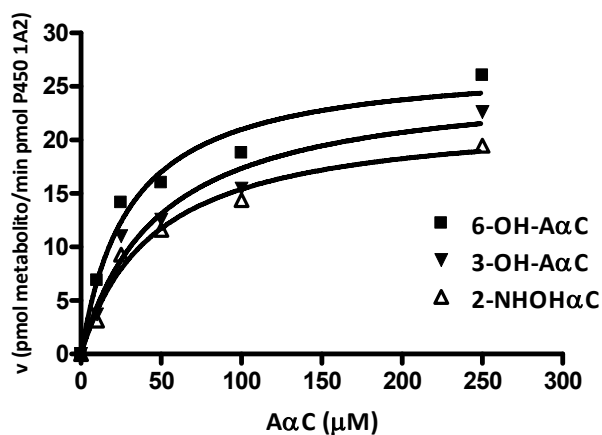
### 3.2.1.4. Biotransformación de 2-amino- $\alpha$ -carbolina por citocromos P450 1A (1A1 y 1A2). Inhibición por $\beta$ -carbolinas y antioxidantes.

Las aminas heterocíclicas aromáticas (AHAs) son potentes mutágenos y carcinógenos que se producen por pirólisis de aminoácidos y proteínas durante el cocinado de carnes y pescados<sup>293</sup>. La presencia de estos compuestos en alimentos se ha relacionado con la aparición de distintos tipos de cáncer, particularmente cáncer de colon<sup>144 157 294</sup>. Una de las principales AHAs es la 2-amino- $\alpha$ -carbolina (A $\alpha$ C), que se produce por pirólisis del triptófano, llegando a alcanzar concentraciones de 650 ng/g en alimentos<sup>295</sup>. Su acción toxicológica ocurre tras un proceso de activación molecular por enzimas citocromo P450 (principalmente de la subfamilia 1A) a nuevos metabolitos activos que interaccionan con el ADN, alterando las bases nitrogenadas y produciendo genotoxicidad. Estos metabolitos son hidroxilaminas que tras su esterificación por enzimas del metabolismo de Fase 2 a nuevos electrófilos, forman aductos con guanina<sup>295</sup>. Hipotéticamente, la inhibición de la activación de las AHAs por citocromos constituye un posible mecanismo de quimioprotección<sup>97 282 287 290</sup>.

En este apartado se estudió la biotransformación de A $\alpha$ C por los citocromos P450 1A y su inhibición por  $\beta$ -carbolinas y antioxidantes. Tras la correspondiente incubación de A $\alpha$ C con el citocromo P450 1A2 se detectaron tres metabolitos principales (véase **Figura 3.85**), que se identificaron en base a sus espectros de UV-VIS (DAD), espectro de masas (ESI positivo), retención en HPLC y por comparación con datos existentes en la literatura como compuestos de hidroxilación<sup>162 296</sup>. Estos se atribuyeron a: 6-OH-A $\alpha$ C ( $m/z$ : 200 (M+H)<sup>+</sup> (100 %), 183 (M+H-17)<sup>+</sup> (55 %) a 170 V) y 3-OH-A $\alpha$ C ( $m/z$ : 200 (M+H)<sup>+</sup> (100 %), 155 (95 %), 183 (15 %) a 170 V de fragmentación). Un tercer metabolito se asignó al hidroxilamino derivado (2-NHOH $\alpha$ C). Este compuesto presenta un ion molecular protonado (M+H)<sup>+</sup> a  $m/z$ =200 y con un fragmento característico a  $m/z$ : 183 (-17 u) que aumenta sustancialmente al aumentar el voltaje de fragmentación (ejemplo  $m/z$ : 183 (100 %), 200 (25%), y 155 (10 %) a 120 V de voltaje de fragmentación). Un cromatograma de la biotransformación de A $\alpha$ C por el citocromo P450 1A2 se muestra en la **Figura 3.85**. De los tres metabolitos detectados, los compuestos de hidroxilación 6-OH-A $\alpha$ C y 3-OH-A $\alpha$ C se consideran compuestos de detoxificación de A $\alpha$ C. Sin embargo, el compuesto 2-NHOH $\alpha$ C es un metabolito activo al que se le atribuye la actividad mutagénica ya que tras su esterificación por acetiltransferasas o sulfotransferasas da lugar a especies electrófilas nitronio que reaccionan fácilmente con el ADN<sup>160 162 296 297</sup>. La **Figura 3.86** muestra la curva de metabolización de A $\alpha$ C por el citocromo P450 1A2. La formación del compuesto de activación metabólica 2-NHOH $\alpha$ C se produjo con valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  de 33.3 pmol/min pmol P450 y 45.5  $\mu$ M, respectivamente. Los otros dos metabolitos de hidroxilación aromática (6-OH y 3-OH derivados) proporcionaron valores similares. Estos resultados no difieren cualitativamente de los obtenidos por otros autores<sup>160 162 296</sup>. Por otro lado, la metabolización de A $\alpha$ C por el citocromo P450 1A1 fue notablemente inferior a la del citocromo P450 1A2 (hasta 5.6 veces inferior para dar el 2-NHOH $\alpha$ C y algo menos para los otros metabolitos). Consecuentemente, el resto de estudios se realizó utilizando el citocromo P450 1A2, como principal enzima responsable de la activación de esta amina heterocíclica aromática.

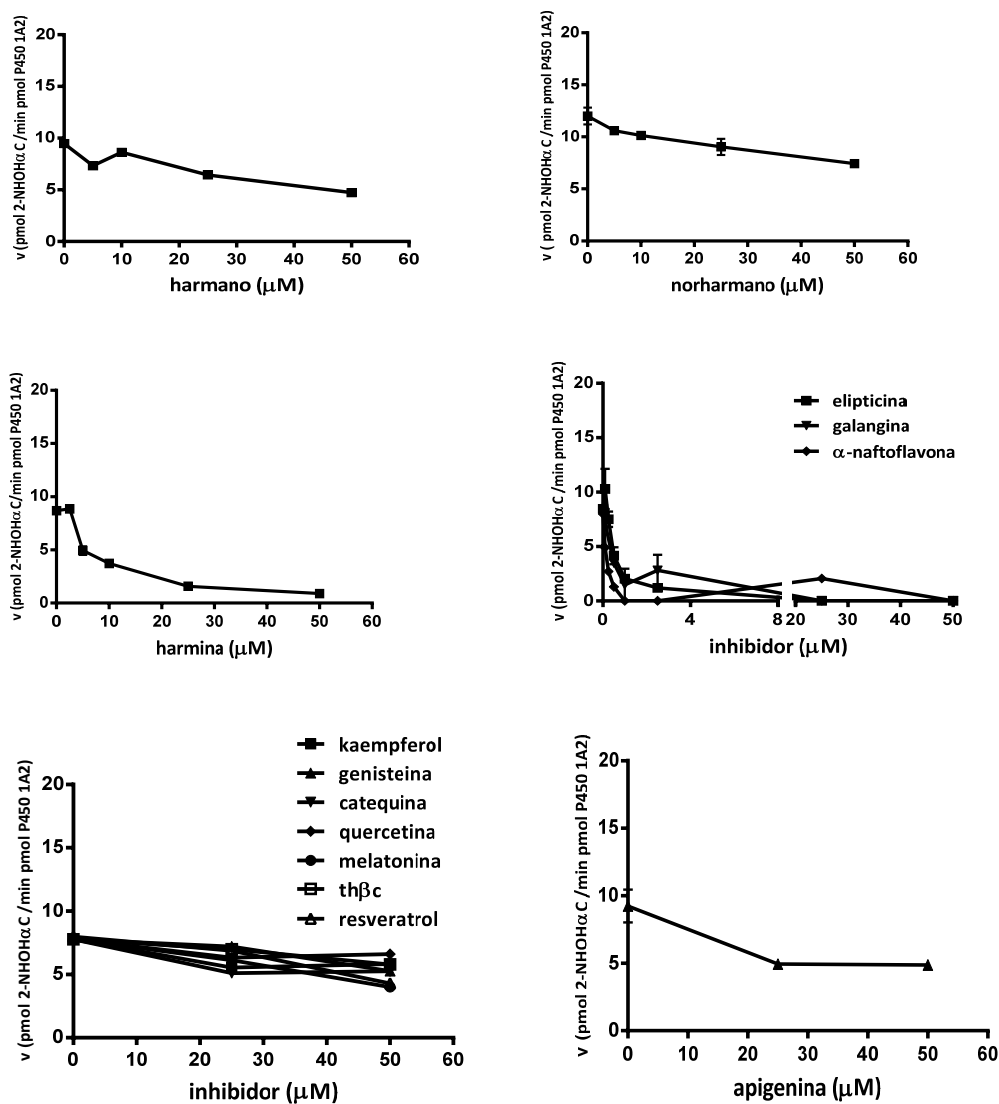


**Figura 3.85** ARRIBA Esquema de la biotransformación de A $\alpha$ C por el citocromo P450 1A2 y espectro de masas de 2-hidroxiamino- $\alpha$ -carbolina ABAJO Cromatograma de RP-HPLC (230 nm) (columna Zorbax Eclipse XDB-C18) de los metabolitos de la biotransformación de A $\alpha$ C con P450 1A2. Véase condiciones en Materiales y Métodos de esta memoria.



**Figura 3.86** Curva de metabolización de A $\alpha$ C por el citocromo P450 1A2 (25 pmoles cit. P450/mL).

El estudio de la metabolización de A $\alpha$ C por el citocromo P450 1A2 en presencia de  $\beta$ -carbolidinas como inhibidores puso de manifiesto que de las  $\beta$ -carbolidinas estudiadas, solo la harmina mostr3 una inhibici3n moderada de la biotransformaci3n de A $\alpha$ C para dar el derivado hidroxiamino (IC<sub>50</sub> de 8.1  $\mu$ M) (v3ase **Tabla 3.19** y **Figura 3.87**). Las  $\beta$ -carbolidinas arom3ticas, harmano y norharmano, dieron valores inferiores al 50% de inhibici3n a 50  $\mu$ M. Los compuestos kaempferol, genisteina, catequina, quercetina, melatonina, triptolina (th $\beta$ c) y resveratrol no proporcionaron inhibici3n de la biotransformaci3n de A $\alpha$ C en un intervalo de concentraciones de 0 a 50  $\mu$ M (v3ase la **Figura 3.87**). La apigenina, por su parte, proporcion3 una inhibici3n d3bil (IC<sub>50</sub> de 24.8  $\mu$ M). En cambio, galangina, elipticina y  $\alpha$ -naftoflavona inhibieron la biotransformaci3n de A $\alpha$ C (v3ase **Figura 3.87**). Los valores de IC<sub>50</sub> calculados sobre 2-NHOH $\alpha$ C fueron 0.55, 0.34 y 0.13  $\mu$ M para la elipticina, galangina y  $\alpha$ -naftoflavona, respectivamente (v3ase **Tabla 3.19**). El comportamiento de inhibici3n frente a los metabolitos 6-OH-A $\alpha$ C y 3-OH-A $\alpha$ C fue cualitativamente similar.



**Figura 3.87** Inhibici3n de la biotransformaci3n de A $\alpha$ C (50  $\mu$ M) a su metabolito 2-NHOH $\alpha$ C por citocromo P450 1A2 en presencia de  $\beta$ -carbolidinas y compuestos antioxidantes. Aunque los datos se representan para el metabolito 2-NHOH $\alpha$ C, los metabolitos de hidroxilaci3n arom3tica en posiciones C-3 y C-6 se comportaron cualitativamente igual.

Los resultados obtenidos indican que la A $\alpha$ C se metaboliza por el citocromo P450 1A2 a varios metabolitos, siendo uno de ellos, la 2-hidroxiamino- $\alpha$ -carbolina (2-NHOH $\alpha$ C), responsable de la actividad mutagénica según la literatura<sup>160 296 297</sup>. Esta biotransformación se inhibió en presencia de elipticina,  $\alpha$ -naftoflavona y galangina, y en menor medida por la  $\beta$ -carbolina harmina. El resto de compuestos, incluidas las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas y la th $\beta$ c, resultaron inactivas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos anteriormente con el sustrato fenacetina. La  $\alpha$ -naftoflavona es un conocido inhibidor del citocromo P450 1A2, pero en este estudio, la elipticina y la galangina mostraron una inhibición similar. Estos resultados concuerdan con el concepto de que los inhibidores del citocromo P450 1A2 tienen una región hidrofóbica grande y una región polar pequeña o con la idea de que los ligandos de este citocromo son compuestos hidrofóbicos con un aceptor de puentes de hidrógeno<sup>298 299 300</sup>. Los resultados con A $\alpha$ C podrían ser extensibles a otras AHAs presentes en alimentos que también se metabolizan por el citocromo P450 1A2 a hidroxiamino derivados<sup>295</sup> aunque esto tendrá que comprobarse posteriormente.

En resumen, los citocromos P450 1A1 y P450 1A2 intervienen en la activación metabólica de hidrocarburos aromáticos y arilaminas carcinogénicas. Ambos son inducibles en hígado y tejidos extrahepáticos por sustancias químicas y contaminantes ambientales. En esta memoria se han puesto a punto métodos para determinar la actividad de estos dos citocromos utilizando como sustratos fenacetina, B[a]P y A $\alpha$ C. Se ha demostrado que la biotransformación y activación del B[a]P se produjo por acción del citocromo P450 1A1 mientras que la biotransformación de la amina heterocíclica aromática A $\alpha$ C se produjo por acción del citocromo P450 1A2.

Algunos antioxidantes podrían ser inhibidores del sistema citocromo P450<sup>141 236</sup> e influir en la detoxificación y/o activación de xenobióticos<sup>286 301</sup> ejerciendo de quimioprotectores. En esta memoria se ha evaluado la inhibición de la biotransformación de fenacetina, B[a]P y A $\alpha$ C por  $\beta$ -carbolinas y antioxidantes (polifenoles, flavonoides, y melatonina). Usando fenacetina como sustrato se observó que la galangina, apigenina,  $\alpha$ -naftoflavona y el resveratrol inhibieron la actividad de los citocromos P450 1A1 y 1A2. La quercetina solo inhibió el citocromo P450 1A1 pero no el P450 1A2. Otros compuestos como genisteina, catequina o melatonina no mostraron inhibición sobre ninguno de los dos citocromos. Estos resultados son cualitativamente similares a los descritos en otros estudios<sup>289</sup> e indican que ciertos antioxidantes pueden inhibir los citocromos P450 de la subfamilia 1A. Sin embargo, esta inhibición no se confirmó cuando se utilizaron otros sustratos tipo, como son el B[a]P o la A $\alpha$ C, que se activan por estos citocromos en procesos toxicológicos. Así, de los compuestos que demostraron ser activos con fenacetina solo la galangina y la  $\alpha$ -naftoflavona fueron inhibidores de la activación-biotransformación de A $\alpha$ C, mientras que solo la  $\alpha$ -naftoflavona fue un inhibidor de la biotransformación del B[a]P.

Por tanto salvo las excepciones señaladas, los resultados de esta memoria no confirman que los antioxidantes y flavonoides estudiados, sean buenos inhibidores de la biotransformación y activación del B[a]P o A $\alpha$ C, y se considera difícil que puedan desempeñar un papel quimioprotector por interacción directa con los citocromos P450 de la subfamilia 1A.

Las  $\beta_c$  aromáticas, particularmente la harmina y en menor medida el norharmano y el harmano, inhiben los citocromos P450 de la subfamilia 1A. Estos resultados son lógicos si tenemos en cuenta que las  $\beta_c$  aromáticas se metabolizan por esta subfamilia de citocromos P450 (véase apartado anterior)<sup>175</sup>, y por tanto podrían competir con otros sustratos (en este caso fenacetina) que también son metabolizados por estas enzimas. Sin embargo cuando se utilizó B[a]P como sustrato del citocromo P450 1A1, las  $\beta_c$  no mostraron inhibición clara, sugiriendo que no son quimioprotectores contra la activación de este hidrocarburo aromático tóxico. Por otro lado, la harmina fue un inhibidor moderado de la activación de AaC por el citocromo P450 1A2, mientras que el norharmano y el harmano no mostraron inhibición. Por ello, se puede deducir que estas  $\beta_c$  tampoco son buenos quimioprotectores contra la activación de AaC por el citocromo P450 1A2. Estos resultados no confirman los estudios anteriores, que sugerían que las  $\beta_c$  aromáticas, como el norharmano, puedan inhibir la activación de tóxicos como B[a]P y las aminas heterocíclicas aromáticas<sup>97</sup>, y están de acuerdo con otros estudios que discrepaban de ello<sup>302</sup>. Por tanto se podría descartar la posibilidad de que las  $\beta_c$  norharmano y harmano, que aparecen en carnes y pescados cocinados<sup>24</sup> junto a las aminas heterocíclicas aromáticas, puedan competir directamente con ellas impidiendo su activación.

Por último cabe señalar que la elipticina, un alcaloide con actividad antitumoral presente en las plantas de la familia *Apocynaceae* y que tiene una estructura indólica planar como las  $\beta_c$  aromáticas<sup>303</sup>, fue un potente inhibidor de los citocromo P450 1A1 y P450 1A2 tanto con fenacetina como con B[a]P y AaC. Al parecer, la elipticina se transforma por los citocromos P450 de la subfamilia 1A en varios metabolitos de detoxificación y bioactivación que son responsables de la actividad antitumoral<sup>303</sup>. Los resultados obtenidos en esta memoria sugieren que la elipticina podría ser un posible inhibidor-quimioprotector de la activación de carcinógenos por citocromos P450 de la subfamilia 1A.

### 3.2.2. Inhibición del citocromo P450 2D6 por $\beta$ -carbolinas.

El citocromo P450 2D6 desempeña un papel destacado en el metabolismo de  $\text{th}\beta\text{c}_s$ , cationes  $\beta$ -carbolinio y tetrahidropiridinas tóxicas, tal y como se ha demostrado en los apartados precedentes de esta memoria, pudiendo de esta manera influir en la actividad biológica o toxicidad de estas sustancias. Hasta ahora, sin embargo, se desconoce si las  $\beta$ -carbolinas son inhibidores del citocromo P450 2D6. En este apartado se estudió esta posibilidad. Con este propósito se han utilizado dos sustratos distintos del citocromo P450 2D6: dextrometorfano, un fármaco que se metaboliza por este citocromo y que se utiliza para determinar su polimorfismo genético<sup>142</sup> y la neurotoxina MPTP, que según hemos demostrado en esta memoria, se metaboliza por esta enzima.

Se realizaron ensayos de biotransformación de dextrometorfano con citocromo P450 2D6 y éstos pusieron de manifiesto que este citocromo metaboliza el dextrometorfano y da lugar por reacción de *O*-desmetilación al dextrorfano (**Figura 3.88**) que se identificó por HPLC-MS ( $m/z$  258,  $(M+H)^+$ ) y por coelución con el patrón correspondiente. Un cromatograma tipo se muestra en la **Figura 3.89**. La curva de metabolización correspondiente a esta desmetilación se muestra en la **Figura 3.90**. En las condiciones experimentales utilizadas, se obtuvo una  $V_{\text{max}}$  de 8.13 pmol dextrorfano/min pmol P450 y  $K_m$  de 5  $\mu\text{M}$ .

A continuación, se estudió la biotransformación metabólica del dextrometorfano a dextrorfano por el citocromo P450 2D6 en presencia de  $\beta$ -carbolinas. El norharmano fue un inhibidor moderado de esta biotransformación metabólica ( $\text{IC}_{50}$  de 9.7  $\mu\text{M}$ ) (véase **Figura 3.91**), mientras que el harmano fue un inhibidor débil ( $\text{IC}_{50}$  de 65.9  $\mu\text{M}$ ). La quinidina, inhibidor selectivo de referencia, inhibió esta reacción con un  $\text{IC}_{50}$  por debajo de 100 nM.

La inhibición del citocromo P450 2D6 por norharmano fue de tipo no competitivo o mixto (**Figura 3.91**). Las curvas de Michaelis-Menten en presencia del inhibidor tienen distinta  $V_{\text{max}}$  y parecida  $K_m$ . La  $K_i$  de esta inhibición calculada experimentalmente fue 11  $\mu\text{M}$ , valor similar a su  $\text{IC}_{50}$ , lo que está de acuerdo con una inhibición de tipo no competitivo<sup>198</sup>. Estos resultados sugieren que el norharmano inhibe la actividad del citocromo P450 2D6 interaccionando en un sitio distinto del centro activo de la enzima<sup>148</sup>. En el apartado anterior se observó que el norharmano puede metabolizarse (hidroxilación aromática) por el citocromo P450 2D6, lo que implica también su unión al centro activo de la enzima. Sin embargo, esta biotransformación fue minoritaria en comparación con otras enzimas como los citocromos P450 de la subfamilia 1A. En cambio, el harmano que se metabolizó mejor por citocromo P450 2D6 no inhibe este citocromo. Al igual que con las enzimas aisladas, los microsomas hepáticos metabolizaron dextrometorfano para dar dextrorfano (véase **Figura 3.92**). El norharmano inhibió esta reacción con una  $\text{IC}_{50}$  de 1.8  $\mu\text{M}$ , mientras que el harmano necesitó alta concentración. El estudio cinético indica que la inhibición por norharmano es de tipo no competitivo (véase **Figura 3.92**) y la constante  $K_i$  calculada experimentalmente fue 2.13  $\mu\text{M}$ .

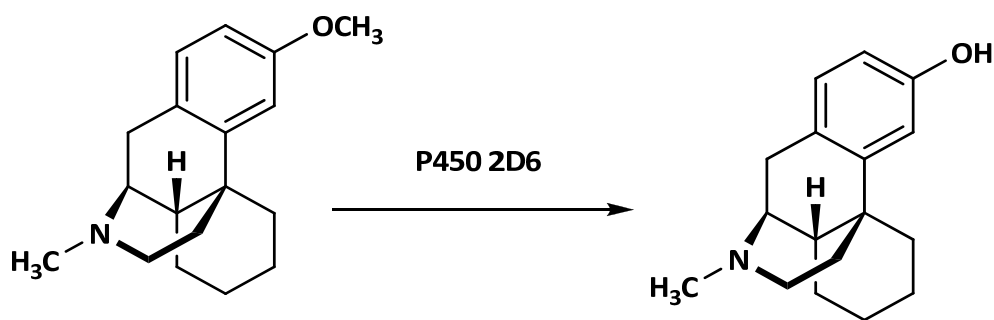


Figura 3.88 Reacción de *O*-desmetilación de dextrometorfan a dextrorfan.

