



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

**EFFECTO DE UN EXTRACTO DE EPISPERMA DEL GRANO DE
CHENOPODIUM QUINOA WILLD (QUÍNOA) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS
ISOFORMAS
DE LA GSH-TRANSFERASA HEPÁTICA DE RATA.**

Director

Prof. María Eugenia Letelier M.
Laboratorio de Farmacología y
Toxicología
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Patrocinante

Prof. María Eugenia Letelier M.
Laboratorio de Farmacología y
Toxicología
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Memoria de Título para optar al título de Químico Farmacéutico

DANIEL ALBERTO ROJAS SEPÚLVEDA

Santiago de Chile

2012

*"Fíate de Jehová de todo tu corazón,
Y no te apoyes en tu propia prudencia.
Reconócelo en todos tus caminos,
Y él enderezará tus veredas"*

AGRADECIMIENTOS

Antes que todo, quiero agradecer a Dios por esta maravillosa experiencia que fue la universidad y por cada una de las personas que puso como acompañantes en este viaje. También agradecer a mi familia, por quererme por lo que soy, no por lo que puedo llegar a ser. A mi padre por darme las fuerzas y el ánimo en cada momento. A mi madre por el amor y apoyo frente a cada problema o dificultad.

Agradecer a mi polola, Odette Martínez, porque frente a cada problema, desafío o logro durante estos 5 años, tú estabas ahí, amándome a cada paso y recordándome que aún puedo dar más. Tu incondicionalidad, amistad, apoyo y amor es lo que me permitió terminar esta etapa.

A mis amigos de la Universidad, Camila Contreras, Romina Canales, Javier Campanini, Juan Andrades, Fernanda Ávila, Javiera Carrasco, gracias por estos años, en especial por los apuntes. No quiero olvidarme tampoco de mis eternas amigas, Roxana Santana y Rayen Pilquinao, gracias por todos estos años de alegrías y penas, siempre tendrán un lugar especial en mi vida.

Al laboratorio, no por sus matraces, espectrofotómetros, pipetas o buretas, eso se puede conseguir en cualquier otro lugar, sino por el hogar en el que se transformó, o convirtieron las personas que ahí se encontraban. Agradecer a Liliana Peredo y Don José, por ayudarme a partir y por las gratas conversaciones junto a un café. Pero sobre todo a la Profesora María Eugenia Letelier, porque fue una segunda madre, y el amor y compromiso que mostró por mi desarrollo como estudiante y profesional es algo que nunca olvidaré. Una vez me dijeron “arrímate a buen árbol que buena sombra te dará”. Definitivamente Profesora, usted es un roble en mi vida, le estaré por siempre agradecido.

ABREVIATURAS

1-Cl-2,4-DNB	: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.
NAC	: N-acetil-cisteína
DTT	: Ditiotreitól
DTNB	: Ácido 5,5'-ditio- <i>bis</i> (2-nitrobenzoico)

ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	8
Objetivos generales.....	8
Objetivos específicos.....	9
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Reactivos.....	9
Animales de experimentación.....	10
Preparación de microsomas y citosol hepáticos de rata.....	10
Actividad GSH-transferásica.....	11
Determinación de las constantes cinéticas.....	12
Análisis estadístico.....	12

III. RESULTADOS.....	13
IV. DISCUSIÓN.....	25
V. CONCLUSIONES.....	32
VI. REFERENCIAS.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Efecto del extracto de episperma del grano de quínoa sobre las actividades GST microsómica y citosólica de hígado de rata.	14
Figura 2	Efecto de Tritón X-100 sobre la actividad GST microsómica.	15
Figura 3	Efecto de diferentes agentes reductores sobre las actividades GST	17
Figura 4	Determinación de las constantes cinéticas de GST citosólica hepática de rata: K_m 1-Cl-2,4-DNB	20
Figura 5	Determinación de las constantes cinéticas de GST citosólica hepática de rata: K_m GSH	21
Figura 6	Determinación de las constantes cinéticas de GST microsómica hepática de rata: K_m 1-Cl-2,4-DNB	22
Figura 7	Determinación de las constantes cinéticas de GST microsómica hepática de rata: K_m GSH	23
Figura 8	Efecto del extracto de episperma del grano de quínoa sobre la actividad GST microsómica hepática de rata	27
Figura 9	Efecto del extracto de episperma del grano de quínoa sobre la actividad GST citosólica hepática de rata	28

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Efecto del extracto de episperma del grano de quínoa sobre los parámetros cinéticos de la actividad GST hepática de rata	24
---------	--	----

**EFFECTO DE UN EXTRACTO DE EPISPERMA DEL GRANO DE
CHENOPODIUM QUINOA WILLD (QUÍNOA) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS
ISOFORMAS DE LA GSH-TRANSFERASA HEPÁTICA DE RATA.**

Las plantas contienen además de polifenoles, compuestos tiólicos; entre ellos, GSH y cisteína, principales responsables de los mecanismos antioxidantes no-enzimáticos en células animales. No existen en la literatura estudios acerca de la capacidad redox de extractos herbales que poseen concentraciones significativas de compuestos tiólicos. En este trabajo, hemos realizado un estudio preliminar con un extracto de episperma del grano *Chenopodium quinoa* Willd (quínoa), el cual fue titulado respecto de su contenido en polifenoles y tioles. La razón polifenoles totales *versus* tioles totales de este extracto fue 9,3. Como una forma de probar la capacidad redox reversible que se asigna a los tioles, usamos como sistema biológico las isoformas citosólicas y microsómica de la GSH-transferasa de hígado de rata, dado que la forma activa de estas isoformas es un dímero -S-S-. El extracto herbal inhibió ambas actividades enzimáticas de una forma concentración dependiente. Más aún, el poder reductor de dicho extracto mostró ser significativamente mayor que los agentes reductores N-acetil-cisteína, ditiotreitól y catequina. Los cambios en las constantes cinéticas aparentes obtenidas indicarían que el extracto herbal provoca un desbalance redox en los componentes de ambas fracciones subcelulares, siendo esta la causa principal involucrada en la inhibición de las

actividades GSH-transferásicas observada. Nuevos experimentos están siendo llevados a cabo con el objeto de evaluar diferentes preparados herbales conteniendo tioles que puedan ser utilizados en futuras preparaciones nutracéuticas y/o fitofarmacéuticas.

ABSTRACT

EFFECT OF AN EXTRACT OF *CHENOPODIUM QUINOA* WILLD (QUINOA) COATS ON THE ISOFORMS OF LIVER GSH-TRANSFERASE OF RAT.

The main responsible of the non-enzymatic antioxidant mechanisms of plants and animals are thiol compounds and plants contain beside polyphenols. Thiol compounds are represented main by GSH and cysteine. Studies of antioxidant properties of herbal extracts which have significant concentrations of thiol compounds are scarce. Thus, in this work, we have done a preliminary study with an extract of *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa) coats, which was titrated in its polyphenols and thiol content. The ratio between polyphenols versus thiols in this extract was 9.3. As a manner to test the reversible redox capacity assigned to thiols, we use, as a biological system, rat liver cytosolic and microsomal isoforms of the GSH-transferase, because the enzymatic active form of this enzyme is its disulfide dimeric form. The quinoa extract inhibited both enzymatic activities in a concentration-dependent manner. Furthermore, the reducing power of this extract proved to be significantly higher than other reducing agents like N-acetyl-cysteine, dithiothreitol or catechin. The changes on the apparent kinetics constants obtained would indicate that the quinoa extract causes a redox imbalance in the components of both subcellular fractions, being this the main reason involved in the inhibition of GSH-transferase activities observed. New experiments are being carried out in order

to evaluate different herbal preparations containing thiols which may be used in future nutraceutical and/or phytopharmaceutical preparations.

I. INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos disponen de mecanismos antioxidantes con el objeto de prevenir el daño oxidativo [1-2]. El antioxidante no enzimático más abundante en la célula animal es el tripéptido glutatión (GSH). Las plantas están permanentemente expuestas a la radiación solar UV [3-4], por lo que ellas poseen una capacidad antioxidante mayor que la célula animal. Así, la capacidad antioxidante no enzimática está representada por compuestos tiólicos (GSH, cisteína) y además, por sus metabolitos polifenólicos [3-8]. Los mecanismos a través de los cuales los tioles y polifenoles ejercen su actividad antioxidante incluyen entre otros, su capacidad de atrapar radicales libres del oxígeno y de quelar metales de transición los cuales en su estado iónico libre reducido, generan especies radicalarias del oxígeno a través de las reacciones de Haber Weiss y/o Fenton [3-8].



Existen diferencias sin embargo, entre las propiedades redox de tioles y polifenoles. Así, en todo tipo de células la oxidación de las biomoléculas tiólicas puede ser revertida por agentes antioxidantes tiólicos, pero no la oxidación de los fenoles a derivados quinónicos [6-8]. Esta reversibilidad en muchos casos es el resultado de mecanismos enzimáticos concertados que involucran el uso

de GSH [9-10]. Los compuestos polifenólicos y tiólicos además de su reactividad redox frente a radicales libres del oxígeno, pueden actuar como agentes nucleofílicos [6-11]. En estas condiciones, ellos forman aductos covalentes con metabolitos electrofílicos, los cuales son altamente reactivos y por tanto, muy tóxicos. Estos metabolitos incluyen peróxidos, aldehídos, quinonas y epóxidos los cuales son generados enzimáticamente de precursores endógenos y exógenos [12]. Cuando los compuestos polifenólicos y tiólicos reaccionan formando aductos covalentes, son consumidos irreversiblemente. Esto provoca una disminución de su concentración en el organismo y por tanto, de la capacidad antioxidante celular, fenómeno que ocurre sin la presencia de radicales libres del oxígeno [13]. En este sentido, los compuestos tiólicos parecen ser agentes nucleofílicos más eficientes que los polifenoles [7,13]. Así, en las células animales, la formación de S-aductos con compuestos electrofílicos ocurre no enzimáticamente [14-15], reacción que puede además, ser catalizada por las GSH-transferasas (GST), familia de enzimas ampliamente distribuidas en el organismo [16-18].

Cabe señalar además, que los tioles de bajo peso molecular, GSH y cisteína, pueden actuar como agentes quelantes de iones metálicos, lo cual también podría ocurrir con los grupos tiólicos redox sensibles de proteínas, alterando así su función [19-20].

Los antecedentes presentados muestran que el estrés oxidativo puede ocurrir como consecuencia de la interrupción de circuitos tiólicos, los que normalmente participan en diversos procesos de señalización celular y regulación fisiológica [11]. El estrés oxidativo inducido a través de los circuitos tiólicos parece ser más importante que el generado por las especies reactivas del oxígeno (EROs) [21]. Tioles redox-sensibles están presentes en diferentes proteínas y/o péptidos; así por ejemplo son críticos en: transducción de señales (ej. H-Ras, PTP-1B), factores de transcripción que se unen a DNA (ej. Nrf2, NFκβ), activación de receptores (ej. integrina αIIβ3 en la activación de plaquetas), etc. [21]. Por otra parte, se ha demostrado que la interrupción de la función y la homeostasis de los sistemas tiólicos es la característica central del estrés oxidativo observado en el envejecimiento, como también en las enfermedades relacionadas con el envejecimiento [21].

La diversidad de procesos fisiológicos en los cuales están involucrados los circuitos tiólicos hace necesario la existencia de mecanismos reguladores. Así, el estado redox de los sistemas tiólicos que son sensibles a oxidantes no-radicalarios, son controlados por las tiorredoxinas (Trx), GSH y cisteína [20-21]. Los sistemas regulados por las tiorredoxinas y el GSH se mantienen en condiciones estables pero no en equilibrio, debido a una continua oxidación de los tioles celulares; ellos se oxidan a una velocidad aproximada de 0,5% de los tioles totales/min [19-20]. Si los oxidantes no-radicalarios se generan en forma

aberrante, ellos podrían alterar los circuitos tiólicos, alterando las funciones biológicas de ellos.

Tioles herbales. Extensiva investigación se ha desarrollado en relación a los mecanismos antioxidantes de polifenoles de origen herbal [8], no así para la acción antioxidante de compuestos tiólicos de plantas. Las plantas superiores, como otros organismos aeróbicos, requieren oxígeno para la eficiente producción de energía [22]. Para ello, han desarrollado la vía fotorrespiratoria que regenera el NADP⁺, a través de la cadena de transporte de electrones que reduce el O₂ a H₂O, condiciones necesarias para la fijación de CO₂. Al igual que en organismos animales, la vía fotorrespiratoria también genera radicales libres del oxígeno y H₂O₂; este último también puede formarse durante el catabolismo de los lípidos como un subproducto de la β-oxidación de ácidos grasos. Un ambiente estresante para las plantas, como la sequía, el estrés salino, el ozono y las temperaturas altas o bajas, reducen las defensas incluyendo la capacidad antioxidante. Por lo tanto, es razonable esperar que plantas que crecen en ambientes de alto estrés tengan mayor capacidad antioxidante que aquellas que crecen en praderas con posibilidades hídricas mayores y menor radiación UV. Los datos presentados parecen indicar que en esta condición la capacidad antioxidante dada por los compuestos tiólicos debería ser más relevante. Un ejemplo de esto es *Chenopodium quinoa* Willd (quínoa), planta dicotiledónea perteneciente a la familia *Chenopodiaceae* que crece en la zona andina entre 2500 a 4000 metros de altitud [23]. El grano de quínoa es usado por los nativos