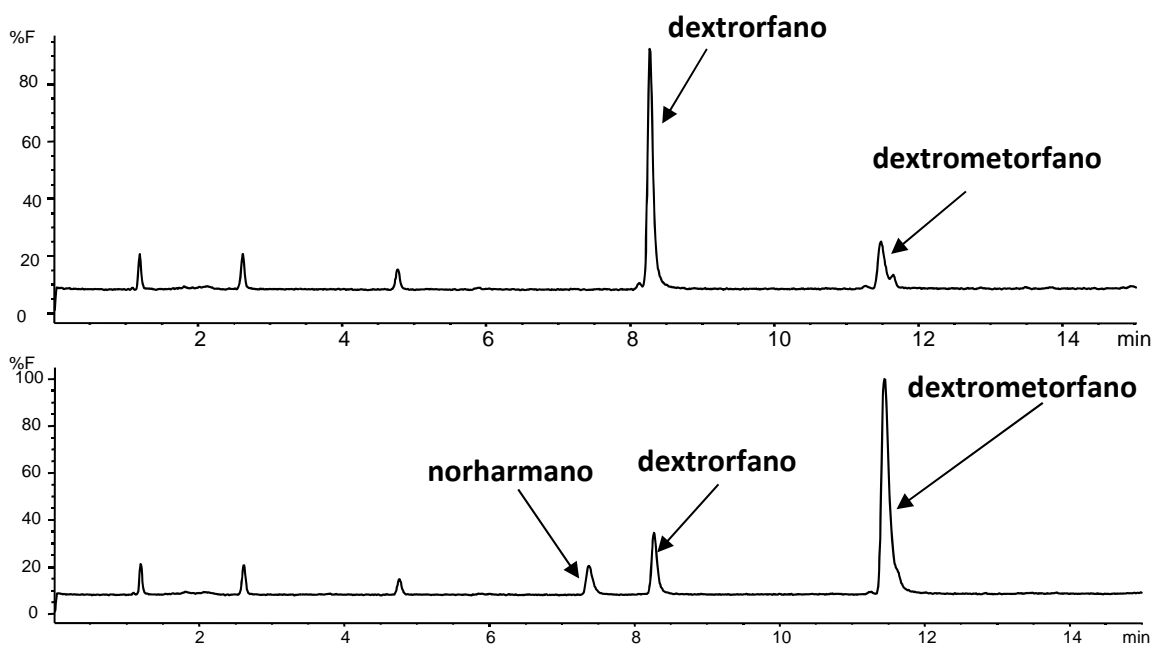


Figura 3.89 Cromatogramas de RP-HPLC (columna Novapak C18) de la metabolización de dextrometorfan a dextrorfan por el citocromo P450 2D6 en ausencia (ARRIBA) y en presencia de norharmano (ABAJO). Detección por fluorescencia (280 nm de excitación y 312 nm de emisión).

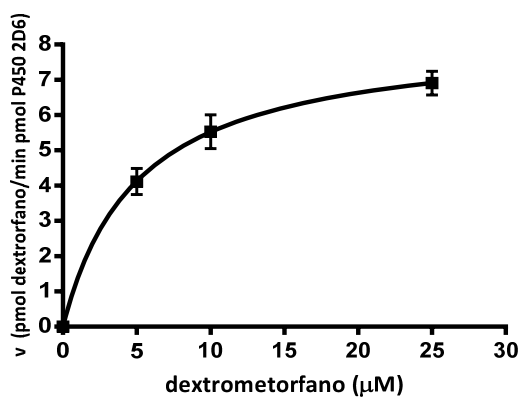
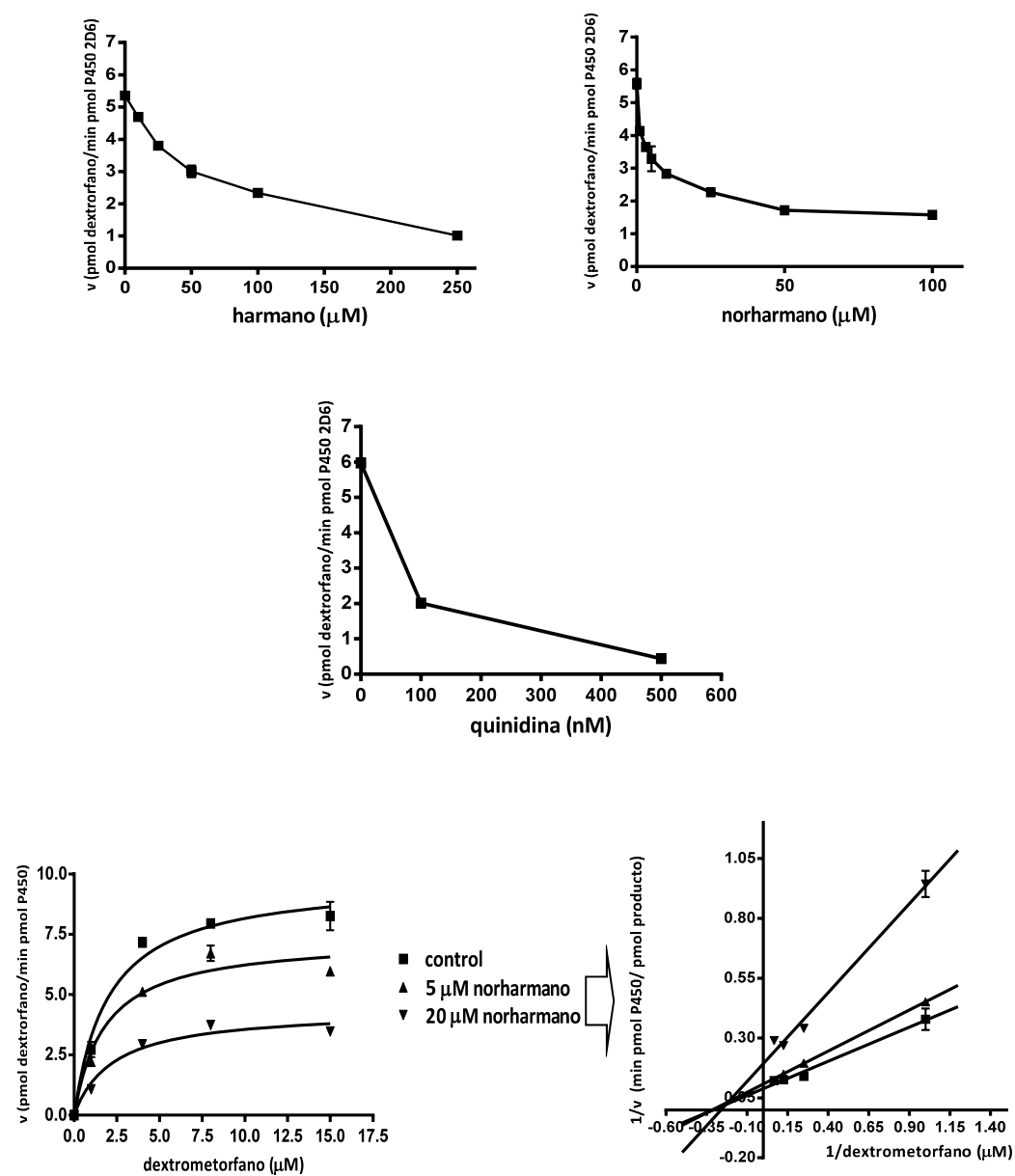
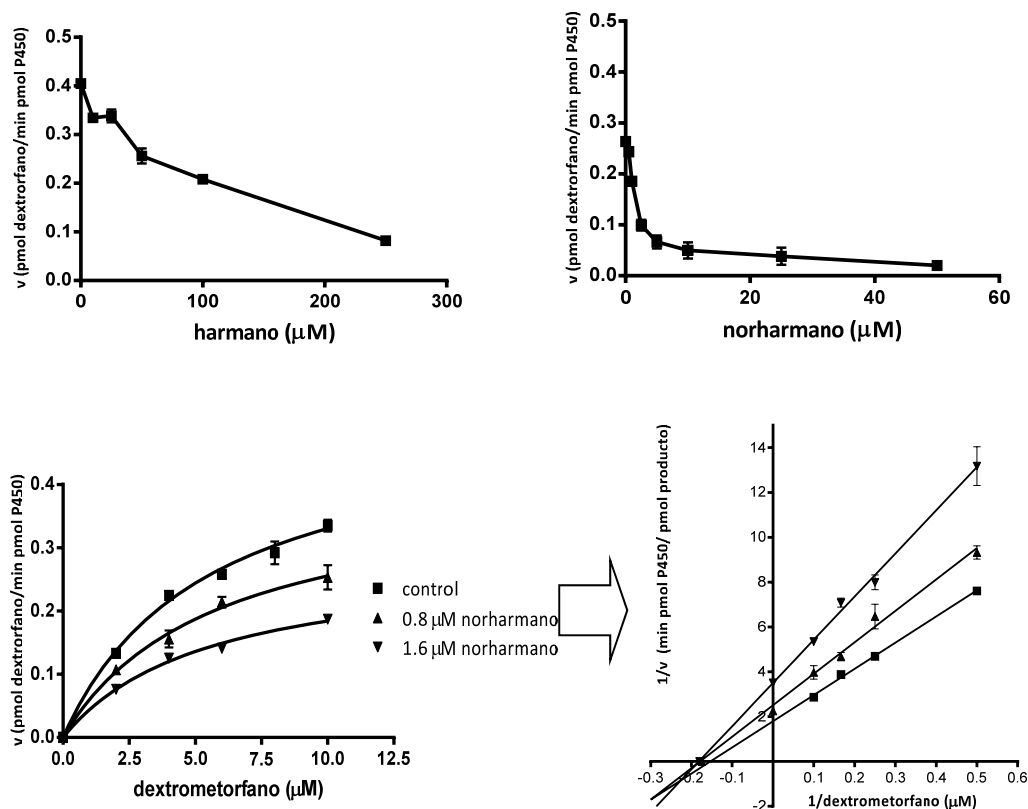


Figura 3.90 Curva de *O*-desmetilación de dextrometorfan por el citocromo P450 2D6.



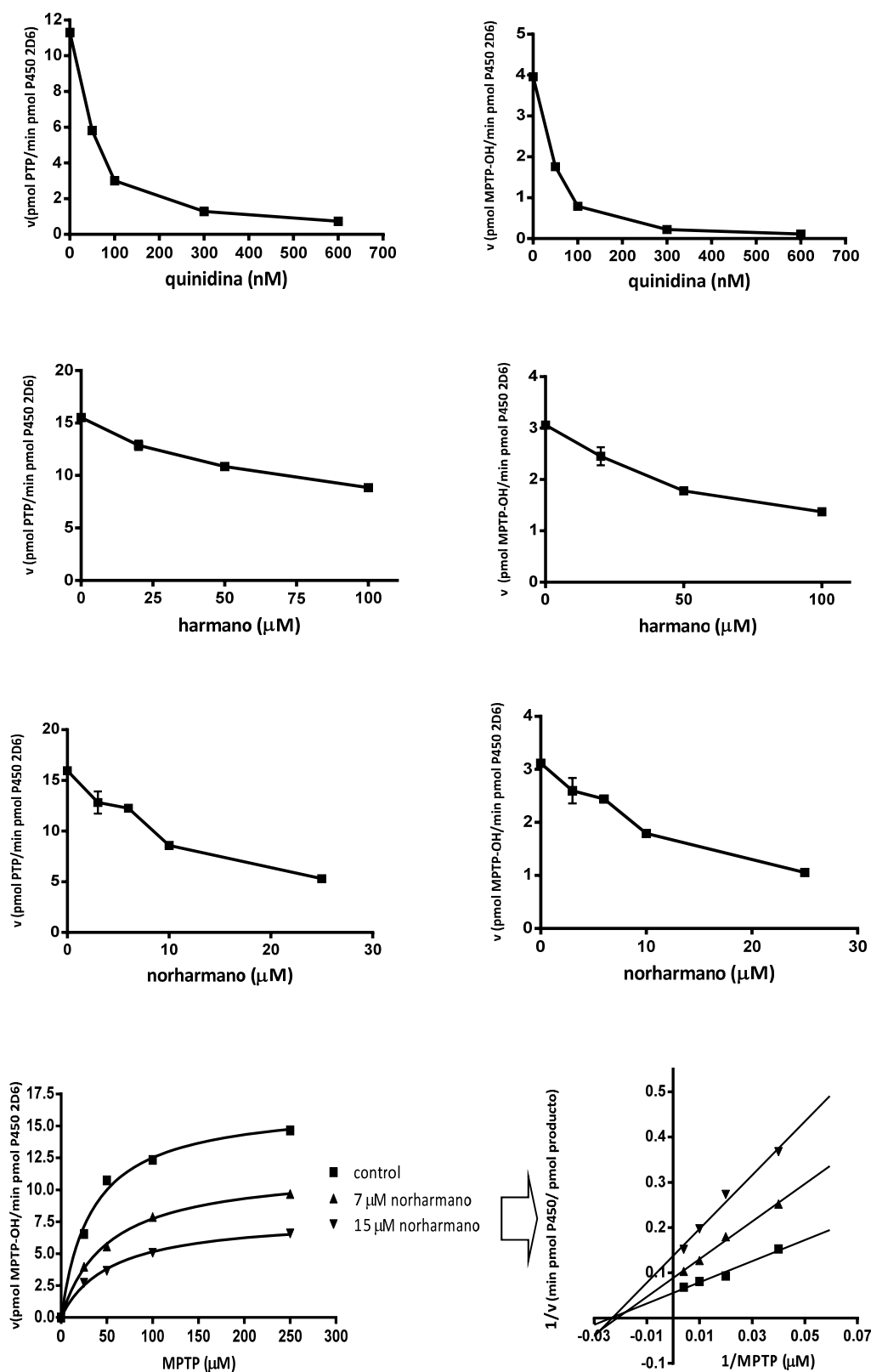
**Figura 3.91 ARRIBA** Inhibición de la metabolización del dextrometorfano (5  $\mu\text{M}$ ) por citocromo P450 2D6 en presencia de  $\beta\text{c}_3$  aromáticas y de quinidina. **ABAJO** Curvas de metabolización del dextrometorfano por citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL) con concentraciones crecientes del inhibidor norharmano (0, 5, y 20  $\mu\text{M}$ ) y representación de Lineweaver-Burk correspondiente.



**Figura 3.92.** ARRIBA Inhibición de la metabolización del dextrometorfan (5  $\mu\text{M}$ ) por microsomas hepáticos humanos en presencia de  $\beta\text{c}_5$  aromáticas. ABAJO Curvas de metabolización de dextrometorfan por microsomas hepáticos en presencia de concentraciones crecientes de norharmano (0, 0.8 y 1.6  $\mu\text{M}$ ) y representación de Lineweaver-Burk correspondiente.

Para completar los resultados anteriores, estudiamos la biotransformación de la neurotoxina MPTP por el citocromo P450 2D6 en presencia de  $\beta\text{c}_5$  y  $\text{th}\beta\text{c}_5$ . En el capítulo anterior, ya se describió que el MPTP se metaboliza por el citocromo P450 2D6 a PTP mediante una reacción de *N*-desmetilación y a MPTP-OH mediante una reacción de hidroxilación aromática<sup>123</sup>. El harmano no inhibió la biotransformación del MPTP a PTP o MPTP-OH (véase **Figura 3.93**). Las  $\text{th}\beta\text{c}_5$  estudiadas ( $\text{th}\beta\text{c}$  y 2- $\text{CH}_3$ - $\text{th}\beta\text{c}$ ) tampoco ofrecieron inhibición significativa por debajo de 10  $\mu\text{M}$  (resultados no mostrados). Sin embargo, el norharmano inhibió moderadamente la formación de PTP y MPTP-OH con valores de  $\text{IC}_{50}$  de 12 y 15  $\mu\text{M}$ , respectivamente. La metabolización del MPTP a PTP y MPTP-OH se inhibió por quinidina ( $\text{IC}_{50} < 100$  nM), inhibidor selectivo de referencia del citocromo P450 2D6.

El estudio a distintas concentraciones del MPTP y del inhibidor norharmano indica que las curvas de Michaelis-Menten (tomadas como formación de PTP por *N*-desmetilación del MPTP) proporcionan distinta  $V_{\text{max}}$  y parecida  $K_m$ , sugiriendo que la inhibición es de tipo no competitivo (véase **Figura 3.93**). Esto se demostró también con las gráficas correspondientes de dobles inversas. La constante  $K_i$  calculada experimentalmente fue 9.97  $\mu\text{M}$ . En resumen, el norharmano es un inhibidor moderado del citocromo P450 2D6, y su inhibición es tipo no competitivo o mixto. Estos datos se han demostrado tanto para el metabolismo del fármaco dextrometorfan como de la neurotoxina MPTP.



**Figura 3.93** ARRIBA Inhibición de la biotransformación de MPTP (100  $\mu\text{M}$ ) por el citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL) para dar PTP y MPTP-OH, en presencia de quinidina, harmano y norharmano. ABAJO Curvas de metabolización del MPTP por citocromo P450 2D6 (35 pmoles cit. P450/mL) en concentraciones crecientes de norharmano (0, 7 y 15  $\mu\text{M}$ ) y representación de Lineweaver-Burk de la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración.



# *Discusión General*



#### 4. Discusión general.

Los resultados descritos en esta Tesis demuestran la existencia de una notable biotransformación metabólica de las  $\beta$ -carbolinas en sus distintas formas (th $\beta$ c<sub>s</sub>,  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas, metoxi- $\beta$ c<sub>s</sub> y cationes carbolinio) por citocromos P450. Las  $\beta$ -carbolinas abundan en alimentos y plantas, y aparecen en muestras biológicas de animales y humanos (véase Introducción). Se absorben relativamente bien y ejercen una variada actividad biológica, farmacológica y toxicológica<sup>25 48 57 62 81 304 305 306</sup>. Así pues, su biotransformación y metabolismo por citocromos P450 puede afectar directamente a su biodisponibilidad e influir en su posterior actividad y/o toxicidad. Por ejemplo, la metabolización de  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas para dar metabolitos hidroxilados puede facilitar su eliminación, pero estos mismos metabolitos son nuevas sustancias bioactivas cuando se forman en tejidos extrahepáticos<sup>176</sup>. Se ha señalado que la biotransformación por citocromos P450 aparta a las  $\beta$ -carbolinas de rutas alternativas de bioactivación tóxica (por ejemplo *N*-metilación y oxidación aromática) (véase **Figura 1.3**)<sup>206 235</sup>. La importante contribución de enzimas altamente polimórficas (caso del P450 2D6) o con variado grado de expresión individual (caso del P450 1A2) sugiere, asimismo, la existencia de notable variación en la metabolización de  $\beta$ -carbolinas dependiendo del genotipo individual.

En los estudios de biotransformación de  $\beta$ -carbolinas por citocromos P450 se han detectado reacciones metabólicas de hidroxilación en el anillo bencénico y piridínico, reacciones de *O*-desmetilación, *N*-oxidación, deshidrogenación aromática y reacciones de *N*-desmetilación. En cuanto a las enzimas citocromo P450 involucradas en el metabolismo, se ha observado un cierto grado de solapamiento entre los distintos citocromos, aunque no exento de especificidad de éstos por algunos sustratos y biotransformaciones. A continuación se resumen y discuten algunos de los aspectos más señalados:

##### a) Biotransformación metabólica de las th $\beta$ c<sub>s</sub> y del MPTP.

La biotransformación de th $\beta$ c<sub>s</sub> dio lugar a distintos metabolitos de hidroxilación aromática y de *O*-desmetilación en el caso de las metoxi-th $\beta$ c<sub>s</sub> (véase **Figura 3.19**). En los compuestos *N*-metilados (2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c<sub>s</sub>) se produjo también una reacción de *N*-desmetilación (por ejemplo formación de th $\beta$ c a partir de 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c) y deshidrogenación parcial del anillo de tetrahidropiridina dando lugar a los cationes 3,4-dihidro-2-metil- $\beta$ -carbolinio (dh $\beta$ c<sup>+</sup>). Al contrario que las th $\beta$ c<sub>s</sub>, los ácidos tetrahydro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílicos (THCA y MTCA) no se biotransformaron por enzimas citocromo P450.

La principal enzima implicada en el metabolismo de th $\beta$ c<sub>s</sub> fue el citocromo P450 2D6 (véase **Figura 3.19**). Produjo hidroxilación aromática, para dar 6-OH y 7-OH-derivados, y reacciones de *O*-desmetilación de los compuestos metoxi-th $\beta$ c<sub>s</sub>. Por tanto, los metabolitos de hidroxilación de th $\beta$ c<sub>s</sub> detectados en muestras biológicas podrían provenir del metabolismo por este citocromo. Los citocromos P450 1A1 y 1A2 también dieron lugar a compuestos hidroxilados, aunque de manera muy minoritaria. La reacción de *N*-desmetilación en 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c<sub>s</sub> se llevó a cabo con la participación de los citocromos 2C19 y 1A2. Las reacciones de deshidrogenación se

observaron con los citocromos P450 1A1, P450 1A2 y P450 3A4. El resto de citocromos P450 no participaron de manera significativa en la biotransformación de th $\beta$ c<sub>s</sub>.

Las th $\beta$ c<sub>s</sub> se comportan como buenos sustratos del citocromo P450 2D6, siendo este citocromo determinante en el metabolismo y la biotransformación de estas sustancias (véase **Figura 3.19**). Estudios publicados que relacionan estructura/actividad sugieren que los sustratos tipo de esta enzima contienen un heteroátomo de nitrógeno y se metabolizan (oxidan) a aproximadamente 5-7 Å de distancia del centro activo de la enzima<sup>146 307</sup>. Este nitrógeno debe estar ionizado al pH fisiológico e interacciona con el residuo Glu-216 de la enzima<sup>308</sup>. El nitrógeno (N-2) de las th $\beta$ c<sub>s</sub> está protonado a pH fisiológico y puede facilitar la interacción en el centro activo del citocromo P450 2D6, posibilitando la hidroxilación de las th $\beta$ c<sub>s</sub>, o alternativamente la reacción de *O*-desmetilación en las metoxi-th $\beta$ c<sub>s</sub>.

El citocromo P450 2D6 no solo se expresa en el hígado, sino también en tejidos extrahepáticos como el cerebro<sup>141</sup>. Por tanto, el metabolismo de th $\beta$ c<sub>s</sub> por P450 2D6 podría ser relevante en estos tejidos que, a su vez, son diana de la acción de estos compuestos<sup>48 142 206 209</sup>. Por un lado, al hidroxilarlos se facilita su eliminación, por otro podría darse una acción competitiva de la propia biotransformación por P450 2D6 frente a otro tipo de enzimas (peroxidasas, *N*-metiltransferasas), que son consideradas de bioactivación tóxica de estas sustancias<sup>199</sup>. Según esto, la metabolización por el citocromo P450 2D6 podría ser una vía para la detoxificación (acción protectora) de th $\beta$ c<sub>s</sub>, y particularmente de 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c<sub>s</sub><sup>108 109</sup>, las cuales son protoxinas análogas a la neurotoxina MPTP<sup>115</sup>.