de la región Andina como alimento. El grano de quínoa contiene varias vitaminas en bajas concentraciones, por ejemplo ácido fólico, tiamina, ácido ascórbico y riboflavinias [24]. Además, contiene minerales como calcio, hierro, zinc, cobre y manganeso. La semilla de la quínoa, especialmente el embrión, posee un alto contenido de aceites, entre los que se encuentran el ácido palmítico, oleico, linoléico y linolénico. También posee antioxidantes endógenos, como α - y γ -tocoferol [25-26]. En la semilla de la quínoa se ha encontrado un alto contenido de proteínas, almidón y aminoácidos libres, tales como lisina, histidina y triptófano [27]. Por otra parte, los granos de quínoa presentan en su episperma contenidos variables de saponinas que oscilan entre 0,01-4,65% de su peso seco [28]. Estas saponinas son glucósidos del tipo triterpenoidal que se caracterizan por su sabor amargo, capacidad de formar espuma en soluciones acuosas y su poder hemolítico. Esta propiedad le confiere a dicho extracto herbal una posible actividad surfactante, lo cual es concordante con los estudios que demuestran que el extracto de episperma del grano de quínoa promueve hemólisis [29] y cambios de la permeabilidad intestinal [30]. Investigaciones recientes de nuestro Laboratorio mostraron que extractos hidroalcohólicos de episperma del grano de quínoa contenían además, polifenoles y compuestos tiólicos, los cuales serían los responsables de la actividad antioxidante observada [31].

Dada la importancia en mantener la homeostasis de los circuitos tiólicos y la información limitada que tenemos de la contribución que los compuestos tiólicos herbales puedan hacer a la capacidad antioxidante celular, es que nos interesamos en evaluar la capacidad redox de un extracto hidroalcohólico de episperma del grano de quínoa sobre la actividad GSH-transferásica (GST).

GSH-transferasa. La actividad GSH-transferásica está representada por una familia de isoenzimas ampliamente distribuidas en el organismo. Estas enzimas catalizan la conjugación de sustancias electrofílicas con GSH [32]. Así, GSTs son críticas para eliminar compuestos electrofílicos altamente tóxicos desde la célula iniciando la vía de su excreción como ácidos mercaptúricos [33]. Esta familia de enzimas se localiza en el citosol (isoformas citosólicas) o en el retículo endoplásmico (isoformas microsómicas) y en la mitocondria [32]. Se ha demostrado que la forma activa de esta enzima es un dímero -S-S- [34-36]; los monómeros reducidos de la GST citosólica o microsómica son inactivos [8,37]. La isoforma de la GST citosólica contiene 3-4 residuos de cisteína y solamente un dímero específico representa la forma activa de esta enzima [34]. Por otra parte la isoforma de GST microsómica que es la más abundante contiene solamente un residuo de cisteína y por lo tanto, solo es posible la formación de un dímero -S-S- activo catalíticamente [34]. La incubación de citosol y microsomas hepáticos con agentes oxidantes provoca efectos distintos en las formas activas de las isoformas de la GST. Así, se reconoce ampliamente que la actividad GST citosólica disminuye en presencia de EROs ya que dímeros no

específicos se generan en mayor cantidad que los específicos formados a través de la oxidación [35,38]. La actividad GST microsómica en cambio es aumentada por EROs debido a que se puede formar un solo dímero activo por oxidación [38-40]. Altas concentraciones de EROs, sin embargo, disminuyen la actividad GST microsómica al alterar la conformación de la membrana microsómica a través de la lipoperoxidación [38]. Por otra parte, tanto la actividad GST citosólica como la microsómica son disminuidas en presencia de iones cobre, presumiblemente debido a la quelación de los residuos de cisteína de la GST, lo cual impide la formación de cualquier dímero [41-43].

Estas características de las isoformas de la GST nos condujeron a elegir la actividad GSH-transferásica como modelo experimental para estudiar la actividad redox de un extracto de episperma del grano de quínoa. La presencia de compuestos tiólicos, en adición a los polifenoles en este extracto herbal podrían prevenir y posiblemente revertir, la formación del dímero activo de las isoformas citosólicas y microsómicas de la GST. Este fenómeno provocaría cambios en sus actividades enzimáticas.

Nuestros resultados mostraron que el extracto de episperma del grano de quínoa es capaz de inhibir la actividad GSH-transferásica microsómica y citosólica hepática de rata. Las K_m aparentes para el sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno no fueron afectadas por el extracto herbal en ninguna de las condiciones estudiadas. Sin embargo, la K_m aparente para el cofactor GSH

presentó diferencias significativas; esta constante cinética aumentó progresivamente a medida que se aumentó la concentración del extracto herbal. Estos resultados serán discutidos en términos de la relevancia farmacológica que podrían tener extractos herbales enriquecidos en compuestos tiólicos.

HIPÓTESIS

Considerando que las isoformas citosólicas y microsómica de hígado de rata presentan diferente número de residuos tiólicos en su composición aminoacídica monomérica, y que el extracto de episperma del grano de quínoa contiene metabolitos tiólicos,

Se postula que:

“El extracto hidroalcohólico de episperma del grano de quínoa inhibe tanto la actividad GSH-transferásica citosólica como la microsómica hepática de rata; sin embargo, la inhibición de la actividad enzimática de las isoformas citosólicas y microsómicas de la GSH-transferasa presenta diferencias cinéticas”.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto reductor de un extracto hidroalcohólico de episperma del grano de quínoa sobre la cinética enzimática de las isoformas de la GSH-transferasa citosólica y microsómica de hígado de rata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las actividades GSH-transferásica microsómica y citosólica de hígado de rata en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de extracto de episperma del grano de quínoa.
2. Comparar el efecto del extracto de episperma del grano de quínoa con otros agentes reductores, tales como N-acetil-cisteína, ditioneitol y catequina.
3. Comparar el efecto del extracto de episperma del grano de quínoa sobre la actividad microsómica hepática de rata con el del detergente Tritón X-100.
4. Determinar las constantes cinéticas de las actividades GSH-transferásicas microsómicas y citosólicas como una forma de explicar los cambios de estas actividades enzimáticas en presencia de extracto del episperma del grano de quínoa.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. BSA, CuSO_4 , Catequina [(+)-cianidol-3,(2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2*H*)-benzopiran-3,5,7-triol], reactivo de Folin-Ciocalteu, ascorbato de sodio, ácido 5,5'-ditio-*bis*(2-nitrobenzoico) (DTNB), 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (1-Cl-2,4-DNB), ditioneitol (DTT), GSH y N-acetil-cisteína se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El resto de los reactivos utilizados fueron del mejor grado analítico.