Del conjunto de citocromos P450 humanos, el citocromo P450 2D6 es la principal variante polimórfica<sup>206</sup>. A nivel fenotípico, esto se traduce en diversos y variados niveles de expresión y actividad de esta enzima, incluyendo actividad nula o reducida, normal, alta o muy alta. En base a ello, el perfil metabólico de las th $\beta$ c<sub>s</sub> podría cambiar sustancialmente, dependiendo del genotipo individual de este citocromo. De hecho, en esta memoria se ha puesto de manifiesto la diferencia en la actividad de biotransformación metabólica de th $\beta$ c<sub>s</sub> entre la variante común P450 2D6\*1 y la variante asiática P450 2D6\*10. Individuos con genotipo P450 2D6\*1 correspondiente a “metabolizadores buenos o extensos” tendrían mejor y mayor facilidad en la biotransformación y eliminación de estas sustancias, mientras que los individuos con genotipo P450 2D6\*10 correspondiente a “metabolizadores pobres” podrían acumular th $\beta$ c<sub>s</sub>, e indirectamente potenciar su actividad biológica y/o toxicidad.

Las th $\beta$ c<sub>s</sub>/ $\beta$ c<sub>s</sub> tienen cierta analogía estructural, funcional y toxicológica con el MPTP/MPP<sup>+</sup><sup>115</sup>. El MPTP es una neurotoxina que induce neurodegeneración en las células dopaminérgicas de la sustancia negra del cerebro, causando la enfermedad de Parkinson<sup>110 214</sup>. Actualmente se investiga la existencia de una conexión entre el citocromo P450 2D6 y su polimorfismo genético con el metabolismo del MPTP u otras toxinas relacionadas y su posible relación respecto a la protección contra enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson<sup>123 125 142 212 213</sup>. Al igual que ocurrió con las th $\beta$ c<sub>s</sub>, el MPTP se metabolizó principalmente con

intervención del citocromo P450 2D6 aunque con menor eficacia que éstas. Como consecuencia de ello, se produjeron varios metabolitos entre los que cabe señalar el compuesto MPTP-OH (reacción de *p*-hidroxilación aromática) y el compuesto PTP (reacción de *N*-desmetilación) (véase **Figura 3.28**). Estos dos metabolitos no son tóxicos, y por ello, las rutas de biotransformación metabólica por 2D6 son vías de detoxificación de la toxina MPTP<sup>123 231</sup>. Aunque en menor proporción, además del citocromo P450 2D6, contribuyeron a esta ruta de detoxificación el citocromo P450 1A2 y residualmente los citocromos 2C19, 2E1 y el 3A4.

Además de las reacciones de detoxificación mencionadas arriba, también se detectó cierta oxidación del MPTP a los cationes piridinio (MPDP<sup>+</sup>) (véase **Figura 3.28**) considerada como vía de activación toxicológica, catalizada por varios citocromos P450 (1A2, 2D6, 3A4 y 2C19). Sin embargo, esta vía es muy minoritaria en comparación con la vía de oxidación principal del MPTP propiciada por la enzima monoaminoxidasa (MAO)<sup>123</sup>.

Al contrario que el MPTP, su metabolito de oxidación, el catión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>), que es el responsable directo de la actividad neurotóxica, no se metabolizó por enzimas citocromo P450, lo cual podría favorecer su toxicidad. Caso contrario fue su derivado desmetilado, la PP (4-fenilpiridina), que sí se biotransformó por los citocromos 2E1 y 3A4, y que no es especialmente tóxico.

#### **b) Biotransformación metabólica de $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas y metoxi- $\beta$ c<sub>s</sub>.**

Las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas tuvieron distinto comportamiento que las th $\beta$ c<sub>s</sub> (véase **Figura 3.36**). Las dos  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas estudiadas (norharmano y harmano) se metabolizaron principalmente por los citocromos P450 1A2 y P450 1A1 para dar metabolitos de hidroxilación aromática como 6-OH- $\beta$ c y 3-OH- $\beta$ c. Las enzimas citocromo P450 2D6, P450 2C19 y P450 2E1 contribuyeron a la biotransformación de  $\beta$ c<sub>s</sub> a 6-OH- $\beta$ c<sub>s</sub> aunque en un mucho menor grado que P450 1A2 y P450 1A1. Los citocromos P450 2E1 y P450 3A4 dieron lugar a la correspondiente  $\beta$ c-2-óxido. En este caso a diferencia de las th $\beta$ c<sub>s</sub>, la menor ionización del nitrógeno piridínico (pK<sub>a</sub> más bajo) y la aromaticidad/planaridad de la molécula de  $\beta$ c aromática favorece seguramente la acción de los citocromos P450 1A frente al P450 2D6<sup>307</sup>. En base a la abundancia relativa de los citocromos P450<sup>141</sup> y a la actividad catalítica observada, se puede decir que el citocromo P450 1A2 será la principal enzima encargada de la metabolización oxidativa de  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas en hígado. No obstante, el patrón hepático de citocromos P450 no es extrapolable a otros tejidos donde actúan estos alcaloides. Por ejemplo, los citocromos P450 1A1, 2D6 y 2E1 se expresan en tejidos extrahepáticos como pulmón y cerebro<sup>141</sup> pudiendo desempeñar un papel en la metabolización oxidativa de las  $\beta$ c<sub>s</sub> presentes en estos tejidos<sup>25 52 62 142</sup>.

El citocromo P450 1A2 no es polimórfico pero se han constatado diferencias considerables (cantidades de P450 1A2 variables hasta 40 veces) entre individuos<sup>141</sup>. Por tanto, la actividad de esta enzima sobre las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas podría experimentar una variación sustancial, influyendo de manera distinta en la biodisponibilidad de estos alcaloides. Esta variabilidad individual también se producirá en los citocromos P450 polimórficos (es decir los citocromos P450 2D6 y P450 2C19), los cuales están

implicados en la oxidación minoritaria de  $\beta c_s$  a 6-OH-derivados. Por otro lado, los fenómenos de inducción por sustancias químicas afectan a los niveles de expresión de los citocromos P450 1A1, P450 1A2, P450 2C19, P450 2E1 y P450 3A4, y como consecuencia podrían influir en la biotransformación metabólica de  $\beta c_s$  por estos citocromos. El citocromo P450 1A1 tiene un alto grado de homología con el P450 1A2, y se induce por mutágenos, carcinógenos ambientales y de alimentos<sup>309</sup>, por ello, la inducción del citocromo P450 1A1 por estas sustancias podría influir en el metabolismo de  $\beta c_s$  aromáticas.

Como se ha señalado, las  $\beta c_s$  aromáticas ejercen un amplio espectro de acciones biológicas, farmacológicas y toxicológicas. Su biotransformación metabólica por citocromos P450 influirá en los procesos de eliminación, actividad y toxicidad (activación y desactivación) de estas sustancias. Tras los resultados de esta memoria sabemos que las principales rutas de metabolización de estos compuestos por citocromos P450 son a través de reacciones de hidroxilación aromática y de *N*-oxidación<sup>175</sup>. Estas vías podrían considerarse vías de detoxificación, pues compiten con la formación de los cationes tóxicos *N*-metil- $\beta$ -carbolinio<sup>206</sup> ( $\beta c_s^+$ ), catalizada por enzimas *N*-metiltransferasas y hemoperoxidasas<sup>107 108 109 117 120</sup> (véase **Figura 1.3**).

Las metoxi- $\beta c_s$  harmalina y harmina abundan en plantas de interés etnofarmacológico como *Banisteriopsis caapi* y *Peganum harmala*<sup>44 80 250</sup>. Estos compuestos psicoactivos se metabolizaron eficientemente por varios citocromos P450. La harmina (véase **Figura 3.50**) proporcionó cuatro metabolitos resultantes de las reacciones de *O*-desmetilación e hidroxilación: harmol (*O*-desmetilación), 6-OH-harmina, 3-OH-harmina y harmina-2-óxido. Existió superposición por varios citocromos en la actividad de *O*-desmetilación para dar harmol que fue catalizada por los citocromos P450 1A1, 1A2, 2D6, 2E1, 2C9 y 2C19. Basándose en la abundancia relativa y en la actividad catalítica observada, la enzima 2C9 sería la principal contribuyente al metabolismo de harmina a harmol en el hígado. La hidroxilación aromática de harmina a 6-OH-harmina y 3-OH-harmina se produjo, principalmente por los citocromos P450 1A2 y P450 1A1. Finalmente las enzimas P450 2E1 y P450 3A4 dieron harmina-2-óxido.

Más singular fue el comportamiento de la harmalina, donde se observó principalmente su biotransformación por el citocromo P450 2D6 (reacción de *O*-desmetilación) y una contribución minoritaria por 1A1, 1A2 y 3A4 (véase **Figura 3.51**). Por ello, el principal metabolito fue el harmalol. Como singularidad, además, se formó harmina por oxidación aromática de harmalina con contribución de varios citocromos. La harmalina contiene un nitrógeno protonable a pH fisiológico ( $pK_a = 9.8$ ), lo que la convierte en un mejor sustrato del citocromo P450 2D6<sup>250 310</sup> al igual que ocurre en el caso de las  $th\beta c_s$ . En cambio, la harmina ( $pK_a = 7.7$ ) está comparativamente menos protonada a pH fisiológico que la harmalina (una 100 veces menos ionizada), y tal vez por ello, es mejor sustrato de los citocromos P450 de la subfamilia 1A y peor del P450 2D6.

Hay que resaltar la contribución del citocromo polimórfico P450 2D6 al metabolismo de la harmalina, confirmando resultados previos<sup>206 250 311</sup>. Por tanto, el metabolismo de esta  $\beta$ -carbolina estará sujeto a diferencias interindividuales debidas

a este polimorfismo<sup>61</sup>. En cambio, la harmina no dependió especialmente del citocromo P450 2D6 para su metabolización, por lo que en este caso es descartable una influencia destacada del polimorfismo genético.

### c) Biotransformación metabólica de los cationes $\beta c_s^+$ ( $\beta$ -carbolinio).

Los cationes  $\beta c_s^+$  son toxinas que tienen la particularidad de retenerse en las mitocondrias inhibiendo la actividad de éstas con la consiguiente muerte celular<sup>223</sup>. Estos cationes (por ej. 2-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  y 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$ ) tienen propiedades funcionales y toxicológicas similares a la neurotoxina MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridinio)<sup>116 223 312</sup> y se han encontrado en cerebro humano post-mortem y en fluido cerebroespinal de pacientes con enfermedad de Parkinson<sup>102 106 120</sup>. Por ello, se cree que las  $\beta$ -carbolinas pueden ser neurotoxinas de acción lenta tras su conversión en cationes  $\beta c_s^+$ <sup>313 314</sup>. En este sentido, se ha demostrado que enzimas *N*-metiltransferasas presentes *in vivo* dan lugar a cationes  $\beta c_s^+$  por reacción de *N*-metilación de  $\beta c_s$  aromáticas<sup>107 117 120</sup> y que las enzimas hemoperoxidasas (mieloperoxidasa, lactoperoxidasa) pueden oxidar 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta c_s$  a cationes  $\beta c_s^+$ <sup>108 109</sup>.

Según se ha demostrado aquí, la biotransformación metabólica de los cationes  $\beta c_s^+$  (véase **Figura 3.61**) se lleva a cabo con la participación preferente de los citocromos P450 2D6, P450 1A1, y en menor medida de P450 1A2 y P450 3A4. Los compuestos resultantes fueron compuestos de hidroxilación aromática (en posiciones C-3 y C-6). La formación del 6-OH- $\beta c^+$  se produjo con participación de las distintas enzimas implicadas y principalmente por los citocromos P450 2D6 y P450 1A1, mientras que la formación del compuesto 3-OH- $\beta c^+$  se produjo solamente por P450 1A1 y P450 1A2. Hay que señalar que los citocromos P450 1A1 y P450 1A2 metabolizaron mejor los cationes 2-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  y 1,2-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$ , que el 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$ . Este último, únicamente se metabolizó de manera apreciable por el citocromo P450 2D6. Una posible explicación a este resultado, podría ser que las dos primeras dan lugar a compuestos que están como anhidrobase a pH fisiológico, perdiendo en parte su carácter catiónico (véase **Figura 3.62**), y por tanto favoreciendo la acción de los citocromos P450 1A1 y P450 1A2. En cambio, el 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  no puede dar lugar a la formación de la anhidrobase y permanece como catión, favoreciéndose la acción del citocromo P450 2D6. El compuesto catiónico 2,9-di-CH<sub>3</sub>- $\beta c^+$  es comparativamente la  $\beta$ -carbolina más tóxica de entre las  $\beta c_s$  estudiadas<sup>106 119</sup>. La participación en exclusiva del citocromo P450 2D6 en su biotransformación, que es comparativamente minoritario, podría tener alguna relación con una mayor dificultad de eliminación por biotransformación metabólica y por tanto con su mayor toxicidad *in vivo* en comparación con los otros cationes  $\beta c_s^+$ .

Comparativamente, el grado de biotransformación metabólica de los cationes  $\beta c_s^+$  fue menor que el de las  $\beta c_s$  aromáticas. Este comportamiento podría tener relación con la mayor toxicidad descrita para las sales cuaternarias de carbolinio en comparación con sus correspondientes  $\beta c_s$  aromáticas<sup>175</sup>. Los cationes  $\beta c_s^+$  una vez absorbidos y presentes *in vivo* se metabolizarán peor (por lo que tendrán una eliminación más difícil) que los correspondientes compuestos neutros ( $\beta$ -carbolinas). Por otro lado, al comparar la biotransformación metabólica de  $\beta c_s^+$  (catión carbolinio) con el MPP<sup>+</sup> (catión piridinio), se observó metabolización de los  $\beta c_s^+$  con intervención

de varias enzimas, y principalmente del citocromo P450 2D6. El MPP<sup>+</sup>, en cambio, no produjo metabolización evidente. Luego, esta es una diferencia clara entre el MPP<sup>+</sup> y los cationes βc<sup>+</sup><sub>s</sub>.

Los resultados de esta memoria indican que el citocromo P450 2D6 contribuye al metabolismo y detoxificación de los cationes βc<sup>+</sup><sub>s</sub>, y particularmente al de la neurotoxina 2,9-di-CH<sub>3</sub>-βc<sup>+</sup>, posibilitando su hidroxilación. Como ya se ha comentado, el citocromo P450 2D6 es una enzima polimórfica, por lo que el grado de metabolismo de estos cationes podría variar considerablemente entre individuos dependiendo del genotipo individual. Por otro lado, la actividad del citocromo P450 2D6 está disminuida en pacientes con enfermedades neurodegenerativas<sup>212</sup>, lo que podría afectar a la biotransformación de los cationes βc<sup>+</sup><sub>s</sub> y las thβc<sub>s</sub> que se metabolizan por este citocromo.

#### **d) Reducción de los cationes βc<sup>+</sup><sub>s</sub>.**

El mecanismo catalítico completo del citocromo P450 incluye la enzima citocromo P450 reductasa (NADPH-citocromo P450 reductasa) que toma electrones del cofactor NADPH y los transfiere al citocromo P450 para la activación del oxígeno molecular y la oxidación de sustratos (en este caso las β-carbolinas) (véase **Figura 1.7** en la Introducción General). En ciertos casos, la enzima citocromo P450 reductasa utiliza xenobióticos como sustratos (aceptores de electrones del NADPH) en reacciones que dan lugar a un ciclo redox. Por ejemplo, la citocromo P450 reductasa y otras reductasas reducen algunos agentes tóxicos como el paraquat o las quinonas mediante un electrón y éstos, a su vez, generan el radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) tras su reacción con el oxígeno molecular (ciclo redox) (véase **Figura 3.71**). Este mecanismo explica en parte la toxicidad que causan estas sustancias vía estrés oxidativo y podría contribuir a sus acciones neurodegenerativas<sup>257</sup>.

En esta memoria, se confirmó la generación del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) por el paraquat y la menadiona mediante la acción catalítica de la enzima citocromo P450 reductasa. Sin embargo los cationes βc<sup>+</sup><sub>s</sub> o el MPP<sup>+</sup>, que son sustancias que tienen cierta similitud estructural con el paraquat (cationes piridinio) no dieron lugar a la generación del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) por este mecanismo. Luego, los resultados obtenidos indican que durante la biotransformación de β-carbolinas por acción del sistema citocromo P450 + citocromo P450 reductasa no es esperable la formación directa de especies reactivas de oxígeno, y particularmente del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Estos resultados no avalan que el MPP<sup>+</sup> dé lugar a este tipo de radicales, al menos de manera significativa, y descartan por primera vez que los cationes βc<sup>+</sup><sub>s</sub> den lugar a la generación de ROS por esta vía como mecanismo directo de toxicidad.

#### **e) Inhibición de los citocromos P450 1A1, 1A2 y 2D6 por β-carbolinas y sustancias antioxidantes.**

Además de ser sustratos del citocromo P450, se ha sugerido que las β-carbolinas podrían ser inhibidores de estas enzimas<sup>175</sup>. En esta memoria se evaluó la inhibición enzimática del citocromo P450 2D6 y de los citocromos 1A (1A1 y 1A2) por β-carbolinas, comparándola con la que proporcionan varios compuestos

antioxidantes (compuestos fenólicos, flavonoides, y melatonina). Se demostró que el norharmano es un inhibidor moderado de tipo no competitivo o mixto del citocromo P450 2D6 (inhibición de la biotransformación de dextrometorfano y del MPTP). En cambio, harmano, th $\beta$ c y 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c no inhiben este citocromo. Por tanto, el norharmano podría influir en la actividad metabólica del citocromo P450 2D6 sobre compuestos endógenos<sup>142</sup>, fármacos, neurotoxinas como el MPTP o las propias th $\beta$ c<sub>s</sub> estudiadas en esta memoria.

Los citocromos P450 1A intervienen en los procesos toxicológicos. Numerosos mutágenos y carcinógenos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) y las aminas heterocíclicas aromáticas (AHAs) se activan por la acción de los citocromos P450 1A1 y P450 1A2<sup>166</sup>. Los fitoquímicos y antioxidantes de tipo flavonoide podrían inhibir los citocromos P450 de la subfamilia 1A<sup>163 239</sup> y en base a ello ejercer el papel quimioprotector o de quimiopreención (contra la activación de carcinógenos) que se atribuye a estas sustancias<sup>166 167 290 315 316</sup>. Por otro lado, se ha señalado que las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas al interaccionar con estos citocromos podrían influir en procesos de toxicológicos ejerciendo un papel quimioprotector<sup>96 97 124 175 238</sup>. En esta memoria se ha demostrado que las  $\beta$ c<sub>s</sub> harmano, norharmano y harmina fueron inhibidores moderados de los citocromos P450 1A1 y P450 1A2 cuando se utilizó fenacetina como sustrato. Por lo que respecta a los antioxidantes, se observó que galangina, apigenina, resveratrol,  $\alpha$ -naftoflavona, y elipticina inhibieron los citocromos P450 1A1 y P450 1A2. En cambio, genisteina, catequina, kaempferol, melatonina y th $\beta$ c no mostraron inhibición significativa.

Más específicamente, se investigó la acción de las  $\beta$ -carbolinas y los antioxidantes sobre la biotransformación y activación del carcinógeno benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) por el citocromo P450 1A1 (responsable principal de su biotransformación) y de la amina heterocíclica aromática 2-amino- $\alpha$ -carbolina (A $\alpha$ C) por P450 1A2 (responsable principal de su biotransformación). Las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas carecieron de inhibición significativa sobre la biotransformación y activación del B[*a*]P o de la A $\alpha$ C (exceptuando la harmina). En general, los antioxidantes estudiados tampoco resultaron ser inhibidores importantes de la biotransformación de estos tóxicos. Las excepciones fueron: galangina,  $\alpha$ -naftoflavona y elipticina, que fueron inhibidores moderados. Estos resultados constatan la dificultad para conseguir la inhibición de los citocromos de la subfamilia 1A cuando actúan sobre carcinógenos ambientales o de alimentos como el B[*a*]P o A $\alpha$ C. Este hecho podría explicar algunos resultados controvertidos en este tema<sup>167 287 317</sup>. Se observó que el B[*a*]P posee una alta afinidad de sustrato por el citocromo P450 1A1, y tal vez por ello resulta difícil inhibir su biotransformación por este citocromo, siendo tan sólo elipticina y  $\alpha$ -naftoflavona unos inhibidores significativos. En consecuencia, la alta afinidad del B[*a*]P por el citocromo P450 1A1 limita las posibilidades reales de reducir su bioactivación catalizada por este citocromo y posiblemente la utilidad de esta estrategia como un mecanismo de quimioprotección o quimiopreención. Las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas que funcionan como sustratos de los citocromos de la subfamilia 1A<sup>175</sup> y lo inhiben (por ejemplo véase los casos de norharmano y fenacetina), no llegaron a funcionar como inhibidores competitivos para reducir la metabolización del B[*a*]P, por lo que nos indica que la inhibición de la mutagenicidad del B[*a*]P en presencia de

$\beta$ -carbolinas<sup>97 241</sup> no se debe a la inhibición de su biotransformación por el citocromo P450 1A1.

En el pasado se ha sugerido que las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas podrían ser inhibidores de la activación metabólica de aminas heterocíclicas aromáticas<sup>97</sup>. Estas  $\beta$ c<sub>s</sub> se metabolizan por citocromos P450 de la subfamilia 1A como ha quedado demostrado en esta memoria<sup>109 175</sup>. Sin embargo, solo la harmina inhibió de manera moderada la biotransformación metabólica y activación del A $\alpha$ C al *N*-hidroxiamino derivado por el citocromo P450 1A2; en cambio, el norharmano y el harmano no mostraron inhibición destacable. Estas dos  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas aparecen como compuestos mayoritarios en carnes y pescados muy hechos junto a las aminas heterocíclicas aromáticas mutagénicas que son minoritarios (entre ellas, A $\alpha$ C)<sup>21 24 318 319</sup>. Los resultados obtenidos en esta memoria no avalan la posibilidad de una inhibición competitiva de las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas sobre el metabolismo de A $\alpha$ C o de otras aminas heterocíclicas. En cuanto a las sustancias antioxidantes investigadas; galangina,  $\alpha$ -naftoflavona y elipticina fueron buenos inhibidores de la activación del A $\alpha$ C.



*Conclusiones*



## 5. Conclusiones.

1. Los alcaloides bioactivos del tipo  $\beta$ -carbolina presentes en alimentos y plantas, y que se han detectado también en muestras biológicas, se metabolizan por las enzimas citocromos P450 humanas. Su biotransformación metabólica difiere entre las distintas subestructuras de  $\beta$ -carbolicas estudiadas (es decir, tetrahydro- $\beta$ -carbolicas -th $\beta$ c<sub>s</sub>-  $\beta$ -carbolicas aromáticas - $\beta$ c<sub>s</sub>- y cationes  $\beta$ -carbolicas - $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup>-) tanto en lo que respecta a los metabolitos producidos como a los citocromos P450 específicos involucrados. Los resultados de biotransformación metabólica con citocromos P450 recombinantes se confirman en microsomas hepáticos humanos.

2. Las th $\beta$ c<sub>s</sub> (tetrahydro- $\beta$ -carbolicas) se metabolizan principalmente por acción del citocromo P450 2D6 mediante hidroxilación aromática para dar hidroxith $\beta$ c<sub>s</sub> (th $\beta$ c<sub>s</sub> fenólicas). Las *N*-metiltetrahydro- $\beta$ -carbolicas (2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c<sub>s</sub>), además, se desmetilan (*N*-desmetilación) por acción de los citocromos P450 1A2 y P450 2C19 y se deshidrogenan (aromatización parcial a cationes dehidro- $\beta$ -carbolicas) por los citocromos P450 1A1 y P450 1A2. En cambio, los ácidos tetrahydro- $\beta$ -carbolicas-3-carboxílico (THCA y MTCA) no se biotransforman por los citocromos P450.

3. Las metoxith $\beta$ c<sub>s</sub> (pinolina y tetrahydroharmina) se metabolizan por acción del citocromo P450 2D6 mediante reacción de *O*-desmetilación proporcionando la correspondiente hidroxith $\beta$ c (th $\beta$ c<sub>s</sub> fenólicas).

4. La neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), considerada como un análogo funcional de 2-CH<sub>3</sub>-th $\beta$ c<sub>s</sub>, se metaboliza por los citocromos P450 para dar metabolitos de hidroxilación aromática (MPTP-OH) y de *N*-desmetilación (PTP). Esta biotransformación es una vía de detoxificación de esta sustancia y se produce principalmente por el citocromo P450 2D6. La neurotoxina MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridinio) considerada un análogo funcional de los cationes  $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup> no se metaboliza por los citocromos P450.

5. Las  $\beta$ -carbolicas aromáticas ( $\beta$ c<sub>s</sub>) (norharmano y harmano) se metabolizan por los citocromos P450 para dar metabolitos de hidroxilación aromática (6-OH- $\beta$ c y 3-OH- $\beta$ c) mayoritariamente, y *N*-óxidos ( $\beta$ c-2-óxido). La hidroxilación aromática se debe principalmente a los citocromos de la subfamilia 1A (P450 1A1 y P450 1A2), y en mucha menor medida a P450 2D6, P450 2E1 y P450 2C19. El perfil metabólico de las  $\beta$ c<sub>s</sub> estará determinado por los niveles y actividad de los citocromos de la subfamilia 1A.

6. Las metoxi- $\beta$ c<sub>s</sub> (harmina y harmalina) se metabolizan por los citocromos P450 a varios metabolitos. La harmina proporciona harmol (reacción de *O*-desmetilación) como metabolito principal con intervención de P450 2C9, P450 2D6, P450 1A1, P450 1A2, y P450 2C19, y en menor grado 6-OH-harmina y 3-OH-harmina por P450 1A1 y P450 1A2, y harmina-2-óxido por P450 2E1 y P450 3A4. La harmalina se metaboliza principalmente a harmalol (reacción de *O*-desmetilación) por acción del citocromo P450 2D6 y a harmina (oxidación aromática) por P450 3A4, P450 1A1, P450 1A2 y P450 2D6.

7. Los cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta c_s^+$ ) se metabolizan por los citocromos P450 con peor eficacia relativa que las  $\beta c_s$  aromáticas. Dan lugar a metabolitos de hidroxilación aromática (6-OH y 3-OH derivados) por acción de los citocromos P450 2D6 y P450 1A1, y en menor grado por P450 1A2 y P450 3A4. El catión 2,9-di- $\text{CH}_3$ - $\beta c_s^+$ , considerado el compuesto más tóxico, se metaboliza principalmente por el citocromo P450 2D6. La biotransformación de los cationes  $\beta c_s^+$  por citocromos P450 y, particularmente, por P450 2D6 supone una vía de detoxificación de estas toxinas.

8. La biotransformación metabólica de  $\text{th}\beta c_s$ , MPTP, harmalina y de los cationes  $\beta c_s^+$ , depende en gran medida del citocromo P450 2D6. Los mejores sustratos de este citocromo por orden de eficacia de biotransformación fueron:  $\text{th}\beta c_s > \beta c_s^+ > \text{MPTP} = \text{harmalina}$ . El citocromo P450 2D6\*1 (variante alélica común) produjo notablemente más biotransformación metabólica que el citocromo P450 2D6\*10 (variante alélica asiática). El perfil metabólico de estos compuestos podría variar sustancialmente entre individuos debido al carácter polimórfico del citocromo P450 2D6.

9. Los cationes tóxicos de  $\beta$ -carbolinio ( $\beta c_s^+$ ) y de piridinio ( $\text{MPP}^+$ ) no generan el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) asociado a un ciclo redox vía reducción enzimática por la enzima citocromo P450 reductasa, que participa en el metabolismo de los citocromos P450. Por tanto, este mecanismo no será el responsable de la acción tóxica de estas sustancias. Por el contrario, el paraquat y la menadiona sí generan anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) asociado a un ciclo redox por acción de la citocromo P450 reductasa.

10. Las  $\beta c_s$  aromáticas, harmina, harmano y norharmano son inhibidores moderados de la biotransformación del fármaco fenacetina (reacción de *O*-desetilación) por los citocromos P450 1A (P450 1A1 y P450 1A2). Los polifenoles quercetina, resveratrol, apigenina y galangina son inhibidores parecidos a las  $\beta c_s$ , mientras que la elipticina y la  $\alpha$ -naftoflavona son buenos inhibidores de esta biotransformación.

11. Los citocromos P450 de la subfamilia 1A (P450 1A1 y P450 1A2) activan mutágenos y carcinógenos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos y las aminas heterocíclicas aromáticas. El hidrocarburo benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) se metaboliza por el citocromo P450 1A1 pero no por P450 1A2, y genera compuestos de hidroxilación, dionas y dioles. La amina heterocíclica aromática 2-amino- $\alpha$ -carbolina (A $\alpha$ C) se metaboliza por el citocromo P450 1A2, y en mucha menor medida por P450 1A1, proporcionando compuestos de hidroxilación aromática y el metabolito activo 2-hidroxiamino- $\alpha$ -carbolina. La inhibición de estos citocromos podría ser un mecanismo de quimiopreención.

12. El citocromo P450 1A1 tiene alta afinidad de sustrato por el B[*a*]P, por lo que es difícil inhibir su biotransformación. Las  $\beta$ -carbolinas y la mayoría de los compuestos antioxidantes estudiados no inhiben la biotransformación del B[*a*]P por el citocromo P450 1A1. No es previsible que estos compuestos sean quimioprotectores por este mecanismo. Dos excepciones son la elipticina y la  $\alpha$ -naftoflavona, que sí inhiben la biotransformación del B[*a*]P.

13. Entre las  $\beta$ -carbolinas, solo la harmina es un inhibidor moderado de la biotransformación y activación de la amina heterocíclica aromática A $\alpha$ C por el citocromo P450 1A2. Entre los compuestos antioxidantes estudiados tan sólo la galangina,  $\alpha$ -naftoflavona y la elipticina fueron buenos inhibidores de esta biotransformación.

14. La  $\beta$ c aromática norharmano es un inhibidor moderado no competitivo del citocromo P450 2D6 en su actividad sobre el fármaco dextrometorfano y la neurotoxina MPTP. En cambio, el harmano y las th $\beta$ c<sub>s</sub> no inhiben este citocromo.

---



## ***Bibliografía***



## 6. Bibliografía

---

- <sup>1</sup>Gilbert J.; Senyuva H.Z. Bioactive compounds in foods. Blackwell publishing (2008).
- <sup>2</sup>Allen J.R.F. and Holmstedt, B.R. The simple  $\beta$ -carboline alkaloids. *Phytochemistry* (1980) 19, 1573-1582.
- <sup>3</sup>Wilkins, R.W.; Judson, W.E. The use of *rauwolfia serpentina* in hypertensive patients. *New England Journal of Medicine* (1953), 248, 48-53.
- <sup>4</sup>Adeniyi A.A.; Brindley G.S.; Pryor J.P.; Ralph D.J. Yohimbine in the treatment of orgasmic dysfunction. *Asian Journal of Andrology* (2007) 9, 403-407.
- <sup>5</sup>Mansk R.H.F. The Alkaloids: Chemistry and Physiology, Chapter 2: The carboline alkaloids (1965) 8, 47-53.
- <sup>6</sup>Suffness M.; Cordell G.A. The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology, Chapter 1: Antitumor Alkaloids. *Cordell* (1985) 25, 1-355.
- <sup>7</sup>Suzuki T.; Kubota T.; Kobayashi J. Eudistomidins H-K, new  $\beta$ -carboline alkaloids from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma glaucus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* (2011) 21, 4220-4223.
- <sup>8</sup>Airaksinen M.M.; Kari I.  $\beta$ -carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part I: occurrence, origin and metabolism. *Medical Biology* (1981) 59, 21-34.
- <sup>9</sup>Melchior C.; Collins M.A. The route and significance of endogenous synthesis of alkaloids in animals. *Critical Reviews in Toxicology* (1982) 9, 313-356.
- <sup>10</sup>Fekkes D.; Bode W.T. Occurrence and partition of the  $\beta$ -carboline norharman in rat organs. *Life Science* (1993) 52, 2045-2054.
- <sup>11</sup>Muraki T.; Yamozoe Y.; Kato R. Inhibition of benzodiazepine and GABA receptor binding by amino- $\beta$ -carbolines and other amino acid pyrolysate mutagens. *European Journal of Pharmacology* (1984) 98, 35-44.
- <sup>12</sup>Boeira J.M.; Viana A.F.; Picada J.N.; Henriques J.A. Genotoxic and recombinogenic activities of the two  $\beta$ -carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* (2002) 500, 39-48.
- <sup>13</sup>Brenneman D.E.; Page S.W.; Schultzber M.; Thomas F.S.; Zelazowski P.; Burnet P.; Avidor R.; Sternberg E.M. A descomposition product of a contaminant implicated in L-tryptophan eosinophilia myalgia syndrome affects spinal cord neuronal cell death and survival through stereospecific, maturation and partly interleukin-1-dependent mechanism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1993) 266, 1029-1035.
- <sup>14</sup>Bringmann G.; Feineis D.; Munchbach M.; God R.; Peters K.; Peters E. M.; Mossner R.; Lesch K.P. Toxicity and metabolism of the chloral-derived mammalian alkaloid 1-trichlorometil-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline (TaClo) in PC12 cells. *Zeitschrift für Naturforschung* (2006) 61, 601-610.
- <sup>15</sup>Hamann J.; Rommelspacher H.; Stroch A.; Reichmann H.; Gille G. Neurotoxic mechanism of 2,9-dimethyl- $\beta$ -carbolinium ion in primary dopaminergic culture. *Journal of Neurochemistry* (2006) 98, 1185-1199.
- <sup>16</sup>Herraiz T.; Ough C.S. Chemical and technological factors determining tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid content in fermented alcoholic beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1993) 41, 959-964.
- <sup>17</sup>Herraiz T.; Huang Z.; Ough C.S. 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid and 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1993) 41, 455-459.
- <sup>18</sup>Herraiz T. Occurrence of tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acids in commercial foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1996) 44, 3057-3065.
- <sup>19</sup>Herraiz T. Occurrence of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid an 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid in fruit juices, purees and jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1998) 46, 3484-3490.

- 
- <sup>20</sup>Herraiz T. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid and 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1999) 47, 4883-4887.
- <sup>21</sup>Herraiz T. Tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid compounds in fish and meat: possible precursors of co-mutagenic  $\beta$ -carbolines norharman and harman in cooked foods. *Food Additives and Contaminants* (2000) 17, 859-866.
- <sup>22</sup>Herraiz T. Analysis of the bioactive alkaloids tetrahydro- $\beta$ -carboline and  $\beta$ -carboline in food. *Journal of Chromatography A* (2000) 881, 483-499.
- <sup>23</sup>Herraiz T. Identification and occurrence of the bioactive  $\beta$ -carbolines norharman and harman in coffee brews. *Food Additives and Contaminants* (2002) 19, 748-754.
- <sup>24</sup>Herraiz T. Relative exposure to  $\beta$ -carbolines norharman and harman from foods and tobacco smoke. *Food Additives and Contaminants* (2004) 21, 1041-1050.
- <sup>25</sup>Herraiz T.  $\beta$ -Carbolines in Foods. In: *Bioactive Compounds in Foods*. Ed. Guilbert J. and Senyuva H.Z. Blackwell Publishing (2008), 199-223.
- <sup>26</sup>Cox E.D.; Cook J.M. The Pictet-Spengler condensation-a new direction for an old reaction. *Chemical Reviews* (1995) 95, 1797-1842.
- <sup>27</sup>Herraiz T. Tetrahydro- $\beta$ -carboline bioactive alkaloids in beverages and foods. *ACS Symposium Series* (2004) 871, 405-426.
- <sup>28</sup>Herraiz T. Ethyl 1-metil-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylate: a novel  $\beta$ -carboline found in alcoholic beverages. *Food Chemistry* (1999) 66, 313-321.
- <sup>29</sup>Herraiz T.; J. Galisteo, Identification and occurrence of the novel alkaloid pentahydroxypentyl-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid as a tryptophan glycoconjugate in fruit juices and jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002) 50, 4690-4695.
- <sup>30</sup>Rönner B.; Lerche H.; Bergmuller W.; Freilinger C.; Severin T.; Pishetsrieder M. Formation of tetrahydro- $\beta$ -carbolines and  $\beta$ -carbolines during the reaction of L-tryptophan with D-glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2000) 48, 2111-2116.
- <sup>31</sup>Diem S.; Herderich M. Reaction of tryptophan with carbohydrates: mechanistic studies on the formation of carbohydrate-derived  $\beta$ -carbolines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001) 49, 5473-5478.
- <sup>32</sup>Herraiz T.; Galisteo J.; Chamorro C. L-Tryptophan reacts with naturally occurring and food-occurring phenolic aldehydes to give phenolic tetrahydro- $\beta$ -carboline alkaloids: Activity as antioxidants and radical scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003) 51, 2168-2173.
- <sup>33</sup>Sen N.P.; Seaman S.W.; Baddoo P.A.; Weber D.; Malis G. Analytical methods for the determination and mass spectrometric confirmation of 1-metil-2-nitroso-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid and 2-nitroso-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid in foods. *Food Additives and Contaminants* (1991) 8, 275-290.
- <sup>34</sup>Galisteo J. Tesis Doctoral. Actividad antioxidante y antinitrosante de compuestos indólicos y  $\beta$ -carbolinas presentes en alimentos. Universidad Autónoma de Madrid (2008).
- <sup>35</sup>Herraiz T.; Galisteo J. Tetrahydro- $\beta$ -carboline alkaloids occur in fruits and fruit juices. Activity as antioxidant and radical scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003) 51, 7156-7161.
- <sup>36</sup>Papavergou E.; Clifford M.N. Tetrahydro- $\beta$ -carboline carboxylic acids in smoked foods. *Food Additives and Contaminants* (1992) 9, 83-95.
- <sup>37</sup>Papavergou E.; Herraiz T. Identification and occurrence of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid: the main  $\beta$ -carboline alkaloid in smoked foods. *Food Research International* (2003) 36, 843-848.

- 
- <sup>38</sup>Herraiz T. Tetrahydro- $\beta$ -carbolines, potential neuroactive alkaloids in chocolate and cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2000) 48, 4900-4904.
- <sup>39</sup>Wakabayashi K.; Ochiai M.; Saito H.; Tsuda M.; Suwa Y.; Nagao M.; Sugimura T. Presence of 1-metil-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid, a precursor of a mutagenic nitroso compound, in soy sauce. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* (1983) 80, 2912-2916.
- <sup>40</sup>Gutsche B.; Herderich M. HPLC-MS/MS profiling of tryptophan-derived alkaloids in food: identification of tetrahydro- $\beta$ -carboline dicarboxylic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1997) 45, 2458-2462.
- <sup>41</sup>Herraiz T.; Papavergou E. Identification and occurrence of tryptamine and tryptophan-derived tetrahydro- $\beta$ -carbolines in commercial sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, 2652-2658.
- <sup>42</sup>Alves R.C.; Casal S.; Oliveira B.P. Factors influencing the norharman and harman contents in espresso coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2007) 55, 1832-1838.
- <sup>43</sup>Herraiz T. Identification and occurrence of  $\beta$ -carboline alkaloids in raisins and inhibition of monoamine oxidase (MAO). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2007) 55, 218534-218540.
- <sup>44</sup>Herraiz T.; González D.; Ancín-Azpilicueta C.; Arán V.J, Guillén H.  $\beta$ -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology* (2010) 48, 839-845.
- <sup>45</sup>Pires A.P.S.; De Oliveira C.D.R.; Moura S.; Dorr F.A.; Silva W.A.E.; Yonamine M. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and  $\beta$ -carboline alkaloids in Ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant beverage. *Phytochemical Analysis* (2009) 20, 149-153.
- <sup>46</sup>Frison G.; Favretto D.; Zancanaro F.; Fazzin G.; Ferrara S.D. A case of  $\beta$ -carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic Science International* (2009) 179, 37-43.
- <sup>47</sup>Anderson N.J.; Tyacke R.J.; Husbands S.M.; Nutt D.J.; Hudson A.L.; Robinson E.S.J. *In vitro* and *ex vivo* distribution of 3-[H]-harmine, an endogenous  $\beta$ -carboline, in rat brain. *Neuropharmacology* (2006) 50, 269-276.
- <sup>48</sup>Airaksinen M.M.; Kari I.  $\beta$ -Carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part 2. Effects. *Medical Biology* (1981) 59, 190-211.
- <sup>49</sup>Buckholtz N.S. Neurobiology of tetrahydro- $\beta$ -carbolines. *Life Sciences* (1980) 27, 893-903.
- <sup>50</sup>Cao R.H.; Peng W.L.; Wang Z.H.; Xu A.L.  $\beta$ -Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry* (2007) 14, 479-500.
- <sup>51</sup>Halberstadt A.L.; Buell M.R.; Masten V.L.; Risbrough V.B.; Geyer M.A. Modification of the effects of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine on exploratory behavior in rats by monoamine oxidase inhibitors. *Psychopharmacology* (2008) 201, 55-66.
- <sup>52</sup>Östergren A.; Annas A.; Skog K.; Lindquist N. G.; Brittebo E. B. Long term retention of neurotoxic  $\beta$ -carbolines in brain neuromelanin. *Journal of Neural Transmission* (2004) 111, 141-157.
- <sup>53</sup>Zhang L.; Teng L.; Gong C.; Liu W.; Cheng X.; Gu S.; Deng Z.; Wang Z.; Wang C. Simultaneous determination of harmine, harmaline and their metabolites harmol and harmalol in beagle dog plasma by UPLC-ESI-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2013) 85, 162-168.
- <sup>54</sup>Zhao M.; Bi L.; Wang W.; Wang C.; Baudy-Floch M.; Ju J.; Peng S. Synthesis and cytotoxic activities of  $\beta$ -carboline amino acid ester conjugates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (2006) 14, 6998-7010.
- <sup>55</sup>Di Giorgio C.; Delmas F.; Ollivier E.; Elias R.; Balansard G.; Timon-David P. *In vitro* activity of the  $\beta$ -carboline alkaloids harmine, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. *Experimental Parasitology* (2004) 106, 67-74.

- 
- <sup>56</sup>Cao R.; Chen Q.; Hou X.; Chen H.; Guan H.; Ma Y.; Peng W.; Xu A. Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted  $\beta$ -carboline derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (2004) 12, 4613-4623.
- <sup>57</sup>Robinson E.S.J.; Anderson N.J.; Crosby J.; Nutt D.J.; Hudson A.L. Endogenous  $\beta$ -carbolines as clonidine-displacing substances. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2003) 1009, 157-166.
- <sup>58</sup>Valdez R.H.; Tonin L.T.D.; Ueda-Nakamura T.; Dias B.P.; Morgado-Diaz J.A.; Sarragiotto M.H.; Nakamura C.V. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* (2009) 110, 7-14.
- <sup>59</sup>Goodwin A.K.; Lantz-McPeak S.M.; Robinson B.L.; Law C.D.; Ali S.F.; Ferguson S.A. Effects of adolescent treatment with nicotine, harmine, or norharmine in male sprague-dawley rats. *Neurotoxicology and Teratology* (2015) 47, 25-35
- <sup>60</sup>Manda S.; Khan S.I.; Jain S.K.; Mohammed S.; Tekwani B.L.; Khan I.A.; Vishwakarma R.A.; Bharate S.B. Synthesis, antileishmanial and antitrypanosomal activities of N-substituted tetrahydro- $\beta$ -carbolines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* (2014) 24, 3247-3250.
- <sup>61</sup>Jiang X.L.; Shen H.W.; Mager D.E.; Yu A.M. Pharmacokinetic interactions between monoamine oxidase A inhibitor harmaline and 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine and the impact of CYP2D6 Status. *Drug Metabolism and Disposition* (2013) 41, 975-986.
- <sup>62</sup>Herraiz T.; Chaparro C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke:  $\beta$ -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005) 326, 378-386.
- <sup>63</sup>Drung B.; Scholz C.; Barbosa V.A.; Nazari A.; Sarragiotto M.H.; Schmidt B. Computational experimental evaluation of the structure/activity relationship of  $\beta$ -carbolines as DYRK1A inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* (2014) 24, 4854-4860.
- <sup>64</sup>Mennenga S.E.; Gerson J.E.; Dunckley T.; Bimonte-Nelson H.A. Harmine treatment enhances short-term memory in old rats: Dissociation of cognition and the ability to perform the procedural requirements of maze testing. *Physiology and Behavior* (2015) 138, 260-265.
- <sup>65</sup>Glennon R.A.; Dukat M.; Grella B.; Hong S.S.; Costantino L.; Teitler M.; Smith C.; Egan C.; Davis K.; Mattson M.V. Binding of  $\beta$ -carbolines and related agents at serotonin (5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub>), dopamine (D-2) and benzodiazepine receptors. *Drug and Alcohol Dependence* (2000) 60, 121-132.
- <sup>66</sup>Myers R.D. Isoquinolines,  $\beta$ -carbolines and alcohol drinking: Involvement of opioid and dopaminergic mechanism. *Experientia* (1989) 45, 436-443.
- <sup>67</sup>Fekkes D.; Bernard B.F.; Cappendijk S.L. Norharman and alcohol-dependency in male Wistar rats. *European Neuropsychopharmacology* (2004) 14, 361-366.
- <sup>68</sup>Shi C.; Chen S.Y.; Wang G.J.; Liao J.F.; Chen C.F. Vasorelaxant effect of harmine. *European Journal of Pharmacology* (2000) 390, 319-325.
- <sup>69</sup>Adell A.; Biggs T.A.; Myers R.D. Action of harmine (1-methyl- $\beta$ -carboline) on the brain: Body temperature and *in vivo* efflux of 5-HT from hippocampus of the rat. *Neuropharmacology* (1996) 35, 1101-1107.
- <sup>70</sup>Cooper E.J.; Hudson A.L.; Parker C.A.; Morgan N.G. Effects of the  $\beta$ -carbolines, harmine and pinoline, on insulin secretion from isolated human islets of Langerhans. *European Journal of Pharmacology* (2003) 482, 189-196.
- <sup>71</sup>Aricioglu F.; Altunbas H. Harmine induces anxiolysis and antidepressant-like effects in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2003) 1009, 196-201.
- <sup>72</sup>Fortunato J.J.; Reus G.Z.; Kirsch T.R.; Stringari R.B.; Stertz L.; Kapczinski F.; Pinto J.P.; Hallak J.E.; Zuardi A.W.; Crippa J.A.; Quevedo J. Acute harmine administration induces antidepressant-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* (2009) 33, 1425-1430.