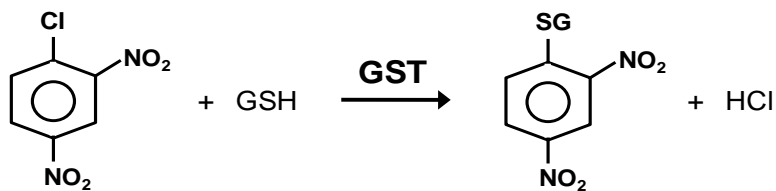
El extracto de episperma del grano de quínoa fue donado por Laboratorios Ximena Polanco (Santiago, Chile). Este extracto herbal contiene: [polifenoles totales]: $9,0 \pm 0,33$ μ moles equivalentes de catequina/mL de extracto y [tíoles totales]: $1,94 \pm 0,10$ μ moles/mL de extracto.

Animales de experimentación. Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley, de tres meses de edad y de un peso corporal aproximado de 250g. Estos animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron con una dieta normal de *pellet*, agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiental de 21°C. Todos los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Ético Institucional de la misma Facultad.

Preparación de microsomas y citosol hepáticos de rata. Estas fracciones subcelulares fueron preparadas de acuerdo a Letelier y cols., 2010 [43]. Las ratas fueron sometidas a ayuno por 15 horas con agua *ad libitum*, y sacrificadas por decapitación. Los hígados fueron perfundidos *in situ* con 0,9% P/V NaCl, removidos por incisión, y puestos en hielo. Todos los procedimientos de homogenización y fraccionamiento fueron realizado a 4°C, y todas las centrifugaciones fueron realizadas usando ya sea una centrifuga con refrigeración Hermle modelo Z326K ó una ultracentrífuga Beckman modelo XL-90. El tejido hepático (9-11g de peso húmedo), carente del tejido conectivo y

vascular, fue homogenizado con 4 volúmenes de 0,154M de KCl, con ocho pasajes en un homogeneizador Dounce Wheaton B utilizando un motor Heidolph modelo RZR1 a 250rpm. El homogeneizado fue centrifugado a 9.000g por 15min y el sedimento fue descartado. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000g por 60min. El *pellet* (microsomas) fue almacenado a -80°C en un *freezer* il-Shin modelo DF8514 por hasta 3 meses. La cuantificación de la proteína microsómica se determinó por el método de Lowry y cols., 1951 [44], utilizando albúmina sérica de bovino (fracción IV) como estándar.

Actividad GSH-transferásica. La conjugación de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno con GSH, reacción catalizada por la GSH-transferasa (GST) se ensayó de acuerdo al método descrito en Letelier y cols., 2010 [45]. La ecuación química es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1 mL: amortiguador fosfato 0,1M pH 6,5; 1-cloro-2,4-dinitrobenceno 1mM; GSH 4mM; proteína microsómica 100 µg/mL o 10 µg/mL de proteína citosólica. El blanco contenía todos los reactivos, a excepción de GSH. La reacción se inició agregando GSH a la cubeta muestra. La actividad se determinó midiendo la

absorbancia del conjugado formado enzimáticamente a 340 nm, en forma continua durante 3 min a 25°C, con el objeto de minimizar la reacción no enzimática. La aparición del conjugado se midió en forma continua, a 340nm en un espectrofotómetro UV-VIS-UNICAM UV3. La actividad de la GST se calculó utilizando el $\epsilon_{340} = 9,6\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ del conjugado.

Determinación de las constantes cinéticas. Los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ aparentes para la conjugación de 1-Cl-2,4-DNB con GSH, se obtuvieron graficando los valores experimentales de velocidad vs concentración de sustrato de acuerdo a Lineweaver-Burk. En este gráfico, el intercepto del eje x representa el valor recíproco negativo de la K_m y el del eje y, el recíproco de la $V_{m\acute{a}x}$.

Análisis estadístico. Los datos presentados corresponden al promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm EEM. La significancia estadística (ANOVA) y los análisis de regresión se desarrollaron usando el software GraphPad Prism 5.0. Las diferencias se consideraron como significativas, cuando $p < 0.05$.

III.RESULTADOS

Efecto del extracto de episperma del grano de quínoa sobre las actividades GST microsómica y citosólica de hígado de rata. La Figura 1 muestra el gráfico semilogarítmico de la concentración de extracto de episperma del grano de quínoa *versus* la actividad GSH-transferásica microsómica y citosólica residual. La actividad enzimática residual está expresada como % de la actividad medida en ausencia del extracto considerada como 100%. Los resultados muestran que el extracto herbal fue capaz de inhibir ambas actividades GSH-transferásicas de una forma concentración-dependiente y bimodal. Así, el gráfico semilogarítmico muestra en ambos casos, dos rectas de pendientes claramente definidas. El valor de la primera pendiente como de la segunda para ambas actividades enzimáticas, microsómica y citosólica, no fue significativamente distinto: 31,7 - 33,3 (primera pendiente) y 98,1 - 100,4 (segunda pendiente).

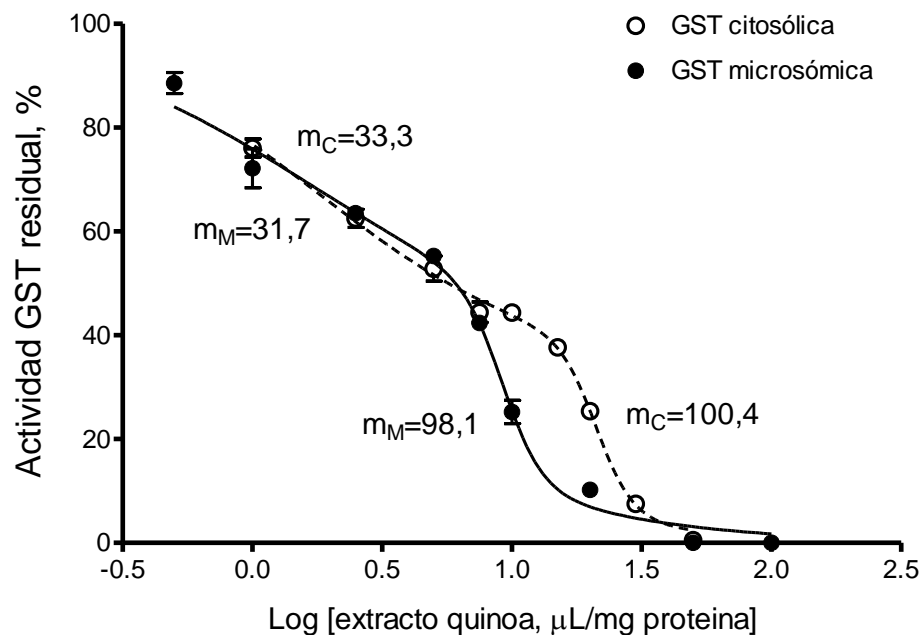


Figura 1. Efecto del extracto de episperma del grano de quínoa sobre las actividades GST microsómica y citosólica de hígado de ratón. Extracto de episperma del grano de quínoa: 0-50 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Las actividades GST se ensayaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos previa incubación del sistema biológico (microsomos: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o citosol: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 5 minutos con el extracto herbal. m_M : pendiente actividad GST microsómica; m_C : pendiente actividad GST citosólica. Los datos corresponden a la media \pm EEM de a lo menos 4 experimentos independientes. Las líneas corresponden a la regresión no lineal bifásica de los datos.

Efecto de Tritón X-100 sobre la actividad GST microsómica. Cabe recordar que la episperma del grano de quínoa contiene cantidades significativas de saponinas [28]. Más aún, existen antecedentes acerca del efecto sobre los cambios en fluidez de membrana inducidos por extractos de episperma del grano de quínoa [31]; sin embargo, no existen antecedentes acerca de los cambios que este efecto sobre membrana puede provocar sobre la actividad GST microsómica. Como una forma de evaluar si el efecto inhibitorio sobre la actividad GST microsómica observado, era provocado por las saponinas

presentes en el episperma del grano de quínoa, se determinó el efecto de Tritón X-100, un surfactante no iónico, sobre esta actividad enzimática (Figura 2). Interesantemente, este detergente provocó un aumento de la actividad GST microsómica, el cual alcanzó un valor máximo equivalente a 1,5 veces la actividad basal a la concentración de 0,3% V/V de Tritón; mayores concentraciones de este detergente disminuyeron progresivamente este efecto.

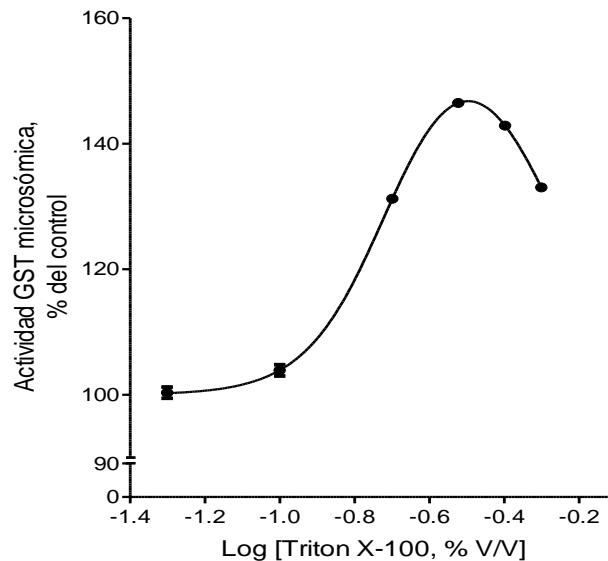


Figura 2. Efecto de Tritón X-100 sobre la actividad GST microsómica. Tritón X-100: 0-0,5% P/V. La actividad GST microsómica se determinó de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos. Los datos corresponden a la media \pm EEM de a lo menos 4 experimentos independientes. El trazado que une los puntos en la figura corresponde a la regresión no lineal bifásica de los datos.

Efecto de diferentes agentes reductores sobre las actividades GST. En este experimento se comparó el efecto inhibitorio del extracto de episperma del grano de quínoa, propuesto como agente reductor de enlaces disulfuros con otros agentes reductores: N-acetil-cisteína (NAC), ditioneitol (DTT) y catequina (Figura 3). Estos tres agentes reductores fueron evaluados a igualdad de concentración, 1mM concentración final en la mezcla de reacción; esta concentración fue elegida considerando experimentos anteriores en los cuales las curvas concentración-respuesta mostraron un alto porcentaje de inhibición de esta actividad enzimática [38]. En estas condiciones, NAC, DTT y catequina inhibieron tanto la actividad GSH-transferásica citosólica como la microsómica en similares porcentajes. Interesantemente, sólo 2µL/mL de extracto de episperma del grano de quínoa provocaron un efecto inhibitorio sobre ambas actividades GSH-transferásica significativamente mayor que el provocado por los otros 3 agentes reductores. Cabe hacer notar que 2 µL/mL del extracto de episperma del grano de quínoa corresponden a 18 nmoles equivalentes de catequina/mL y a 3,88 nmoles de tioles/mL; sin embargo, las concentraciones de los agentes reductores NAC, DTT y catequina correspondieron a 1 µmol/mL.

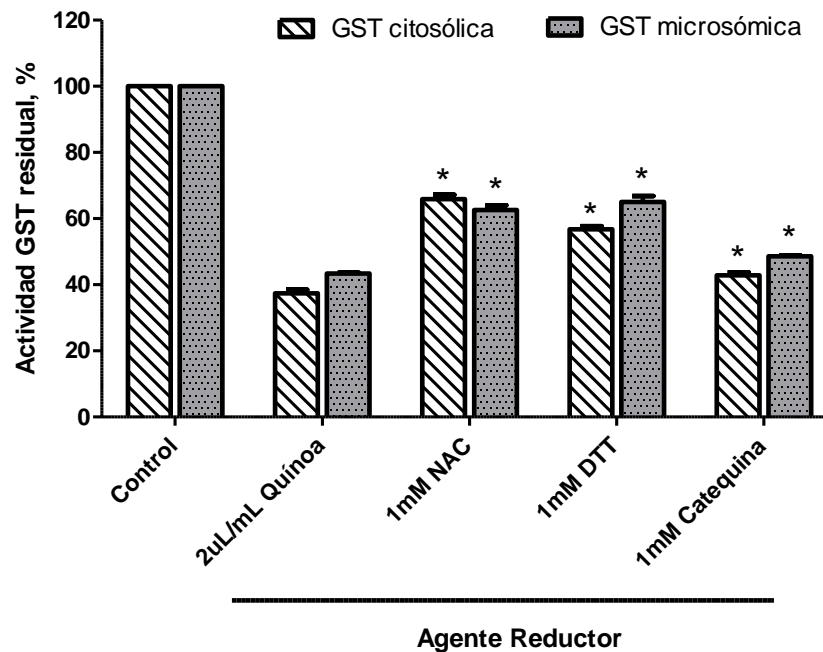


Figura 3. Efecto de diferentes agentes reductores sobre las actividades GST. NAC, DTT y Catequina: 1,0 $\mu\text{mol/mL}$; Quínoa: 18,0 nmoles equivalentes de catequina/mL y 3,88 nmoles de tioles/mL. La actividad GST se determinó de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos previa incubación del sistema biológico (microsomos: 100 $\mu\text{g/mL}$ o citosol: 10 $\mu\text{g/mL}$) por 5 minutos con cada uno de los agentes antioxidantes. Los datos corresponden a la media \pm EEM de a lo menos 4 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas comparadas con las actividades GST en presencia del extracto de episperma de quínoa, $p < 0,05$.