- 
- <sup>73</sup>Rommelspacher H.; May T.; Salewski B. Harman (1-methyl- $\beta$ -carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *European Journal of Pharmacology* (1994) 252, 51-59.
- <sup>74</sup>Herraiz T; Chaparro C. Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and  $\beta$ -carbolines norharman and harman isolated from coffee. *Life Sciences* (2006) 78, 795-802.
- <sup>75</sup>Baum S.S.; Hill R.; Rommelspacher H. Harman-induced changes of extracellular concentrations of neurotransmitters in the nucleus accumbens of rats. *European Journal of Pharmacology* (1996) 314, 75-82.
- <sup>76</sup>Lieu C.A.; Chinta S.J.; Rane A.; Andersen J.K. Age-related behavioral phenotype of an astrocytic monoamine oxidase-B transgenic mouse model of Parkinson's Disease. *PLOS ONE* (2013) 8(1):e54200
- <sup>77</sup>Mallajosyula J.K.; Chinta S.J.; Rajagopalan S.; Nicholls D.G.; Andersen J.K. Metabolic control analysis in a cellular model of elevated MAO-B: relevance to Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research* (2009) 16, 186-193.
- <sup>78</sup>Youdim M.B.H.; Edmondson D.; Tipton K.F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews Neuroscience* (2006) 7, 295-309.
- <sup>79</sup>Herraiz T.; Chaparro C. Analysis of monoamine oxidase enzymatic activity by reversed-phase high performance liquid chromatography and inhibition by  $\beta$ -carboline alkaloids occurring in foods and plants. *Journal of Chromatography A* (2006) 1120, 237-243.
- <sup>80</sup>Herraiz T.; Guillén H. Inhibition of the bioactivation of the neurotoxin MPTP by antioxidants, redox agents and monoamine oxidase inhibitors. *Food and Chemical Toxicology* (2011) 49, 1773-1781.
- <sup>81</sup>Herraiz T, Galisteo J. Tetrahydro- $\beta$ -carboline alkaloids that occur in foods and biological systems act as radical scavengers and antioxidants in the ABTS assay. *Free Radical Research* (2002) 36, 923-928.
- <sup>82</sup>Ichikawa M.; Ryu K.; Yoshida J.; Ide N.; Yoshida S.; Sasaoka T.; Sumi S. Antioxidant effects of tetrahydro- $\beta$ -carboline derivatives identified in aged garlic extract. *ACS Symposium Series* (2004) 871, 380-404.
- <sup>83</sup>Tsuchiya H.; Sato M.; Watanabe I. Antiplatelet activity of soy sauce as functional seasoning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1999) 47, 4167-74.
- <sup>84</sup>Hamann J.; Wernicke C.; Lehmann J.; Reichmann H.; Rommelspacher H.; Gille G. 9-Methyl- $\beta$ -carboline up-regulates the appearance of differentiated dopaminergic neurones in primary mesencephalic culture. *Neurochemistry International* (2008) 52, 688-700.
- <sup>85</sup>Wernicke C.; Hellmann J.; Zieba B.; Kuter K.; Ossowska K.; Frenzel M.; Dencher N.A. Rommelspacher, H. 9-Methyl- $\beta$ -carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's Disease. *Pharmacological Reports* (2010) 62, 35-53.
- <sup>86</sup>Herraiz T.; Galisteo J. Hydroxyl radical reactions and the radical scavenging activity of  $\beta$ -carboline alkaloids. *Food Chemistry* (2015) 172, 640-649.
- <sup>87</sup>Herraiz T, Galisteo J. Endogenous and dietary indoles: a class of antioxidants and radical scavengers in the ABTS assay. *Free Radical Research* (2004) 38, 3, 323-331.
- <sup>88</sup>Reiter R.J.; Tan D.X.; Allegra M. Melatonin: reducing molecular pathology and dysfunction due to free radicals and associated reactants. *Neuroendocrinology Letters* (2002) 23, 3-8.
- <sup>89</sup>Sanchez-Barceló E.J.; Mediavilla M.D.; Tan D.X.; Reiter R.J. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Current Medicinal Chemistry* (2010) 17, 2070-2095.
- <sup>90</sup>Reiter R.J.; Tan D.X.; Mayo J.C.; Sainz R.M.; Lopez-Burillo S. Melatonin, longevity and health in the aged: an assessment. *Free Radical Research* (2002) 36, 12, 1323-1329.

- 
- <sup>91</sup>Bi W.; Cai J.; Liu S.; Baudy-Floch, M.; Bi L. Design synthesis and cardioprotective effect of a new class of dual-acting agents: phenolic tetrahydro- $\beta$ -carboline RGD peptidomimetic conjugates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (2007) 15, 6909-6919.
- <sup>92</sup>Wakabayashi K.; Totsuka Y. Fukutome K.; Oguri A.; Ushiyama H.; Sugimura, T. Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic  $\beta$ -carbolines. *Mutation Research* (1997) 376, 253-259.
- <sup>93</sup>Higashimoto M.; Yamamoto T.; Kinouchi T.; Matsumoto H.; Ohnishi Y. Mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid treated with nitrite in the presence of alcohols. *Mutation Research/Genetic Toxicology* (1996) 367, 43-49.
- <sup>94</sup>Diem S.; Gutsche B.; Herderich M. Degradation of tetrahydro- $\beta$ -carbolines in the presence of nitrite: HPLC-MS analysis of the reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001) 49, 5993-5998.
- <sup>95</sup>Matsuda S.; Kanamori Y.; Kina N. Isolation of mutagenic  $\beta$ -carboline derivatives after nitrite treatment of Maillard reaction mixtures and analysis of these compounds from foodstuffs and human urine. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (2005) 69, 2232-2235.
- <sup>96</sup>Totsuka Y.; Hada N.; Matsumoto K.; Kawahara N.; Murakami Y.; Yokoyama Y.; Sugimura T.; Wakabayashi K. Structural determination of a mutagenic aminophenyl norharman produced by the co-mutagen norharman with aniline. *Carcinogenesis* (1998) 19, 1995-2000.
- <sup>97</sup>Nii H. Possibility of the involvement of 9H-pyrido[3,4-b]indole (norharman) in carcinogenesis via inhibition of cytochrome P450-related activities and intercalation to DNA. *Mutation Research* (2003) 541, 123-136.
- <sup>98</sup>Guan H.; Chen H.; Peng W.; Ma Y.; Cao R.; Liu X.; Xu A. Design of  $\beta$ -carboline derivatives as DNA-targeting antitumor agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2006) 41, 1167-79.
- <sup>99</sup>Cao R.; Chen H.; Peng W.; Ma Y.; Hou X.; Guan H.; Liu X.; Xu A. Design, synthesis and *in vitro* and *in vivo* antitumor activities of novel  $\beta$ -carboline derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2005) 40, 991-1001.
- <sup>100</sup>Vignoni M.; Erra-Balsells R.; Epe B.; Cabrerizo F.M. Intra and extra-cellular DNA damage by harmine and 9-methyl-harmine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2014) 132, 66-71.
- <sup>101</sup>Sobhani A.M.; Ebrahimi S.A.; Mahmoudian M. An *in vitro* evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala L.* seeds extract and its  $\beta$ -carboline alkaloids. *Journal of Pharmacological Sciences* (2002) 5, 19-23.
- <sup>102</sup>Matsubara K.; Gonda T.; Sawada H.; Uezono T.; Kobayashi Y.; Kawamura T. Endogenously occurring  $\beta$ -carboline induces parkinsonism in nonprimate animals: A possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry* (1998) 70, 727-735.
- <sup>103</sup>Louis E.D. Environmental epidemiology of essential tremor. *Neuroepidemiology* (2008) 31, 139-149.
- <sup>104</sup>Herraziz T.  $\beta$ -carbolines as neurotoxins. In: *Isoquinolines and  $\beta$ -carbolines as neurotoxins and neuroprotectants. New vistas in Parkinson's Disease therapy.* Ed. Antkiewicz-Michaluk, L.; Rommelspacher, H. Springer (2012) 77-103.
- <sup>105</sup>Collins M.A.; Neafsey E.J.  $\beta$ -carboline analogues of MPP<sup>+</sup> as environmental neurotoxins. In: *Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and Related Disorders.* Kluwer Acad. Plenum publ. (2000) 115-130.
- <sup>106</sup>Hamann J.; Rommelspacher H.; Storch A.; Reichmann H.; Gille G. Neurotoxic mechanisms of 2,9-dimethyl- $\beta$ -carbolinium ion in primary dopaminergic culture. *Journal of Neurochemistry* (2006), 98, 1185-1199.
- <sup>107</sup>Gearhart D.A.; Collins M.A.; Lee J.M.; Neafsey E.J. Increased  $\beta$ -carboline 9N-methyl-transferase activity in the frontal cortex in Parkinson's Disease. *Neurobiology of Disease* (2000) 7, 201-211.

- 
- <sup>108</sup>Herraiz T.; Guillén H.; Galisteo J. N-Methyltetrahydro- $\beta$ -carboline analogs of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxin are oxidized to neurotoxic  $\beta$ -carbolinium cations by heme peroxidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2007) 356, 118-123.
- <sup>109</sup>Herraiz T.; Guillén H.; Galisteo J.; Metabolite profile resulting from the activation/inactivation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 2-methyltetrahydro- $\beta$ -carboline by oxidative enzymes. *BioMed Research International* (2013) 248608.
- <sup>110</sup>Langston J.W.; Ballard P.; Tetrud J.W.; Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* (1983) 219, 979-980.
- <sup>111</sup>Heikkila R.E.; Manzino L.; Cabbat F.S.; Duvoisin R.C. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* (1984) 311, 467-469.
- <sup>112</sup>Przedborski S; Vila M. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model. A tool to explore the pathogenesis of Parkinson's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2003) 991, 189-198.
- <sup>113</sup>Drechsel D.A.; Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's Disease. *Free Radical Biology and Medicine* (2008) 44, 1873-1886.
- <sup>114</sup>Costello S.; Cockburn M.; Bronstein J.; Zhang X.; Ritz B. Parkinson's Disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *American Journal of Epidemiology* (2009) 169, 919-926.
- <sup>115</sup>Collins M.A.; Neafsey E.J.  $\beta$ -Carboline analogs of N-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP). Endogenous factors underlying idiopathic Parkinsonism. *Neuroscience Letters* (1985) 55, 179-184.
- <sup>116</sup>Storch A.; Ludolph A.C.; Schwarz J. Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. *Journal of Neural Transmission* (2004) 111, 1267-1286.
- <sup>117</sup>Albores R.; Neafsey E.J.; Drucker G.; Fields J.Z.; Collins M.A. Mitochondrial respiratory inhibition by N-methylated  $\beta$ -carboline derivatives structurally resembling N-methyl-4-phenylpyridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1990) 87, 9368-9372.
- <sup>118</sup>Neafsey E.J.; Drucker G.; Raikoff K.; Collins M.A. Striatal dopaminergic toxicity following intranigral injection in rats of 2-methyl-norharmaline, a  $\beta$ -carbolinium analog of N-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>). *Neuroscience Letters* (1989) 105, 344-349.
- <sup>119</sup>Wernicke C.; Schott Y.; Enzensperger C.; Schulze G.; Lehmann J.; Rommelspacher H. Cytotoxicity of  $\beta$ -carbolines in dopamine transporter expressing cells: Structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology* (2007) 74 1065-1077.
- <sup>120</sup>Matsubara K; Collins M.A; Akane A.; Ikebuchi J.; Neafsey E.J.; Kagawa M.; Shiono H. Potential bioactivated neurotoxicants, N-methylated  $\beta$ -carbolinium ions, are present in human brain. *Brain Research* (1993) 610, 90-96.
- <sup>121</sup>Matsubara K.; Kobayashi S.; Kobayashi Y.; Yamashita K.; Koide H.; Hatta M.; Iwamoto K.; Tanaka O.; Kimura K.  $\beta$ -Carbolinium cations, endogenous MPP<sup>+</sup> analogs in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's Disease. *Neurology* (1995) 45, 2240-2245.
- <sup>122</sup>Antkiewicz-Michaluk L.; Rommelspacher H. Isoquinolines and  $\beta$ -carbolines as neurotoxins and neuroprotectants. *New Vistas in Parkinson's disease therapy*. Springer (2012).
- <sup>123</sup>Herraiz T.; Guillén H.; Arán V.J.; Idle J.R.; Gonzalez F.J. Comparative aromatic hydroxylation and N-demethylation of MPTP neurotoxin and its analogs, N-methylated  $\beta$ -carboline and isoquinoline alkaloids, by human cytochrome P450 2D6. *Toxicology and Applied Pharmacology* (2006) 216, 387-398.
- <sup>124</sup>El Gendy M.A.M.; Soshilov A.A.; Denison M.S.; El-Kadi A.O.S. Harmaline and harmalol inhibit the carcinogen-activating enzyme CYP1A1 via transcriptional and posttranslational mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* (2012) 50, 353-362.

- 
- <sup>125</sup>Bajpai P.; Sangar M.C.; Singh S.; Tang W.G.; Bansal S.; Chowdhury G.; Cheng Q.; Fang J.K.; Martin M.V.; Guengerich F.P.; Avadhani N.G. Metabolism of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by mitochondrion-targeted cytochrome P450 2D6. Implications in Parkinson Disease. *Journal of Biological Chemistry* (2013) 288, 4436-4451.
- <sup>126</sup>Herraiz T. Tetrahydro- $\beta$ -carboline and  $\beta$ -carboline alkaloids in foods: An overview of de chemistry, presence and biological activity. In: *Food Policy, Control and Research*. Ed. Riley, A.P. Nova Science Publishers Inc. (2005) 125-148.
- <sup>127</sup>Herraiz T. Evaluation of the oxidation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to toxic pyridinium cations by monoamine oxidase (MAO) enzymes and its use to search for new MAO inhibitors and protective agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (2012) 27, 810-817.
- <sup>128</sup>Gearhart D.A.; Neafsey E.J.; Collins M.A. Phenylethanolamine N-methyltransferase has  $\beta$ -carboline 2N-methyltransferase activity: hypothetical relevance to Parkinson's Disease. *Neurochemistry International* (2002) 40, 611-620.
- <sup>129</sup>Guengerich F.P. Oxidative, reductive and hydrolytic metabolism of drugs. In: *Drug metabolism in drug design and development*. Ed. Zhang, D.; Zhu, M.; Humphreys, W.G. Wiley (2008) 15-35.
- <sup>130</sup>Cascales M.; Gomez-Lechón M. Cytochrome P450. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia (2004).
- <sup>131</sup>Ortiz de Montellano P.R. Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry, 3<sup>o</sup> ed. Kluwer Acad. Plenum Publishers (2005).
- <sup>132</sup>Zeldin D.C.; Seubert J.M. Structure, mechanism, and regulation of cytochromes P450. In: *Molecular and Biochemical toxicology*. Ed. Smart, R.C.; Hodgson, E.; John Wiley and Sons Inc. (2008) 147-172.
- <sup>133</sup>Chapple C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P-450-dependent monooxygenases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* (1998) 49, 311-343.
- <sup>134</sup>Paine J.I.; Scrutton N.S.; Munro A.W.; Gutiérrez A.; Roberts G.C.K.; Wolf R. Electron transfer partners of cytochrome P450. In: *Cytochrome P450. Structure, mechanism, and biochemistry*, 3<sup>o</sup> ed. Ed. Ortiz de Montellano P.R. Kluwer Acad. Plenum publ. (2005) 115-148.
- <sup>135</sup>Ioannides C. Effect of diet and nutrition on the expression of cytochromes. *Xenobiotica* (1999) 29, 109-154.
- <sup>136</sup>Hodgson E.; Das P.C.; Cho T.M.; Rose R.L. Phase I metabolism of toxicants and metabolic interactions. In: *Structure, mechanism and regulation of cytochromes P450*. Ed. Smart R.C.; Hodgson, E.; John Wiley and Sons inc. (2008) 173-203.
- <sup>137</sup>Ortiz de Montellano P.R.; De Voss J.J. Substrate oxidation by cytochrome P450 enzymes. In: *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3<sup>o</sup> ed. Ed. Ortiz de Montellano P.R. Kluwer Acad. Plenum Publ. (2005) 183-245.
- <sup>138</sup>Omura T. Forty years of cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1999) 266, 690-698.
- <sup>139</sup><http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>
- <sup>140</sup>Gómez-Lechón M.J. Citocromo P450 extrahepático. En: Cascales M.; Gómez-Lechón M.J. *Cytochrome P450*. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia (2004).
- <sup>141</sup>Guengerich F.P. Human cytochrome P450 enzymes. In: *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3<sup>o</sup> ed.; Ed. Ortiz de Montellano P.R. Kluwer Acad. Plenum Pub.(2005) 377-530.
- <sup>142</sup>Wang, X.S.; Li J.; Dong G.C.; Yue J. The endogenous substrates of brain CYP2D. *European Journal of Pharmacology* (2014) 724, 211-218.

- 
- <sup>143</sup>Guengerich F.P. Shimada, T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology* (1991) 4, 391-407.
- <sup>144</sup>Guengerich F.P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* (2006) 8, 101-111.
- <sup>145</sup>Evans W.E.; Relling M.V. Pharmacogenomics: translating function genomics into rational therapeutics. *Science* (1999) 286, 487-491.
- <sup>146</sup>Huttunen K.M.; Mähönen N.; Raunio H.; Rautio J. Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery. *Current Medicinal Chemistry* (2008) 15, 2346-2365.
- <sup>147</sup>Lewis D.F.V.; Jacobs M.N.; Dickins M. The importance of compound lipophilicity for substrate binding to human P450s involved in drug metabolism. *Drug Discovery Today* (2004) 9, 530-537.
- <sup>148</sup>Coleman M.C. In: *Human drug metabolism. An introduction.* Wiley. (2005).
- <sup>149</sup>Gonzalez F.J.; Yu A.M. Cytochrome P450 and xenobiotic receptor humanized mice. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (2006) 46, 41-64.
- <sup>150</sup>Williams S.N.; Dunham E.; Bradfield C.A. Induction of cytochrome P450 enzymes, In: *Cytochrome P450. Structure, mechanism and biochemistry 3<sup>rd</sup> ed.* Ed. Ortiz de Montellano, P.R. Kluwer Acad. Plenum Pub. (2005) 323-346.
- <sup>151</sup>Zanger U.M.; Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics* (2013) 138, 103-141.
- <sup>152</sup>Mahgoub A.; Idle J.R.; Dring L.G.; Lancaster R.; Smith R.L. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* (1977) 17, 584-586.
- <sup>153</sup>Yu A.M.; Idle J.R.; Byrd L.G.; Krausz K.W.; Kűpfer A.; Gonzalez F.J. Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6. *Pharmacogenetics* (2003) 13, 173-181.
- <sup>154</sup>Daly A.K. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundamental and Clinical Pharmacology* (2003) 17, 27-41.
- <sup>155</sup><http://www.cypalleles.ki.se/>
- <sup>156</sup>Ingelman-Sundberg, M.; Oscarson M.; McLellan R.A. Polymorphic human cytochrome P-450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends in Pharmacological Sciences* (1999) 20, 342-349.
- <sup>157</sup>Butler M.A.; Iwasaki M.; Guengerich F.P.; Kadlubar F.F.; Human Cytochrome P-450PA (P-4501A2), the phenacetin O-deethylase is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines (aromatic-amines, heterocyclic amines carcinogen metabolism). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1989) 86, 7696-7700.
- <sup>158</sup>Shimada T.; Yamazaki H.; Mimura H.; Inui Y.; Guengerich F.P. Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens, and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1994) 270, 414-423.
- <sup>159</sup>Shah P.P.; Saurabh K.; Pant M. C.; Mathur N.; Parmara D. Evidence for increased cytochrome P450 1A1 expression in blood lymphocytes of lung cancer patients. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (2009) 670, 74-78.
- <sup>160</sup>Miyamoto M.; Umetsu Y.; Dosaka-Akita H.; Sawamura Y.; Yokota J.; Kunitoh H.; Nemoto N.; Sato K.; Ariyoshi N.; Kamataki T. CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1999) 261, 658-660.