Efecto del extracto de episperma del grano de quínoa sobre los parámetros cinéticos de la actividad GST. Considerando que el efecto bimodal en la inhibición de las actividades GSH-transferásicas (Figura 1), puede estar dado por el efecto reductor como también por el efecto detergente de las saponinas, se eligieron concentraciones que nos permitieran separar ambos efectos. En este sentido existen antecedentes de nuestro laboratorio que demuestran que el efecto detergente (medido como liberación de hemoglobina

de glóbulos rojos al medio) del extracto de episperma del grano de quínoa no fue significativo hasta 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Asimismo, 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de extracto herbal corresponden a la concentración de extracto de episperma del grano de quinoa que provocó el efecto medio de la primera pendiente de inhibición de ambas actividades GST citosólica y microsómica; asimismo, las concentraciones 10 y 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de extracto herbal corresponden al punto medio de la segunda pendiente de inhibición de las actividades GST microsómica y citosólica, respectivamente. Las concentraciones 20 y 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del extracto herbal corresponden a la mínima actividad que se pudo medir de las actividades GST microsómica y citosólica, respectivamente. Resumiendo, las concentraciones del extracto herbal ensayadas para la determinación de las constantes cinéticas fueron: 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para la actividad GST microsómica y 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$, para la citosólica (Tabla 1).

Las figuras 4, 5, 6 y 7 muestran los gráficos de Lineweaver-Burk construidos a partir de las curvas de saturación para GSH y el sustrato 1-Cl-2,4-DNB, para las actividades GST citosólica y microsómica hepática de rata. Los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ que aparecen en la Tabla 1 fueron obtenidos de los gráficos de Lineweaver-Burk donde el intercepto del eje x corresponde a $-1/K_m$ y el del eje y, $1/V_{m\acute{a}x}$.

Como se muestra en la Tabla 1, la $V_{m\acute{a}x}$ aparente de ambas actividades GSH-transferásicas disminuyó progresivamente a medida que se aumentó la

concentración del extracto de episperma del grano de quínoa en la mezcla de reacción. Por otra parte, la K_m aparente para el sustrato 1-Cl-2,4-DNB no fue alterada por ninguna de las concentraciones del extracto herbal ensayadas para ambas actividades enzimáticas, microsómica y citosólica. Sin embargo, la K_m aparente de GSH de la enzima microsómica fue aumentada por todas las concentraciones del extracto de episperma del grano de quínoa ensayadas; la magnitud de este aumento fue concentración-dependiente. Similares resultados se observaron en la K_m aparente de GSH de la enzima citosólica, pero sólo a la concentración de 30 μ L/mL de extracto herbal, que fue la máxima concentración ensayada.

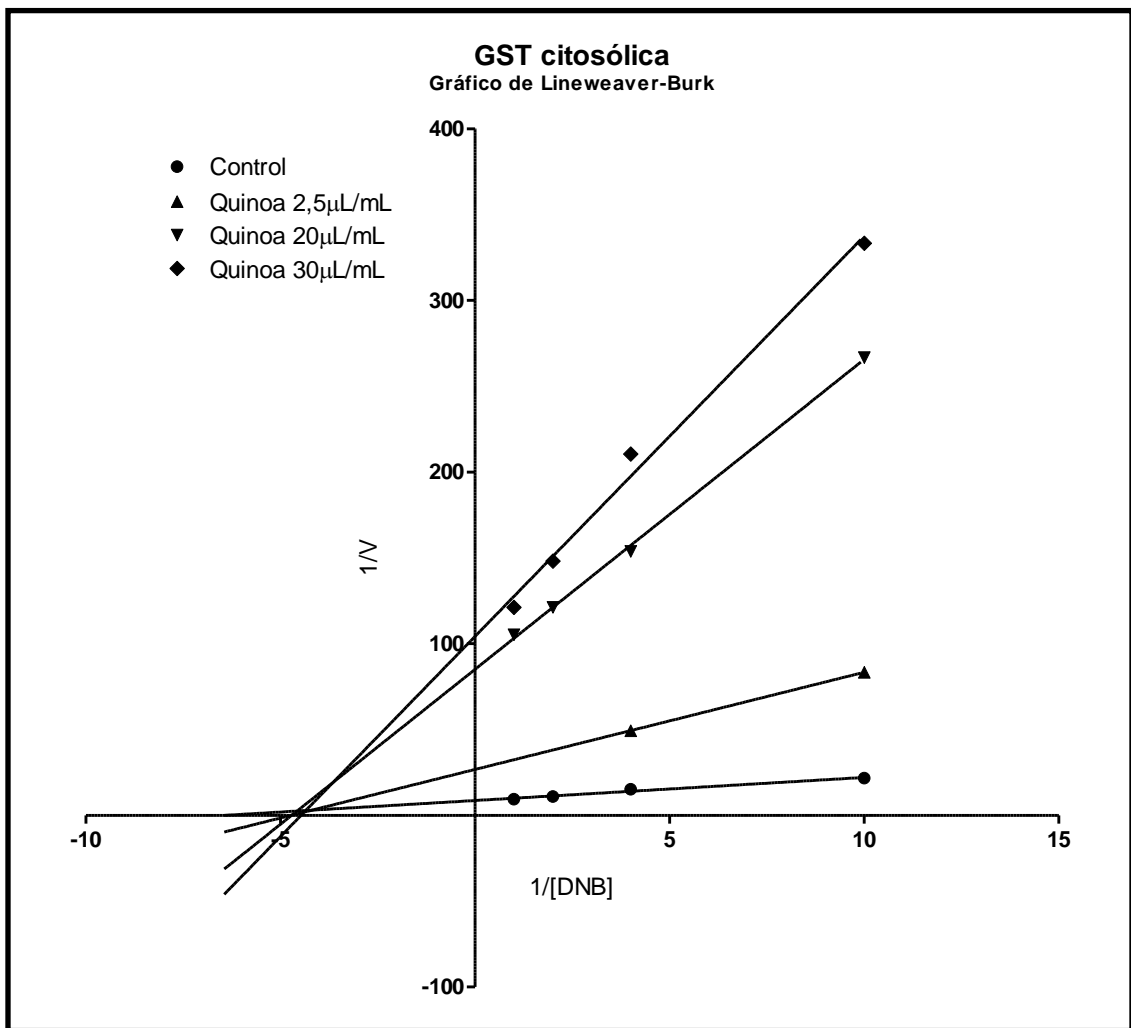


Figura 4. Determinación de las constantes cinéticas de GST citosólica hepática de rata: K_m 1-CI-2,4-DNB. La actividad GST citosólica se determinó de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos. Cada valor corresponde a la media \pm EEM de a lo menos 4 experimentos independientes.