- 
- <sup>161</sup>Shimada, T.M.; Iwasaki, M.; Martin, M.V.; Guengerich, F.P. Human liver microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by amu gene response in *Salmonella typhimurium* TA1535/Psk 1002. *Cancer Research* (1989) 49, 3218-3228.
- <sup>162</sup>Raza H.; King R.S.; Squires R.B.; Guengerich F.P.; Miller D.W.; Freeman J.P.; Lang N.P.; Kadlubar F.F. Metabolism of 2-amino- $\alpha$ -carboline. A food-borne heterocyclic amine mutagen and carcinogen by human and rodent liver microsomes and by human cytochrome P450 1A2. *Drug Metabolism and Disposition* (1996) 24, 395-400.
- <sup>163</sup>Androutsopoulos V.P.; Papakyriakou A.; Vourloumis D.; Tsatsakis A.M.; Spandidos D. A. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacology and Therapeutics* (2010) 126, 9-20.
- <sup>164</sup>Androutsopoulos V.P.; Tsatsakis A.M.; Spandidos D.A. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer* (2009) 9, 1471-2407.
- <sup>165</sup>Cui J.; Li S. Inhibitors and prodrugs targeting CYP1: A novel approach in cancer prevention and therapy. *Current Medicinal Chemistry* (2014) 21, 519-552.
- <sup>166</sup>Badal S.; Delgoda R. Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention. *Journal of Applied Toxicology* (2014) 34, 743-753.
- <sup>167</sup>Baer-Dubowska W.; Szaefer H. Modulation of carcinogen-metabolizing cytochromes P450 by phytochemicals in humans. *Experts Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* (2013) 9, 927-941.
- <sup>168</sup>Ungemach F.; Di Pierro M.; Weber R.; Cook J.M. Stereospecific synthesis of *trans*-1,3-disubstituted-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline. *Journal of Organic Chemistry* (1981) 46, 164-168.
- <sup>169</sup>Xiao S.; Lu X.; Shi X.; Sun Y.; Liang L.; Yu X.; Dong J. Synthesis of chiral 1,3-disubstituted tetrahydro- $\beta$ -carbolines via CIAT process: Highly stereoselective Pictet-Spengler reaction of D-Tryptophan ester hydrochlorides with various aldehydes. *Tetrahedron-Asymmetry* (2009) 20, 430-439.
- <sup>170</sup>Saha B.; Sharma, S.; Sawant, D.; Kundu, B. Water as an efficient medium for the synthesis of tetrahydro- $\beta$ -carbolines via Pictet-Spengler reactions. *Tetrahedron Letters* (2007) 48, 1379-1383.
- <sup>171</sup>Brossi A.; Focella A.; Teitel S. Alkaloids in mammalian tissues: Condensation of L-Tryptophan and L-5-hydroxytryptophan with formaldehyde and acetaldehyde. *Journal of Medicinal Chemistry* (1973) 16, 418-420.
- <sup>172</sup>Snyder H.R.; Hansch C.H., Katz L., Parmerter S.M., Spaeth E.C. The synthesis of derivatives of  $\beta$ -carboline; syntheses from DL-tryptophan and aldehydes. *Journal of the American Chemical Society* (1948) 70, 219-221.
- <sup>173</sup>McElvain S.M., Berger R. S. Piperidine derivatives. XXVII. The condensation of 4-piperidones and piperidinols with phenols. *Journal of the American Chemical Society* (1955) 77, 2848-2852.
- <sup>174</sup>Wang X.; Geng Y.; Wang D.; Shi X.; Liu J. Separation and purification of harmine and harmaline from *Peganum harmala* using pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Separation Science* (2008) 31, 3543-3447.
- <sup>175</sup>Herraiz T.; Guillén H.; Arán V.J. Oxidative metabolism of the bioactive and naturally occurring  $\beta$ -carboline alkaloids, norharman and harman, by human cytochrome P450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology* (2008) 21, 2172-2180.
- <sup>176</sup>Schott Y.; Decker M.; Rommelspacher H.; Lehmann J. 6-Hydroxy- and 6-methoxy- $\beta$ -carbolines as acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors. *Medicinal Chemistry Letters* (2006) 16, 5840-5843.
- <sup>177</sup>Rocca P.; Marsais F.; Godard A.; Quieguiner G. Carbolines. Part VII. Anisidines, convenient tools to synthesize hydroxy- $\beta$ -carbolines. *Journal of Heterocyclic Chemistry* (1995) 32, 1171-1175.
- <sup>178</sup>Ishiyama H.; Ohshita K.; Abe T.; Nakata H.; Kobayashi J. Synthesis of eudistomin D analogues and its effects on adenosine receptors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (2008) 16, 3825-3830.

- 
- <sup>179</sup>Dodd R.H.; Ouannes C.; Decarvalho L.P.; Valin A.; Venault P.; Chapouthier G.; Rossier J.; Potier P. 3-Amino- $\beta$ -carboline derivatives and the benzodiazepine receptor. Synthesis of a selective antagonist of the sedative action of diazepam. *Journal of Medicinal Chemistry* (1985) 28, 824-828.
- <sup>180</sup>Allen M.S.; Hagen T.J.; Trudell M.L.; Coddling P.W.; Skolnick P.; Cook J.M. Synthesis of novel 3-substituted  $\beta$ -carbolines as benzodiazepine receptor ligands. Probing the benzodiazepine receptor pharmacophore. *Journal of Medicinal Chemistry* (1988) 31, 1854-1861.
- <sup>181</sup>Kursukar R.S.; Goswami S.K. Efficient one-pot synthesis of anti-HIV and anti-tumour  $\beta$ -carbolines. *Tetrahedron* (2004) 60, 5315-5318.
- <sup>182</sup>Booth R.G.; Trevor A.; Singer T.P.; Castagnoli Jr. N. Studies on semirigid tricyclic analogs of the nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Journal of Medicinal Chemistry* (1989) 32, 473-477.
- <sup>183</sup>Almira Correia M. Human and rat liver cytochromes P450: functional markers, diagnostic inhibitors probes, and parameters frequently used in P450 studies. In: *Cytochrome P450. Structure, mechanism and biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Ortiz de Montellano, P.R. Ed. Kluwer Acad. (2005) 619-657.
- <sup>184</sup>Tracy T.S. Enzyme kinetics. In: *Drug metabolism in drug design and development*. Zhang, D.; Zhu, M.; Humphreys W.G. Eds. Wiley (2008) 89-112.
- <sup>185</sup>Guillén H.; Curiel J.A.; Landete J.M.; Muñoz R.; Herraiz T. Characterization of a nitroreductase with selective nitroreduction properties in the food and intestinal lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009) 57, 10457-10465.
- <sup>186</sup>Rodríguez J.; Olea-Azar C.; Barriga G.; Folch C.; Gerpe A.; Cerecetto H.; González M. Comparative spectroscopic and electrochemical study of nitroindazoles: 3-alcoxy, 3-hidroxy and 3-oxo derivatives. *Spectrochimica Acta part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (2008) 70, 557-563.
- <sup>187</sup>Olea-Azar CAzarC.; Cerecetto H.; Gerpe A.; González M.; Arán V.J.; Rigol C.; Opazo L. ESR and electrochemical study of 5-nitroindazole derivatives with antiprotozoal activity. *Spectrochimica Acta Part A*. (2005) 63, 36-42.
- <sup>188</sup>Arán V.J.; Ochoa C.; Boiani L.; Buccino P.; Cerecetto H.; Gerpe A.; González M.; Montero D.; Nogal J.J.; Gómez-Barrio A.; Azqueta A.; López de Ceráin A.; Piro O.E.; Castellano E.E. Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (2005) 13, 3197-3207.
- <sup>189</sup>Gherzi-Egea J.F.; Maupoil V.; Ray D.; Rochette L. Electronic spin resonance detection of superoxide and hydroxyl radicals during the reductive metabolism of drugs by rat brain preparations and isolated cerebral microvessels. *Free Radical Biology and Medicine* (1998) 24, 1074-1081.
- <sup>190</sup>Sinha B.K.; Singh Y.; Krishna G. Formation of superoxide and hydroxyl radicals from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>): reductive activation by NADPH cytochrome P450 reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1986) 135, 583-588.
- <sup>191</sup>Rodríguez J.; Arán V.J.; Boiani L.; Olea-Azar C.; Lavaggi M.L.; González M.; Cerecetto H.; Maya J.D.; Carrasco-Polo C.; Speisky Cosoy H. Study of 5-nitroindazoles anti-*Trypanosoma cruzi* mode of action: Electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2009) 44, 1545-1553.
- <sup>192</sup>Rodríguez J.; Arán V.J.; Boiani L.; Olea-Azar C.; Lavaggi M.L.; González M.; Cerecetto H.; Maya J.D.; Carrasco-Pozo C.; Speisky Cosoy H. New potent 5-nitroindazole derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Synthesis, biological evaluation, and mechanism of action studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (2009) 17, 8186-8196.
- <sup>193</sup>Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Analytical Biochemistry* (1984) 142, 290-296.
- <sup>194</sup>Azzi A.; Montecucco C.; Richter C. The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1975) 22, 597-603.

- 
- <sup>195</sup>Frank D.M.; Arora P.K.; Blumer J.L.; Sayre L.M. Model study of the bioreduction of paraquat, MPP<sup>+</sup>, and analogs. Evidence against a "redox cycling" mechanism in MPTP neurotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1987) 147, 1095-1104.
- <sup>196</sup>Passarotti M.; Valenti M.; Grianti. Dextrophan Note II: preparation of dextrophan citrate. *Bollettino Chimico Farmaceutico* (1993) 132, 475-477.
- <sup>197</sup>Bauer E.; Guo Z.; Ueng Y.; Bell L.C.; Zeldin D.; Guengerich F.P. Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Research in Toxicology* (1996) 8, 136-142.
- <sup>198</sup>Cheng Y.C.; Prusoff W.H. Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* (1973) 22, 3099-3108.
- <sup>199</sup>Herraiz T.; Galisteo J. Naturally-occurring tetrahydro- $\beta$ -carboline alkaloids derived from tryptophan are oxidized to bioactive  $\beta$ -carboline alkaloids by heme peroxidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2014) 451, 42-47.
- <sup>200</sup>Bernal M.L.; Sinues B.; Johansson I. Ten percent of North Spanish individuals carry duplicated or triplicated CYP2D6 genes associated with ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Pharmacogenetics* (1999) 9, 657-660.
- <sup>201</sup>Agúndez J.A.G.; Ledesma M.C.; Ladero J.M.; Benitez J. Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* (1995) 57, 265-269.
- <sup>202</sup>Aklillu E.; Persson I.; Bertilsson L.; Johansson I.; Rodriguez F.; Ingelman-Sundberg M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1996) 278, 441-446.
- <sup>203</sup>McLellan R.A.; Oscarson M.; Seidegård J.E.; Evans D.A.P.; Ingelman-Sundberg M. Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics* (1997) 7, 187-191.
- <sup>204</sup>Johansson I.; Oscarson M.; Yue Q.Y.; Bertilsson L.; Sjöqvist F.; Ingelman-Sundberg M. Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Molecular Pharmacology* (1994) 46, 452-459.
- <sup>205</sup>Zanger U.M.; Raimundo S.; Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics and biochemistry. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (2004) 369, 23-37.
- <sup>206</sup>Yu A.M.; Idle J.R.; Herraiz T.; Küpfer A.; Gonzalez F.P. Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamine O-demethylase. *Pharmacogenetics* (2003) 13, 307-319.
- <sup>207</sup>Rowland P.; Blaney F.E.; Smyth M.G.; Jones J.J.; Leydon V.R.; Oxbrow A.K.; Lewis C.J.; Tennant M.G.; Modi S.; Eggleston D.S.; Chenery R.J.; Bridges A.M. Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *Journal of Biological Chemistry* (2006) 281, 7614-7622.
- <sup>208</sup>Beck O.; Jernstrom B.; Martinez M.; Repke D.B. In vitro study of the aromatic hydroxylation of 1-methyltetrahydro- $\beta$ -carboline (methtryptoline) in rat. *Chemico-Biological Interactions* (1988) 65, 97-106.
- <sup>209</sup>Rollema H.; Booth R.G.; Castagnoli N. *In vivo* dopaminergic neurotoxicity of the 2- $\beta$ -methylcarbolinium ion, a potential endogenous MPP<sup>+</sup> analog. *European Journal of Pharmacology* (1988) 153, 131-134.
- <sup>210</sup>Mann A.; Tyndale R.F. Cytochrome P450 2D6 enzyme neuroprotects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in SH-SY5Y neuronal cells. *European Journal of Neuroscience* (2010) 31, 1185-1193.
- <sup>211</sup>Mann A.; Miksys S.; Lee A.; Mash D.C.; Tyndale R.F. Induction of the drug metabolizing enzyme CYP2D in monkey brain by chronic nicotine treatment. *Neuropharmacology* (2008) 55, 1147-1155.

- 
- <sup>212</sup>Mann A.; Miksys S.L. Gaedigk A.; Kish S.J.; Mash D.C.; Tyndale R.F. The neuroprotective enzyme CYP2D6 increases in the brain with age and is lower in Parkinson's Disease patients. *Neurobiology of Aging* (2012) 33, 2160-2171.
- <sup>213</sup>Elbaz A.; Levecque C.; Clavel J.; Vidal J.S.; Richard F.; Amouyel P.; Alperovitch A.; Chartier-Harlin M.C.; Tzourio C. CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure and Parkinson's Disease. *Annals of Neurology* (2004) 55, 430-434.
- <sup>214</sup>Langston J.W.; Irwin I.; Langston E.B.; Forno L.S. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neuroscience Letters* (1984) 48, 87-92.
- <sup>215</sup>Di Monte D.A.; Wu E.Y.; Irwin I.; Delaney L.E.; Langston J.W. Biotransformation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in primary cultures of mouse astrocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1991) 258, 594-600.
- <sup>216</sup>Jackson-Lewis V.; Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's Disease. *Nature Protocols* (2007) 2, 141-151.
- <sup>217</sup>Collins M.A.; Neafsey E.J. Potential neurotoxic "agents provocateurs" in Parkinson's Disease, *Neurotoxicology and Teratology* (2002) 24, 571-577.
- <sup>218</sup>Collins M.A.; Neafsey E.J.; Matsubara K.; Cobuzzi R.J.; Rollema H. Indole-N-methylated  $\beta$ -carbolinium ions as potential brain bioactivated neurotoxins. *Brain Research* (1992) 570, 154-160.
- <sup>219</sup>Collins M.A.; Neafsey E.J.; Matsubara K.; Cobuzzi R.J.; Albores R.; Fields J.; Rollema H. Indole-N-Methylation of  $\beta$ -carbolines: The brains bioactivation route to toxins in Parkinsons-Disease. *Annals of New York Academy of Sciences* (1992) 648, 263-265.
- <sup>220</sup>Matsubara K.; Collins M.A.; Neafsey E.J. Mono-N-methylation of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolines in brain cytosol. Absence of indole methylation. *Journal of Neurochemistry* (1992) 59, 505-510.
- <sup>221</sup>Matsubara K.; Neafsey E.J., Collins M.A. Novel S-adenosylmethionine-dependent Indole-N-methylation of  $\beta$ -carbolines in brain particulate fractions. *Journal of Neurochemistry* (1992) 59, 511-518.
- <sup>222</sup>Lorenc-Koci E.; H. Rommelspacher H.; Schulze G.; Wernicke C.; Kuter K.; Smialowska M.; Wieronska J.; Zieba B.; Ossowska K. Parkinson's Disease-like syndrome in rats induced by 2,9-dimethyl- $\beta$ -carbolinium ion, a  $\beta$ -carboline occurring in the human brain. *Behavioural Pharmacology* (2006) 17, 463-473.
- <sup>223</sup>Pavlovic S.; Schulze G.; Wernicke C.; Bonnet R.; Gille G.; Badiali L.; Kaminska A.; Lorenc-Koci E.; Ossowska K.; Rommelspacher H. 2,9-Dimethyl- $\beta$ -carbolinium, a neurotoxin occurring in human brain, is a potent inducer of apoptosis as 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Neuroscience* (2006) 139, 1525-1537.
- <sup>224</sup>Rommelspacher H.; Wernicke C.; Lehmann J.  $\beta$ -Carbolines: occurrence, biosynthesis and biodegradation. In *Isoquinolines and  $\beta$ -carbolines as neurotoxins and neuroprotectants. New vistas in Parkinson's Disease therapy.* Antkiewicz-Michaluk, L.; Rommelspacher, H. eds. Springer (2012), 105-113.
- <sup>225</sup>Matsubara K. N-Methyl- $\beta$ -carbolinium neurotoxins in Parkinson's Disease. In *Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and related disorders*, Kluwer Acad. Plenum Publ. New York (2000) 131-143.
- <sup>226</sup>Matsubara K. Occurrence of neurotoxic  $\beta$ -carbolinium cations in mammalian central nervous system. *Biogenic Amines* 12 (1996) 161-169.
- <sup>227</sup>Heikkila R.E.; Kindt M.V.; Sonsalla P.K.; Giovanni A.; Youngster S.; McKeown K.A.; Singer T.P. Importance of monoamine oxidase a in the bioactivation of neurotoxic analogs of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1988) 85, 6172-6176.
- <sup>228</sup>Coleman T.; Ellis S.W.; Martin I.J.; Lennard M.S.; Tucker G. T. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is N-demethylated by cytochromes P450 2D6, 1A2 and 3A4. Implications for susceptibility to Parkinson's Disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 277 (1996) 277, 685-690.

- 
- <sup>229</sup>Perry T.L.; Jones K.; Hansen S.; Wall R.A. 4-Phenylpyridine and 3 other analogs of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine lack dopaminergic nigrostriatal neurotoxicity in mice and marmosets. *Neuroscience* (1987) 75, 65-70.
- <sup>230</sup>Perry T.L.; Yong v.W.; Wall R.A.; Jones K. Paraquat and two endogenous analogs of the neurotoxic substance N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine do not damage dopaminergic nigrostriatal neurons in the mouse, *Neuroscience Letters* (1986) 69, 285-289.
- <sup>231</sup>Gilham D.E.; Cairns W.; Paine M.J.I.; Modi S.; Poulosom R.; Roberts G.C.K.; Wolf C.R. Metabolism of MPTP by cytochrome P4502D6 and the demonstration of 2D6 mRNA in human foetal and adult brain by in situ hybridization, *Xenobiotica* (1997) 27,111-125.
- <sup>232</sup>Modi S.; Gilham D.E.; Sutcliffe M.J.; Lian L.Y.; Primrose W.U.; Wolf C.R.; Roberts G.C.K. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as a substrate of cytochrome P450 2D6: allosteric effects of NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry* (1997) 36, 4461-4470.
- <sup>233</sup>Matoh N.; Tanaka S.; Takehashi M.; Banasik M.; Stedeford T. Overexpression of CYP2D6 attenuates the toxicity of MPP<sup>+</sup> in actively dividing and differentiated PC12 cells. *Gen Expression* (2003) 11, 117-124.
- <sup>234</sup>Bajpai P.; Sangar M.C.; Singh S.; Tang W.G.; Bansal S.; Chowdhury G.; Cheng Q.; Fang J.K.; Martin M.V.; Guengerich F.P.; Avadhani N.G. Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by mitochondrion-targeted cytochrome P450 2D6. Implications in Parkinson Disease. *Journal of Biological Chemistry* (2013) 288, 4436-4451.
- <sup>235</sup>Herraiz T.  $\beta$ -Carbolines as neurotoxins. In: Isoquinolines and  $\beta$ -carbolines as neurotoxins and neuroprotectants. New vistas in Parkinson's Disease therapy. Antkiewicz-Michaluk, L.; Rommelspacher, H. Eds. Springer (2012), 77-103.
- <sup>236</sup>Shimada T.; Yamazaki H.; Foroozesh M.; Hopkins N.E.; Alworth W.L.; Guengerich F.P. Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chemical Research in Toxicology* (1998) 11, 1048-1056.
- <sup>237</sup>Herraiz T.; Galisteo J. Hydroxyl radical reactions and the radical scavenging activity of  $\beta$ -carboline alkaloids. *Food Chemistry* (2015) 172, 640-649.
- <sup>238</sup>El Gendy M.A.M.; El-Kadi A.U.S.; Harman induces CYP1A1 enzyme through an aryl hydrocarbon receptor mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology* (2010) 249, 55-64.
- <sup>239</sup>Shimada T.; Guengerich F.P. Inhibition of human cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1 mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemical Research in Toxicology* (2006) 19, 288-294.
- <sup>240</sup>Nagao M.; Yahagi T.; Honda M.; Seino Y.; Matsushima T.; Sugimura T. Demonstration of mutagenicity of aniline and O-toluidine by norharman. *Proceedings of the Japan Academy Serie B* (1977) 53, 34-37.
- <sup>241</sup>Levitt R.C.; Legraverend C.; Nebert D. W.; Pelkonen O. Effects of harman and norharman on the mutagenicity and binding to DNA of benzo[a]pyrene metabolites in vitro and on aryl hydrocarbon hydroxylase induction in cell culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1977) 79, 1167-1175.
- <sup>242</sup>Callaway J.C.; Brito G.S.; Neves E.S. Phytochemical analyses of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*. *Journal of Psychoactive Drugs* (2005) 37, 145-150.
- <sup>243</sup>Farouk L.; Laroubi A.; Aboufatima R.; Benharref A.; Chait A. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala L.*: Possible mechanisms involved. *Journal of Ethnopharmacology* (2008) 115, 449-454.
- <sup>244</sup>Shahverdi A.R.; Ostad, S.N.; Khodae S.; Bitarafan L.; Monsef-Esfahani, H.R.; Jamalifar H.; Nikavar B.; Mohseni M. Antimicrobial and cytotoxicity potential of *Peganum harmala* smoke. *Pharmacognosy Magazine* (2008) 4, 236-240.

- 
- <sup>245</sup>Callaway J.C.; McKenna D.J.; Grob C.S.; Brito G.S.; Raymon L.P.; Poland R.E.; Andrade E.N.; Andrade E.O.; Mash D.C. Pharmacokinetics of ayahuasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology* (1999) 65, 243-256.
- <sup>246</sup>Drung B.; Scholz C.; Barbosa V.A.; Nazari A.; Sarragiotta M.H.; Schmidt B. Computational and experimental evaluation of the structure/activity relationship of  $\beta$ -carbolines as DYRK1A inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* (2014) 24, 4854-4860.
- <sup>247</sup>Mahmoudian M.; Jalilpour H.; Salehian P. Toxicity of *Peganum harmala*: review and a case report. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* (2002) 1, 1-4.
- <sup>248</sup>Zhao T.; Zheng S.S.; Zhang B.F.; Li Y.Y.; Bligh S.W.A.; Wang C.H.; Wang, Z.T. Metabolic pathways of the psychotropic  $\beta$ -carboline alkaloids, harmaline and harmine, by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy. *Food Chemistry* (2012) 134, 1096-1105.
- <sup>249</sup>Nakagawa Y.; Suzuki T.; Ishii H.; Ogata A.; Nakae D. Mitochondrial dysfunction and biotransformation of  $\beta$ -carboline alkaloids, harmine and harmaline, on isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* (2010) 188, 393-403.
- <sup>250</sup>Yu A.M.; Idle J.R.; Krausz K.W.; Kupfer A.; Gonzalez F.J. Contribution of individual cytochrome P450 isozymes to the O-demethylation of the psychotropic  $\beta$ -carboline alkaloids harmaline and harmine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2003) 305, 315-322.
- <sup>251</sup>Tweedie D.J.; Burke M.D. Metabolism of the  $\beta$ -carbolines, harmine and harmol, by liver microsomes from phenobarbitone or 3-methylcholanthrene treated mice: identification and quantitation of two novel harmine metabolites. *Drug Metabolism and Disposition* (1987) 15, 74-81.
- <sup>252</sup>Wu C.; Jiang X.L.; Shen H.W.; Yu A.M. Effects of CYP2D6 status on harmaline metabolism, pharmacokinetics and pharmacodynamics, and a pharmacogenetics-based pharmacokinetic model. *Biochemical Pharmacology* (2009) 78 617-624.
- <sup>253</sup>Kivistd K.T.; Ulrich Griese E.; Stuvén T; Fritz P; Friedel G.; Kroemer Heyo K.; Zanger U.M. Analysis of CYP2D6 expression in human lung: implications for the association between CYP2D6 activity and susceptibility to lung cancer. *Pharmacogenetics* (1997) 7, 295-302.
- <sup>254</sup>Miksýs S.; Rao Y.; Hoffmann E.; Mash D.C; Tyndale R.F. Regional and cellular expression of CYP2D6 in human brain: higher levels in alcoholics. *Journal of Neurochemistry* (2002) 82, 1376-1387.
- <sup>255</sup>Osman A.M; Van Noort P.M.C. Activation of paraquat in the earthworm *Allolobophora chlorotica* is mediated by NAD(P)H-cytochrome c reductase activities. *Pesticide Biochemistry and Physiology* (2004) 79, 101-110.
- <sup>256</sup>Bonneh-Barkay D.; Reaney S.H; Langston W.J.; Di Monte D.A. Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Molecular Brain Research* (2005) 134, 52-56.
- <sup>257</sup>Franco R.; Li S.; Rodriguez-Rocha H.; Burns M.; Panayiotidis M.I. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: relevance to Parkinson's Disease. *Chemico-Biological Interactions* (2010) 188, 289-300.
- <sup>258</sup>De Almeida R.M, Yonamine M. Enzymatic-spectrophotometric determination of paraquat in urine samples: a method based on its toxic mechanism. *Toxicology Mechanisms and Methods* (2010) 20, 424-427.
- <sup>259</sup>Halliwell B; Gutteridge J. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4<sup>th</sup> ed. Oxford (2003).
- <sup>260</sup>Cochemé H.M.; Murphy M.P. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *Journal of Biological Chemistry* (2008) 283, 1786-1798.
- <sup>261</sup>Klaidman L.K.; Adams Jr. J.D.; Leung A.C.; Kim S.S.; Cadenas E. Redox cycling of MPP<sup>+</sup>: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radical Biology and Medicine* (1993) 15, 169-179.

- 
- <sup>262</sup>Lambert C.E.; Bondy S.C. Effects of MPTP, MPP<sup>+</sup> and paraquat on mitochondrial potential and oxidative stress. *Life Science* (1989) 44, 1277-1284.
- <sup>263</sup>Perry T.L.; Yong V.W.; Clavier R.M.; Jones K.; Wright J.M.; Foulks J.G.; Wall R.A. Partial protection from the dopaminergic neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by four different antioxidants in the mouse. *Neuroscience Letters* (1985) 30, 109-114.
- <sup>264</sup>Di Monte D.; Sandy M.S.; Ekström G.; Smith M.T. Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) cytotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1986) 137, 303-309.
- <sup>265</sup>Bernardo A.R.; Stoddart J.F.; Kaifer A.E. Cyclobis(paraquat-p-phenylene) as a synthetic receptor for electron-rich aromatic compounds: electrochemical and spectroscopic studies of neurotransmitter binding. *Journal of the American Chemical Society* (1992) 114, 10624-10631.
- <sup>266</sup>Lopes I.; Souza D.; Machado S.; Tanaka A. Voltammetric detection of paraquat pesticide on a phthalocyanine-based pyrolytic graphite electrode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2007) 388, 1907-1914.
- <sup>267</sup>Simoës F.R.; Vaz C.M.P.; Brett C.M.A. Electrochemical detection of the pesticide paraquat by batch injection analysis. *Analytical Letters* (2007) 40, 1800-1810.
- <sup>268</sup>Sayre L.M. Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicology Letters* (1989) 48, 121-149.
- <sup>269</sup>Gherzi-Egea J.F.; Maupoil V.; Ray D.; Rochete L. Electronic spin resonance detection of superoxide and hydroxyl radicals during the reductive metabolism of drugs by rat brain preparations and isolated cerebral microvessels. *Free Radical Biology and Medicine* (1998) 24, 1074-1081.
- <sup>270</sup>Akiyama S.; Kubota S.; Ikegami Y. Monomer-dimer equilibrium and photochemical behaviors of the 1-methyl-4-phenylpyridinyl radical. *Chemistry Letters* (1981) 4, 469-472.
- <sup>271</sup>Boersma M.G.; Balvers W.G.; Boeren S.; Vervoort J.; Rietjens I.M. NADPH-cytochrome reductase catalysed redox cycling of 1,4-benzoquinone; hampered at physiological conditions, initiated at increased pH values. *Biochemical Pharmacology* (1994) 47, 1949-1955.
- <sup>272</sup>Afanasev I.B.; Korkina L.G.; Suslova T.B.; Soodaeva S.K. Are quinones producers or scavengers of superoxide ion in cells? *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1990) 281, 245-250.
- <sup>273</sup>Livertoux M.H.; Lagrange P.; Minn A. The superoxide production mediated by the redox cycling of xenobiotics in rat brain microsomes is dependent on their reduction potential. *Brain Research* (1996) 725, 207-216.
- <sup>274</sup>Mitsumoto A.; Nagano T.; Hirobe M. Toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium derivatives in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1992) 296, 482-488.
- <sup>275</sup>Yamakazi I.; Piette L.H. The new mechanism of aerobic oxidase reaction catalyzed by peroxidase. *Biochimica and Biophysica Acta* (1963) 3; 47-64.
- <sup>276</sup>Gherzi-Egea J.F.; Livertoux M.H.; Minn A.; Perrin R.; Siest G. Enzyme mediated superoxide radical formation initiated by exogenous molecules in rat brain preparations. *Toxicology and Applied Pharmacology* (1991) 110, 107-117.
- <sup>277</sup>Hasegawa E.; Takeshige K.; Oishi T.; Murai Y.; Minakami S. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1990) 170, 1049-1055.
- <sup>278</sup>Smith M.T.; Ekstrom G.; Sandy M.S.; Di Monte D. Studies on the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine cytotoxicity in isolated hepatocytes. *Life Science* (1987) 40, 741-748.

- 
- <sup>279</sup>Nicklas W.J.; Vyas I.; Heikkila R.E. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Life Science* (1985) 36, 2503-2508.
- <sup>280</sup>Moura D.J.; Richter M.F.; Boeira J.M.; Henriques J.A.P.; Saffi J. Antioxidant properties of  $\beta$ -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis* (2007) 22, 293-302.
- <sup>281</sup>Delgado M.E.; Haza A.I.; Arranz N.; Garcia A.; Morales P. Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo[a]pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines in HepG2 human hepatoma cells. *European Journal of Nutrition* (2008) 47, 479-490.
- <sup>282</sup>Zhai S.; Dai R.; Friedman F.K.; Vestal R.E. Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metabolism and Disposition* (1998) 26, 989-992.
- <sup>283</sup>Aimová D.; Stiborová M. Antitumor drug ellipticine inhibits the activities of rat hepatic cytochromes P450. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czech Rep.* (2005) 149, 437-440.
- <sup>284</sup>Romero A.; Ramos E.; Castellano V.; Martinez M.A.; Ares I.; Martinez M.; Martinez-Larrañaga M.R.; Anadón A. Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. *Toxicology in Vitro* (2012) 26, 823-830.
- <sup>285</sup>Yuan R.; Madani S.; Wei X.; Reynolds K.; Huang S. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry in vitro drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition* (2002) 30, 1311-1319.
- <sup>286</sup>Schwarz D.; Roots I. In vitro assessment of inhibition by natural polyphenols of metabolic activation of procarcinogens by human CYP1A1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2003) 11, 902-907.
- <sup>287</sup>Schwarz D.; Kisselev P.; Roots I. CYP1A1 genotype-selective inhibition of benzo[a]pyrene activation by quercetin. *European Journal of Cancer* (2005) 41, 151-158.
- <sup>288</sup>Shimada T.; Murayama N.; Okada K.; Funae Y.; Yamazaki H.; Guengerich F.P. Different mechanisms of inhibition for human cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic inhibitors. *Chemical Research in Toxicology* (2007) 20, 489-496.
- <sup>289</sup>Shimada T.; Murayama N.; Tanaka K.; Takenaka S.; Imai Y.; Hopkins N.E.; Foroozesh M.K.; Alworth W.L.; Yamazaki H.; Guengerich F.P.; Komori M. Structure-function relationships of inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, and 3A4 by 33 flavonoid derivatives. *Chemical Research in Toxicology* (2010) 20, 1921-1935.
- <sup>290</sup>Haza A.I.; Morales P. Effects of (+)catechin and (-)epicatechin on heterocyclic amines-induced oxidative DNA damage. *Journal of Applied Toxicology* (2011) 31, 53-62.
- <sup>291</sup>Bauer E.; Guo Z.; Ueng Y.; Campana L.C.L.C.; Zeldin D.; Guengerich F.P. Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology* (1995) 8, 136-142.
- <sup>292</sup>Selkirk J.K.; Croy R.G.; Roller P.P.; Gelboin H.V. High-pressure liquid chromatographic analysis of benzo[a]pyrene metabolism and covalent binding and the mechanism of action of 7,8-benzoflavone and 1,2-epoxy-3,3,3-trichloropropane. *Cancer Research* (1974) 34, 3474-3480.
- <sup>293</sup>Sugimura T. Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process. *Mutation Research* (1985) 150, 33-41.
- <sup>294</sup>Turesky R.J.; Constable A.; Richoz J.; Varga N.; Markovic J.; Martin M.V.; Guengerich F.P. Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. *Chemical Research in Toxicology* (1998) 11, 925-936.
- <sup>295</sup>Frederiksen H. Two food-borne heterocyclic amines: metabolism and DNA adduct formation of amino- $\alpha$ -carbolines. *Molecular Nutrition and Food Research* (2005) 49, 263-273.

- <sup>296</sup>Frederiksen H.; Frandsen H. In vitro metabolism of two heterocyclic amines, 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (A( $\alpha$ )C) and 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeA( $\alpha$ )C) in human and rat hepatic microsomes. *Pharmacology and Toxicology* (2002) 90, 127-134.
- <sup>297</sup>Turesky R.J.; Bendaly J.; Yasa I.; Doll M.A.; Hein D.W. The impact of NAT2 acetylator genotype on mutagenesis and DNA adducts from 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole. *Chemical Research in Toxicology* (2009) 22, 726-733.
- <sup>298</sup>Smith D.A. Properties of cytochrome P450 isoenzymes and their substrates part 2: properties of cytochrome P450 substrates. *Drug Discovery Today* (1997) 2, 479-486.
- <sup>299</sup>Sansen S.; Yano J.K.; Reynald R.L.; Schoch G.A.; Griffin K.J.; Stout C.D.; Johnson E.F. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *Journal of Biological Chemistry* (2007) 282, 14348-14355.
- <sup>300</sup>Vanthanathan P.; Taboureau O.; Oostenbrink C.; Vermeulen N.P.E, Olsen L.; Jørgensen F.S.F.S. Classification of Cytochrome P450 1A2 inhibitors and noninhibitors by machine learning techniques. *Drug Metabolism and Disposition* (2009) 37, 658-664.
- <sup>301</sup>Lautraite S.; Musonda A.C.; Doehmer J.; Edwards G.O.; Chipman J.K. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis* (2002) 17, 45-53.
- <sup>302</sup>Niwa T.; Yamazoe Y.; Kato R. Metabolic activation of 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole by rat-liver microsomes. *Mutation Research* (1982) 95, 159-170.
- <sup>303</sup>Stiborová M.; Poljaková J.; Martínková E.; Bořek-Dohalská L.; Eckschlager T.; Kizek R.; Frei E. Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines. A comparative study. *Interdisciplinary Toxicology* (2011) 4, 98-105.
- <sup>304</sup>Louis E.D.; Zheng W.; Jurewicz E.C.; Watner D.; Chen J.; Factor-Litvak P.; Parides M. Elevation of blood  $\beta$ -Carboline alkaloids in essential tremor. *Neurology* (2002) 59, 1940-1944.
- <sup>305</sup>De Meester C. Genotoxic potential of  $\beta$ -carbolines: A review. *Mutation Research* (1995) 339, 139-153.
- <sup>306</sup>Husbands S.M.; Glennon R.A.; Gogerat S.; Gough R.; Tyacke R.; Crosby J.; Nutt D.J.; Lewis J.W.; Hudson A.L.  $\beta$ -carboline binding to imidazoline receptors. *Drug Alcohol Dependence* (2001) 64, 203-208.
- <sup>307</sup>Lewis D.F.V.; Dickins M. Substrate SARs in human P450s. *Drug Discovery Today* (2002) 7, 918-925.
- <sup>308</sup>Kirton S.B.; Kemp C.A; Tomkinson N.P.; St.-Gallay S.; Sutcliffe M.J. Impact of incorporating the 2C5 crystal structure into comparative models of cytochrome P450 2D6. *Proteins Structure Function and Genetics* (2002) 49, 216-231.
- <sup>309</sup>Jos A.; Segner H.; Herradon B.; Repetto G.; Navas J.M. Induction of EROD activity by 1-phenylimidazole and  $\beta$ -naphthoflavone in rainbow trout cultured hepatocytes: A comparative study. *Toxicology in vitro* (2007) 21, 1307-1310.
- <sup>310</sup>Budavri S.; O'Neil M.J.; Smith A.; Heckelman P.E.; Kinneary J.F.; O'Neill M. The Merck index: An encyclopedia of chemicals drugs and biologicals (1996) 12<sup>th</sup> ed. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida (USA).
- <sup>311</sup>Jiang X.L.; Shen H.W.; Yu A.M. Potentiation of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine-induced hyperthermia by harmaline and the involvement of activation of 5-HT1A and 5-HT2A receptors. *Neuropharmacology* (2015) 89, 342-351.
- <sup>312</sup>Storch A.; Hwang Y.I.; Gearhart D.A.; Beach J.W.; Neafsey E.J.; Collins M.A.; Schwarz J. Dopamine transporter-mediated cytotoxicity of  $\beta$ -carbolinium derivatives related to Parkinson's Disease: relationship to transporter-dependent uptake. *Journal of Neurochemistry* (2004) 89, 685-694.
- <sup>313</sup>Matsubara K.; Aoyama K.; Suno M.; Awaya T. N-Methylation underlying Parkinson's Disease. *Neurotoxicology and Teratology* (2002) 24, 593-598.

- 
- <sup>314</sup> Neafsey E.J.; Drucker G.; Raikoff K.; Collins M.A. Striatal dopaminergic toxicity following intranigral injection in rats of 2-methyl-norharman, a  $\beta$ -carbolinium analog of N-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>). *Neuroscience Letters* (1989) 105, 344-349.
- <sup>315</sup> Cui J.H.; Li S.S. Inhibitors and prodrugs targeting CYP1: a novel approach in cancer prevention and therapy. *Current Medicinal Chemistry* (2014) 21, 519-55.
- <sup>316</sup> Ikken Y.; Morales P.; Martinez A.; Marin M.L.; Haza A.I.; Cambero M.I. Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1998) 47, 3257-3264.
- <sup>317</sup> Pruess-Schwartz D.; Sebti S.M.; Gilham P.T.; Baird W.M. Analysis of benzo[a]pyrene: DNA adducts formed in cells in culture by immobilized boronate chromatography. *Cancer Research* (1984) 44, 4104-4110.
- <sup>318</sup> Felton J.S.; Knize M.G. Heterocyclic amines. In: *Bioactive compounds in foods*. Ed. Gilbert, J.; Senyuva, H.Z. Blackwell Publishing (2008), 357-377.
- <sup>319</sup> Back Y.M.; Lee J.H.; Shin H.S.; Lee K.G. Analysis of heterocyclic amines and  $\beta$ -carbolines by liquid chromatography-mass spectrometry in cooked meats commonly consumed in Korea. *Food Additives and Contaminants Chemistry Part A* (2009) 26, 298-305.



---

## Resumen/Summary

*(Por normativa vigente en la Universidad Complutense de Madrid se presenta resumen en castellano e inglés).*

### 1. Introducción

Los compuestos bioactivos de los alimentos y las plantas suscitan gran interés por sus indudables efectos en la salud. Se mencionan habitualmente, entre otros, las vitaminas, los polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos, los carotenoides y la fibra dietética. Esta tesis surge del interés de nuestro laboratorio en un grupo distinto de compuestos bioactivos: los alcaloides indólicos  $\beta$ -carbolina. En estudios previos, el grupo ha estudiado la presencia de estos compuestos en alimentos y plantas, así como su actividad como antioxidantes e inhibidores enzimáticos<sup>1-5</sup>. Hasta ahora, sin embargo, poco se conoce sobre su biotransformación<sup>6-8</sup>. En esta memoria se aborda este aspecto y se describen los resultados obtenidos de una investigación dirigida a estudiar específicamente la biotransformación metabólica de los alcaloides indólicos  $\beta$ -carbolina presentes en alimentos y plantas.

Las  $\beta$ -carbolinas son heterociclos indólicos con un anillo tricíclico pirido[3,4-*b*]indol provisto de cierta diversidad molecular. Dependiendo del grado de saturación del anillo de piridina se dan: tetrahidro- $\beta$ -carbolinas ( $\text{th}\beta\text{c}_s$ ), dihidro- $\beta$ -carbolinas,  $\beta$ -carbolinas aromáticas ( $\beta\text{c}_s$ ) y cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta\text{c}^+$ ). Estos alcaloides aparecen en plantas y productos naturales y poseen amplia actividad biológica y farmacológica<sup>9</sup>. Por otro lado, se han encontrado moléculas de  $\text{th}\beta\text{c}_s$ ,  $\beta\text{c}_s$  y  $\beta\text{c}^+$  en los fluidos y tejidos biológicos de mamíferos, incluido humanos<sup>10</sup>. Estos resultados han estimulado las especulaciones sobre el papel y funcionalidad de estos alcaloides in vivo.

En los últimos años, investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio y en otros han revelado que estos compuestos se encuentran habitualmente en alimentos de diversa índole, origen (animal, vegetal, fermentados) y procesamiento<sup>11</sup>. Se producen a partir de triptófano e indoletilaminas por reacción con compuestos carbonílicos y alfa-cetoácidos. Algunos de estos alcaloides aparecen también en muestras ambientales tales como el humo del tabaco. Las  $\beta$ -carbolinas se absorben y se acumulan en los tejidos biológicos, por lo que su procedencia exógena (xenobióticos) debida a la ingesta de alimentos y plantas podría contribuir a la presencia de estos alcaloides in vivo y de paso también a su actividad biológica o tóxica.

Las  $\beta$ -carbolinas poseen un amplio espectro de actividad. Son sustancias neuroactivas, antitrombóticas, antiparasitarias, antivirales y antitumorales<sup>9 11</sup>. Su farmacología es variada, siendo una diana importante el sistema nervioso central (SNC). Algunas  $\beta$ -carbolinas son sustancias psicoactivas; son inhibidores de monoaminoxidasa (MAO) y kinasas, inhiben la captación de serotonina y se unen a receptores del SNC. Ejercen efectos hipotensores, modulan la ingesta de alimentos e inducen la secreción de insulina<sup>12</sup>. Las  $\beta$ -carbolinas aromáticas modifican los niveles de neurotransmisores produciendo efectos ansiolíticos y antidepresivos. Estas acciones se

---

relacionan con la inhibición de la enzima MAO. En nuestro laboratorio, se ha estudiado la actividad de las th $\beta$ c<sub>5</sub> y  $\beta$ c<sub>5</sub> aisladas de alimentos, tabaco y plantas sobre la enzima MAO, demostrándose que estos compuestos son potentes inhibidores<sup>2 5 13</sup>. Por otro lado, las  $\beta$ -carbolinas de alimentos y muestras biológicas son sustancias antioxidantes y secuestradores de radicales y podrían tener efectos protectores<sup>3 14</sup>.

Las  $\beta$ -carbolinas también ejercen efectos tóxicos<sup>11 15</sup>. Las th $\beta$ c<sub>5</sub> reaccionan con el nitrito presente en alimentos o en el propio organismo y forman *N*-nitroso-th $\beta$ c<sub>5</sub> y otros compuestos mutagénicos. En presencia de aminas aromáticas, las  $\beta$ -carbolinas son comutágenos. Esta acción se relaciona con su interacción con el ADN y está influida por las enzimas citocromo P450. Por otra parte, se les ha prestado mucha atención a estas sustancias como posibles neurotoxinas<sup>16-18</sup>. Las th $\beta$ c<sub>5</sub> y  $\beta$ c<sub>5</sub> se activan enzimáticamente formando cationes *N*-metil- $\beta$ -carbolinio ( $\beta$ c<sub>5</sub><sup>+</sup>)<sup>8</sup>, que inhiben la cadena respiratoria y provocan la muerte celular. Las th $\beta$ c<sub>5</sub> y los cationes  $\beta$ c<sub>5</sub><sup>+</sup> se consideran análogos con un puente de nitrógeno adicional, respectivamente, del 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y del catión MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridinio), que son neurotoxinas inductoras de Parkinsonismo<sup>19</sup>.

## 2. Hipótesis y objetivos.

Los efectos biológicos de las  $\beta$ -carbolinas presentes en alimentos y plantas dependerán de la actividad específica de cada una de estas sustancias pero también de su biotransformación. El sistema enzimático más importante en el metabolismo de xenobióticos son los citocromos P450. Son un conjunto de hemoproteínas que lleva a cabo la detoxificación pero también la activación molecular a nuevas especies reactivas tóxicas<sup>20</sup>. La participación de los citocromos P450 en los procesos toxicológicos ha llevado a distintos investigadores a proponer el uso de sustancias inhibidoras de estos citocromos para prevenir estos procesos (quimioprotectoras).

La actividad biológica o toxicidad de las th $\beta$ c<sub>5</sub> y  $\beta$ c<sub>5</sub> que aparecen en alimentos, plantas y tejidos biológicos, así como la de sus análogos tóxicos, *N*-metiltetrahidropiridinas, podría depender en gran medida de su comportamiento metabólico ante los citocromos P450. El principal propósito de esta tesis fue investigar el efecto de las enzimas del sistema citocromo P450 en el metabolismo y biotransformación de los compuestos  $\beta$ -carbolina y de sus análogos tóxicos derivados de tetrahidropiridina. El estudio se aplica a distintos compuestos entre los que se encuentran: tetrahidro- $\beta$ -carbolinas,  $\beta$ -carbolinas aromáticas, tetrahidropiridinas y cationes  $\beta$ -carbolinio y de piridinio.

Los objetivos de la tesis son: 1) Determinar y establecer las enzimas citocromo P450 que participan en la biotransformación de  $\beta$ -carbolinas; 2) Determinar los metabolitos formados y la eficacia de biotransformación; 3) Evaluar la reducción de los cationes  $\beta$ c<sub>5</sub><sup>+</sup> por la enzima citocromo P450 reductasa y su participación en la generación de especies reactivas de oxígeno; 4) Determinar la capacidad de inhibición de las  $\beta$ -carbolinas sobre los citocromos P450 y su comparación con antioxidantes fenólicos de alimentos.