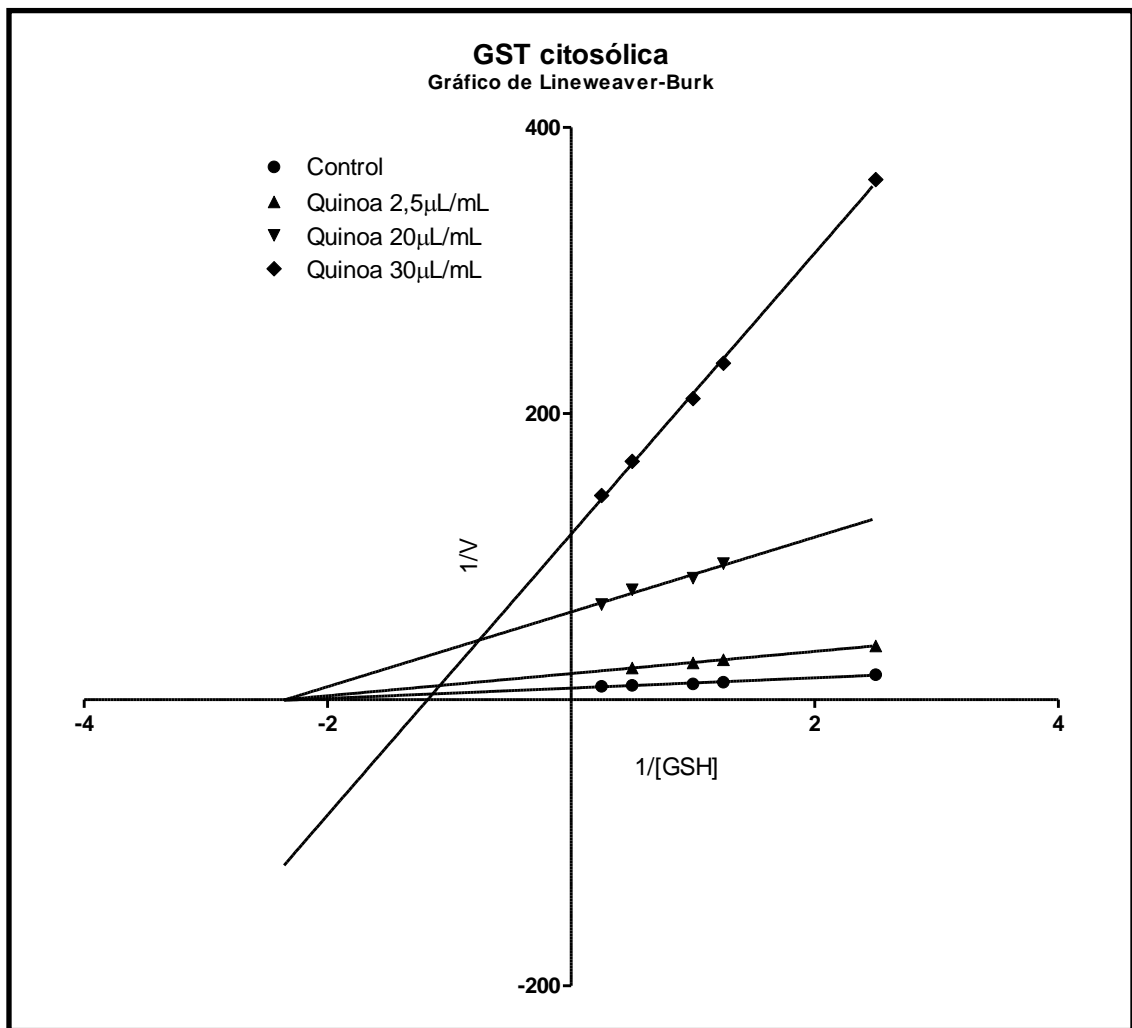


Figura 5. Determinación de las constantes cinéticas de GST citosólica hepática de rata: K_m GSH. La actividad GST citosólica se determinó de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos. Cada valor corresponde a la media \pm EEM de a lo menos 4 experimentos independientes.