---

### 3. Metodología experimental

Se han realizado: a) estudios de biotransformación metabólica *in vitro* utilizando ocho enzimas citocromo P450 humanas recombinantes sobre un total de 25 compuestos distintos pertenecientes a distintas subclases de  $\beta$ -carbolinas; b) estudios de biotransformación metabólica en presencia de inhibidores químicos selectivos; c) estudios con microsomas hepáticos; d) estudios de reducción enzimática de los cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+$ ) y de sus análogos tóxicos de piridinio por óxidorreductasas con el fin de observar la formación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y e) estudios sobre la inhibición *in vitro* de los citocromos P450 utilizando varios sustratos y sustancias tóxicas por  $\beta$ -carbolinas y sustancias antioxidantes.

Para el análisis y determinación de los metabolitos producidos en los ensayos de biotransformación se han empleado técnicas analíticas de alta resolución como HPLC con detección de DAD y fluorescencia y HPLC acoplada a espectrometría de masas. Para los estudios de reducción enzimática se han empleado técnicas de espectrofotometría, voltametría cíclica y resonancia de espín electrónico.

### 4. Resultados y discusión

#### A) Biotransformación de $\beta$ -carbolinas.

El estudio de los medios de biotransformación de  $\beta$ -carbolinas con enzimas citocromo P450 recombinantes demuestra la existencia de una notable biotransformación metabólica por citocromos P450 de las  $\beta$ -carbolinas presentes en alimentos y plantas en sus distintas formas y subestructuras. Se han detectado reacciones metabólicas de hidroxilación en el anillo bencénico y piridínico, *O*-desmetilación, *N*-oxidación, deshidrogenación aromática y reacciones de *N*-desmetilación. Se han determinado los metabolitos formados y la eficacia cinética de biotransformación. En cuanto a las enzimas citocromo P450 involucradas, se ha observado un cierto grado de solapamiento entre distintos citocromos, aunque no exento de cierta especificidad de éstos por algunos sustratos y biotransformaciones. Los resultados de biotransformación metabólica con citocromos P450 recombinantes se confirman utilizando microsomas hepáticos.

En su mecanismo de acción la biotransformación por citocromos P450 necesita de la enzima citocromo P450 reductasa. Sin embargo, esta reductasa utiliza por si misma algunos compuestos y tóxicos como sustratos y genera especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Utilizando técnicas espectrofotométricas, se confirma la generación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a partir del paraquat y la menadiona como controles positivos por acción de la citocromo P450 reductasa. A continuación, se aportan resultados sobre la reducción enzimática de los cationes  $\beta$ -carbolinio ( $\beta c^+$ ) y piridinio y generación del radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).

---

## B) Inhibición de los citocromos P450 por $\beta$ -carbolinas y antioxidantes.

Una vez demostrado que las  $\beta$ -carbolinas son sustratos de los citocromos P450, se estudia si estos compuestos inhiben estas enzimas. Para ello se evalúa la inhibición que producen las  $\beta$ -carbolinas y varios antioxidantes fenólicos de alimentos sobre los citocromos P450 2D6, P450 1A1 y P450 1A2 utilizando varios sustratos.

Los citocromos P450 1A1 y P450 1A2 activan mutágenos y carcinógenos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos y las aminas heterocíclicas aromáticas generadas en alimentos cocinados. Su inhibición podría suponer un mecanismo de quimioprevención. En la memoria se observó que el hidrocarburo benzo[a]pireno (B[a]P) y la amina heterocíclica aromática 2-amino- $\alpha$ -carbolina (A $\alpha$ C) se metabolizan por citocromos de la subfamilia 1A. Finalmente se presentan resultados sobre la acción de las  $\beta$ -carbolinas y de los antioxidantes presentes en alimentos en la biotransformación *in vitro* de B[a]P y A $\alpha$ C.

## 5. Conclusiones generales

- Los alcaloides bioactivos del tipo  $\beta$ -carbolina presentes en alimentos y plantas, y que se han detectado también en muestras biológicas, se metabolizan por las enzimas citocromos P450 humanas investigadas. Su biotransformación metabólica difiere entre las distintas subestructuras de  $\beta$ -carbolinas estudiadas tanto en lo que respecta a los metabolitos producidos como a los citocromos P450 específicos involucrados. Los resultados de biotransformación metabólica con citocromos P450 recombinantes se confirman en microsomas hepáticos humanos. Esta biotransformación puede afectar a su biodisponibilidad y a su posterior actividad y/o toxicidad.
- La biotransformación de th $\beta$ c<sub>s</sub> dio lugar a metabolitos de hidroxilación aromática y de *O*-desmetilación (derivados metoxilados). Las  $\beta$ c<sub>s</sub> aromáticas se biotransforman por reacciones de hidroxilación aromática con participación de los citocromos P450 de la subfamilia 1A. Las metoxi- $\beta$ c<sub>s</sub> (harmalina y harmina) se metabolizan por varios citocromos P450 para dar principalmente compuestos de *O*-desmetilación y los cationes  $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup> dan compuestos de hidroxilación.
- La enzima citocromo P450 2D6 es polimórfica y se produce una notable diferencia en la biotransformación de estas sustancias entre las variantes 2D6\*1 y 2D6\*10. El perfil metabólico de estos compuestos podría variar sustancialmente entre individuos debido al carácter polimórfico de éste citocromo.
- Los cationes tóxicos  $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup> y piridinio (MPP<sup>+</sup>) no generan el radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) vía reducción enzimática por la enzima citocromo P450 reductasa.
- Varias  $\beta$ -carbolinas fueron inhibidores moderados de los citocromos P450 1A1, P450 1A2 y P450 2D6. Por lo que respecta a los antioxidantes, se observó que galangina, apigenina, resveratrol,  $\alpha$ -naftoflavona y elipticina inhibieron estos citocromos.

---

- Las  $\beta_{c_s}$  no inhiben la biotransformación del hidrocarburo benzo[a]pireno (B[a]P) por citocromos. Los antioxidantes tampoco inhiben esta biotransformación con la excepción de  $\alpha$ -naftoflavona y elipticina. La harmina, galangina,  $\alpha$ -naftoflavona y la elipticina inhibieron la biotransformación de 2-amino- $\alpha$ -carbolina (A $\alpha$ C).

### Summary

Metabolic biotransformation and enzymatic inhibition of  $\beta$ -carboline alkaloids present in food and plants.

#### **1. Introduction**

The bioactive compounds from foods and plants are of current interest due to their effects on the human health. Vitamins, polyphenols, flavonoids and phenolic acids, carotenoids and dietary fiber are often mentioned among food bioactive compounds. This work arises from the interest of our laboratory in a different group of bioactive compounds: the  $\beta$ -carboline indole alkaloids. In previous studies, our group has studied the presence of these compounds in foods and plants as well as their activity as antioxidants and enzyme inhibitors<sup>1-5</sup>. So far, however, little is known about its metabolic biotransformation<sup>6-8</sup>. This issue is addressed in this study that reports experimental results from an investigation aimed at studying the metabolic biotransformation of  $\beta$ -carboline indole alkaloids present in food and plants.

$\beta$ -Carbolines alkaloids are heterocyclic compounds with a tricyclic pyrido [3,4-*b*] indole moiety provided with molecular diversity. Depending on the degree of saturation of the pyridine ring and substituents there are tetrahydro- $\beta$ -carbolines (th $\beta_{c_s}$ ), dihydro- $\beta$ -carbolines, aromatic  $\beta$ -carbolines ( $\beta_{c_s}$ ) and  $\beta$ -carbolinium cations ( $\beta_{c_s}^+$ ). These alkaloids occur in plants and natural products and exhibit an array of biological and pharmacological activities<sup>9</sup>. Furthermore, several th $\beta_{c_s}$ ,  $\beta_{c_s}$  and  $\beta_{c_s}^+$  molecules appear in biological fluids and tissues of mammals, including humans<sup>10</sup>. These results have encouraged speculation about a possible role and function of these alkaloids *in vivo*.

Research conducted in our laboratory and in others has shown that these compounds appear in foods of diverse nature, origin (animal, vegetable, fermented) and processing conditions<sup>11</sup>. They are produced by a reaction of tryptophan and indolethylamines with carbonyl compounds and  $\alpha$ -keto acids. In addition, some of these alkaloids also appear in environmental samples such as tobacco smoke. The  $\beta$ -carbolines are absorbed and accumulated in biological tissues, so its origin in those samples could be exogenous (xenobiotic) and the ingestion of foods and plants containing these compounds could contribute to the presence of these alkaloids *in vivo* and also to their biological or toxicological activities.

The  $\beta$ -carbolines exhibit a broad spectrum of activity. Substances of this class exhibit neuroactive, antitumor, antithrombotic, antimicrobial, antiparasitic, and antiviral properties<sup>9 11</sup>. They show a wide range of pharmacology, with the central

---

nervous systems (CNS) being an important target. Some  $\beta$ -carbolines are psychoactive substances, inhibit monoamine oxidase (MAO) and kinases, inhibit serotonin uptake and bind to CNS receptors. They exert hypotensive effects, can modulate food intake and induce insulin secretion<sup>12</sup>. The aromatic  $\beta$ -carbolines may alter neurotransmitter levels producing anxiolytic and antidepressant effects. These actions are related to the inhibition of monoamine oxidase (MAO). In our laboratory, we have studied the activity of th $\beta$ c<sub>s</sub> and  $\beta$ c<sub>s</sub> isolated from foods and plants on MAO enzymes, showing that these compounds are potent inhibitors<sup>2 5 13</sup>. Furthermore,  $\beta$ -carbolines present in foods and biological samples are antioxidants and radical scavengers and may have protective effects<sup>3 14</sup>.

The  $\beta$ -carbolines may exert toxic effects<sup>11 15</sup>. The th $\beta$ c<sub>s</sub> react with nitrite present in food or the body to form *N*-nitroso-th $\beta$ c<sub>s</sub> and other mutagenic compounds. In the presence of aromatic amines,  $\beta$ -carbolines are comutagenic substances. This action is related to its interaction with the DNA and may be affected by the cytochrome P450 enzymes. On the other hand, it has been paid much attention to these compounds as potential neurotoxins<sup>16-18</sup>. Some  $\beta$ c<sub>s</sub> and th $\beta$ c<sub>s</sub> are bioactivated enzymatically to the cations *N*-methyl- $\beta$ -carbolinium ( $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup>), which inhibit the respiratory chain and cause cell death<sup>8</sup>. Thus, th $\beta$ c<sub>s</sub>,  $\beta$ c<sub>s</sub> and the  $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup> cations are considered analogues with an additional nitrogen, respectively, of the neurotoxins 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridinium cation (MPP<sup>+</sup>), which induce Parkinsonism in animals and humans<sup>19</sup>.

## 2. Hypothesis and objectives.

The biological effects of the  $\beta$ -carbolines occurring in food and plants will depend on the specific activity of each one of these substances but also of its biotransformation. The most important enzymatic system involved in the metabolism of xenobiotics in humans is the cytochrome P450 system. It is a set of hemoproteins that carry out the detoxification of xenobiotics, but also their molecular activation to new reactive toxic species<sup>20</sup>. The involvement of cytochromes P450 in the toxicological processes has led to some researchers to propose the use of substances inhibiting these enzymes as chemoprotective agents.

Thus, the biological activity and/or toxicity of the th $\beta$ c<sub>s</sub> and  $\beta$ c<sub>s</sub> present in foods, plants and the biological tissues, as well as that of their toxic analogues the *N*-methyltetrahydropyridines, could depend on their metabolic behavior with cytochromes P450. The main purpose of this thesis was to investigate the effect of cytochrome P450 enzymes on the metabolism and biotransformation of  $\beta$ -carboline compounds and their toxic analogues the tetrahydropyridine derivatives. This study was applied to different compounds: tetrahydro- $\beta$ -carbolines, aromatic  $\beta$ -carboline, methoxy- $\beta$ -carbolines, tetrahydropyridines and cationes  $\beta$ -carbolinium and pyridinium.

The objectives are: 1) identify and establish the cytochrome P450 enzymes involved in the biotransformation of  $\beta$ -carbolines; 2) determine the metabolites formed and the efficacy of biotransformation; 3) evaluate the reduction of  $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup>.

---

cations by the enzyme cytochrome P450 reductase and the generation of reactive oxygen species; 4) determine the capacity of inhibition of  $\beta$ -carbolines on the cytochromes P450 and its comparison with that of antioxidants present in foods and plants.

### 3. Experimental methodology.

A variety of experiments are conducted: a) metabolic biotransformation studies using eight human recombinant cytochrome P450 enzyme on 25 different compounds belonging to different subclasses of  $\beta$ -carbolines and tetrahydropyridines; b) metabolic biotransformation studies in the presence of selective inhibitors; c) metabolic biotransformation studies with liver microsomes; d) studies on enzymatic reduction of  $\beta$ -carbolinium ( $\beta c^+_s$ ) cations and its toxic analogs pyridinium cations by oxidoreductases in order to determine the formation of superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) and e) studies on the inhibition of cytochromes P450 with  $\beta$ -carbolines and antioxidants by using various substrates and toxic compounds such as heterocyclic aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons.

For the analysis and determination of metabolites in the biotransformation assays and inhibition studies, high-resolution analytical techniques such as HPLC with DAD and fluorescence detection and HPLC coupled to mass spectrometry are used. For the enzymatic reduction of cations, spectrophotometry, cyclic voltammetry and electron spin resonance have been employed.

### 4. Results and discussion.

#### A) Biotransformation of $\beta$ -carbolines.

The analysis of the biotransformation media with cytochrome P450 enzymes highlights the existence of significant metabolic biotransformations of  $\beta$ -carbolines occurring in foods and plants by cytochromes P450. Several types of reactions are detected: metabolic hydroxylation in the benzene and pyridine rings, *O*-demethylation, *N*-oxidation, dehydrogenation and *N*-demethylation reactions. The metabolites formed in the media have been identified and the kinetic efficiency of biotransformation determined. Regarding the specific cytochrome P450 enzymes involved in the biotransformation, there is a certain degree of overlapping between different enzymes, although with some specificity for certain substrates and biotransformations. The results with recombinant cytochromes P450 are confirmed with liver microsomes.

In the mechanism of action, cytochromes P450 need the enzyme cytochrome P450 reductase as electron transfer. This reductase itself may use some substrates and toxic compounds generating reactive oxygen species by a redox cycling. By using spectrophotometric techniques, the generation of superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) by the action of cytochrome P450 reductase was confirmed with paraquat and menadione used as positive controls. In addition, experimental results are obtained on the enzymatic reduction of  $\beta$ -carbolinium cations ( $\beta c^+_s$ ) and the possible generation of superoxide anion.

---

## B) Inhibition of cytochromes P450 by $\beta$ -carbolines and antioxidants.

After showing that  $\beta$ -carbolines are substrates of the cytochrome P450 enzymes, it was studied whether these compounds may inhibit these enzymes. Thus, the inhibition of the cytochrome P450 2D6, 1A1 and 1A2 by  $\beta$ -carbolines and naturally-occurring antioxidants was evaluated by using various substrates.

Cytochromes P450 1A1 and P450 1A2 can activate mutagens and carcinogens such as the polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic aromatic amines that are generated in the process of food cooking. Inhibition of these enzymes could be used as a mechanism of chemoprevention. It was observed that the hydrocarbon benzo[a]pyrene (B[a]P) and the aromatic heterocyclic amine 2-amino- $\alpha$ -carboline (A $\alpha$ C) are metabolized by the cytochrome P450 subfamily 1A. Finally, results are presented on the action of  $\beta$ -carbolines and antioxidants in the biotransformation of B[a]P and A $\alpha$ C.

## 5. Conclusions

- Bioactive  $\beta$ -carbolines which occur in foods and plants and that also appear in biological samples are metabolized by human cytochrome P450 enzymes. Metabolic biotransformation differs between substructures of  $\beta$ -carbolines both regarding the metabolites produced and the specific cytochromes P450 involved. Metabolic biotransformations by using recombinant cytochromes P450 are confirmed in human liver microsomes. Biotransformation by these enzymes may affect the bioavailability and subsequent activity and/or toxicity of these compounds.
- The biotransformation of th $\beta$ c<sub>s</sub> produced aromatic hydroxylation and *O*-demethylation reaction (methoxylated derivatives). The aromatic  $\beta$ c<sub>s</sub> gave aromatic hydroxylation reactions produced by the cytochrome P450 subfamily 1A. The methoxy- $\beta$ c<sub>s</sub> (harmaline and harmine) are metabolized by several cytochromes P450 to give *O*-demethylation and the  $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup> cations give compounds of hydroxylation.
- The enzyme cytochrome P450 2D6 is polymorphic and a difference in the biotransformation of these substances between 2D6\*1 and 2D6\*10 variants was observed. The metabolic profile of these compounds may vary substantially between individuals due to the polymorphic nature of this cytochrome.
- The toxic  $\beta$ -carbolinium ( $\beta$ c<sub>s</sub><sup>+</sup>) and pyridinium cations (MPP<sup>+</sup>) do not appear to generate superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) in a redox cycle by reduction with cytochrome P450 reductase.
- $\beta$ -Carbolines were moderate inhibitors of cytochrome P450 1A and P450 2D6. With respect to antioxidants, it was observed that galangin, apigenin, resveratrol,  $\alpha$ -naphthoflavone and ellipticine can inhibit cytochromes P450 1A.
- $\beta$ -Carbolines do not inhibit well the biotransformation of B[a]P by cytochromes P450. With the exception of  $\alpha$ -naphthoflavone and ellipticine, the antioxidants do not

---

inhibit the biotransformation of B[a]P. Harmine, galangin,  $\alpha$ -naphthoflavone and ellipticine inhibited the biotransformation of A $\alpha$ C.

## 6. Referencias del Resumen/References of the Summary

- <sup>1</sup> Herraiz, T., Relative exposure to  $\beta$ -carbolines norharman and harman from foods and tobacco smoke. *Food Additives and Contaminants* (2004) 21, 1041-1050.
- <sup>2</sup> Herraiz, T.; Chaparro, C., Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and  $\beta$ -carbolines norharman and harman isolated from coffee. *Life Sciences* (2006) 78, 795-802.
- <sup>3</sup> Herraiz, T.; Galisteo, J., Tetrahydro- $\beta$ -carboline alkaloids occur in fruits and fruit juices. Activity as antioxidants and radical scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003), 51, 7156-7161.
- <sup>4</sup> Herraiz, T.; Papavergou, E., Identification and occurrence of tryptamine- and tryptophan-derived tetrahydro- $\beta$ -carbolines in commercial sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2004) 52, 2652-2658.
- <sup>5</sup> Herraiz, T.; González, D.; Ancín-Azpilicueta, C.; Arán, V. J.; Guillén, H.,  $\beta$ -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology* (2010) 48, 839-845.
- <sup>6</sup> Herraiz, T.; Guillén, H.; Arán, V. J., Oxidative metabolism of the bioactive and naturally occurring  $\beta$ -carboline alkaloids, norharman and harman, by human cytochrome P450 enzymes. *Chemical and Research in Toxicology* (2008) 21, 2172-2180.
- <sup>7</sup> Herraiz, T.; Guillén, H.; Arán, V. J.; Idle, J. R.; Gonzalez, F. J., Comparative aromatic hydroxylation and *N*-demethylation of MPTP neurotoxin and its analogs, *N*-methylated  $\beta$ -carboline and isoquinoline alkaloids, by human cytochrome P450 2D6. *Toxicology and Applied Pharmacology* (2006) 216, 387-398.
- <sup>8</sup> Herraiz, T.; Guillén, H.; Galisteo, J., *N*-methyltetrahydro- $\beta$ -carboline analogs of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxin are oxidized to neurotoxic  $\beta$ -carbolinium cations by heme peroxidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2007) 356, 118-123.
- <sup>9</sup> Cao, R. H.; Peng, W. L.; Wang, Z. H.; Xu, A. L.,  $\beta$ -Carboline alkaloids: Biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry* (2007) 14, 479-500.
- <sup>10</sup> Airaksinen, M. M.; Kari, I.,  $\beta$ -Carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. 2. Effects. *Medical Biology* (1981) 59, 190-211.
- <sup>11</sup> Herraiz, T.,  $\beta$ -Carbolines in foods. In: *Bioactive compounds in foods*. Ed. By J. Gilbert and H.Z. Senyuva. Blackwell Publ. 2008; p 199-223.
- <sup>12</sup> Robinson, E. S. J.; Anderson, N. J.; Crosby, J.; Nutt, D. J.; Hudson, A. L., Endogenous  $\beta$ -carbolines as clonidine-displacing substances. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2003) 1009, 157-166.
- <sup>13</sup> Herraiz, T.; Chaparro, C., Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke:  $\beta$ -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005) 326, 378-386.
- <sup>14</sup> Herraiz, T.; Galisteo, J., Hydroxyl radical reactions and the radical scavenging activity of  $\beta$ -carboline alkaloids. *Food Chemistry* (2015) 172, 640-649.
- <sup>15</sup> Pavlovic, S.; Schulze, G.; Wernicke, C.; Bonnet, R.; Gille, G.; Badiali, L.; Kaminska, A.; Lorenc-Koci, E.; Ossowska, K.; Rommelspacher, H., 2,9-dimethyl- $\beta$ -carbolinium, a neurotoxin occurring in human brain, is a potent inducer of apoptosis as 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Neuroscience* (2006) 139, 1525-1537.
- <sup>16</sup> Herraiz, T.,  $\beta$ -Carbolines as neurotoxins. In: *Isoquinolines and  $\beta$ -carbolines as neurotoxins and neuroprotectants*. Ed. L. Antkiewicz-Michaluk; H. Rommelspacher. Springer. 2012, 77-103.
- <sup>17</sup> Wernicke, C.; Schott, Y.; Enzensperger, C.; Schulze, G.; Lehmann, J.; Rommelspacher, H., Cytotoxicity of  $\beta$ -carbolines in dopamine transporter expressing cells: Structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology* (2007) 74, 1065-1077.
- <sup>18</sup> Matsubara, K.; Gonda, T.; Sawada, H.; Uezono, T.; Kobayashi, Y.; Kawamura, T.; Ohtaki, K.; Kimura, K.; Akaike, A., Endogenously occurring  $\beta$ -carboline induces parkinsonism in nonprimate animals: A possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* (1998) 70, 727-735.
- <sup>19</sup> Langston, J. W.; Irwin, I.; Langston, E. B.; Forno, L. S., 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>): Identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neuroscience Letters* (1984) 48, 87-92.
- <sup>20</sup> Guengerich, F. P., Human cytochrome P450 enzymes. In: *Cytochrome P450. Structure, mechanism and biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Ed. P.R. Ortiz de Montellano. Kluwer Acad. Press. Plenum Publishers 2005, 377-530.