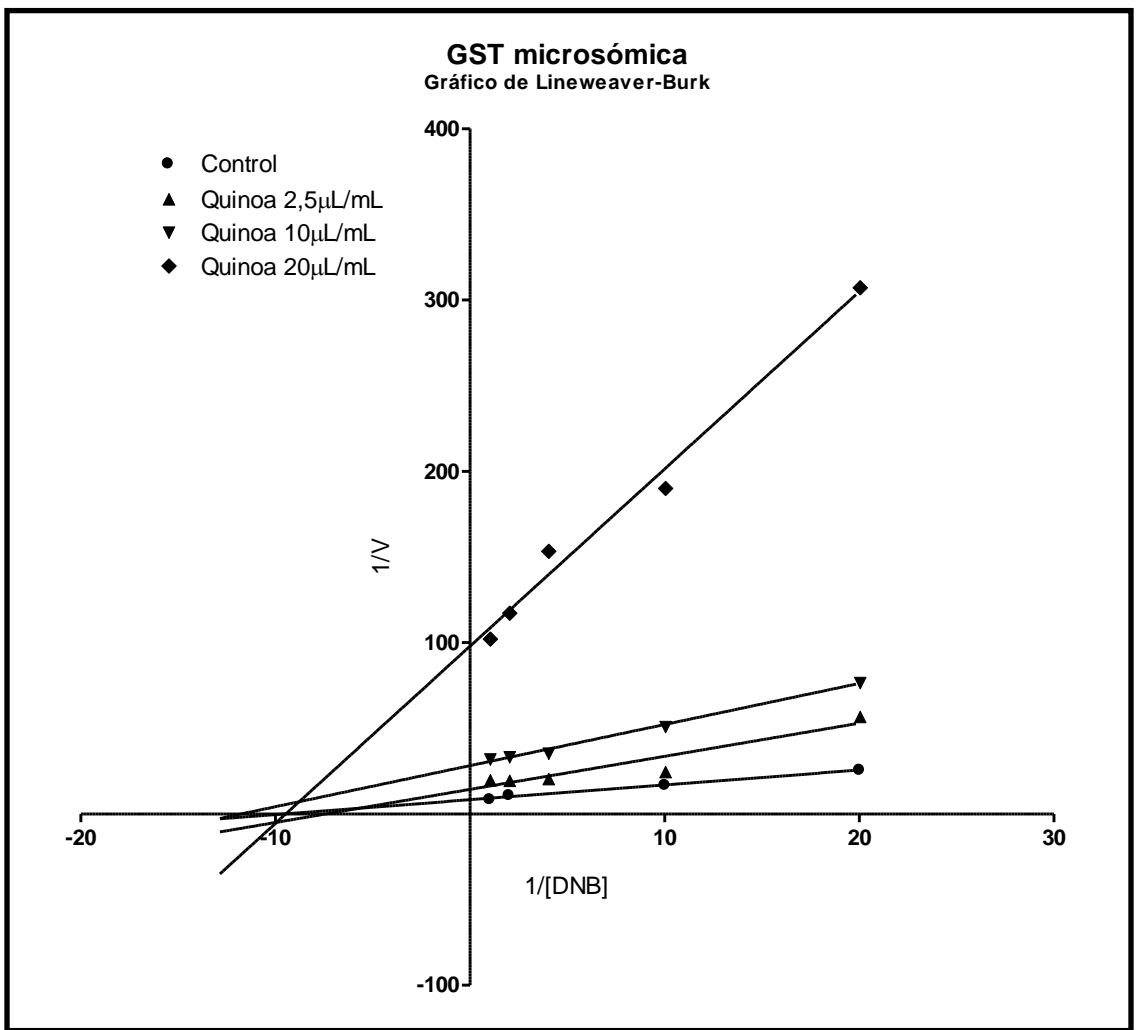


Figura 6. Determinación de las constantes cinéticas de GST microsómica hepática de rata: K_m 1-CI-2,4-DNB. La actividad GST microsómica se determinó de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos. Cada valor corresponde a la media \pm EEM de a lo menos 4 experimentos independientes.

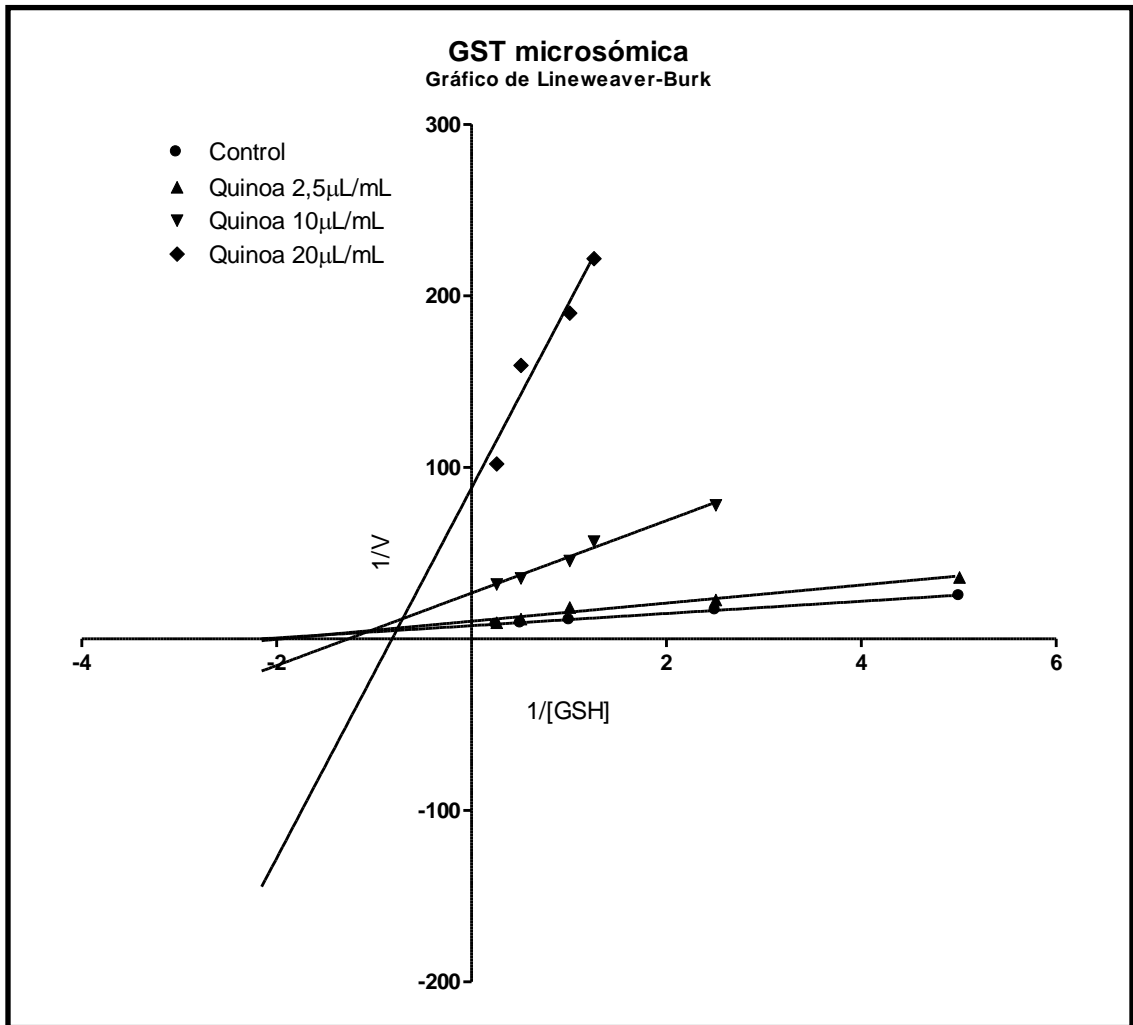


Figura 7. Determinación de las constantes cinéticas de GST microsómica hepática de rata: K_m GSH. La actividad GST microsómica se determinó de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos. Cada valor corresponde a la media \pm EEM de a lo menos 4 experimentos independientes.

TABLA 1
EFFECTO DEL EXTRACTO DE EPISPERMA DEL GRANO DE QUÍNOA
SOBRE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ACTIVIDAD GST
HEPÁTICA DE RATA

ACTIVIDAD GST CITOSÓLICA				
Condición	GSH		1-CI-2,4-DNB	
	K_m aparente (mM)	V_{máx} aparente	K_m aparente (mM)	V_{máx} aparente
Control	0,44 ± 0,03	1563 ± 82,0	0,16 ± 0,03	1468 ± 129,0
+ 2.5µL extracto	0,42 ± 0,02	694,0 ± 8,0*	0,17 ± 0,02	647.0 ± 86,0*
+ 20µL extracto	0,46 ± 0,02	211,0 ± 25,0*	0,20 ± 0,03	168.0 ± 35,0*
+ 30µL extracto	0,69 ± 0,03*	100,0 ± 4,0*	0,16 ± 0,01	97.0 ± 2,0*
ACTIVIDAD GST MICROSÓMICA				
Condición	GSH		1-CI-2,4-DNB	
	K_m aparente (mM)	V_{máx} aparente	K_m aparente (mM)	V_{máx} aparente
Control	0.40 ± 0.04	166,7 ± 31,9	0.11 ± 0.01	165.4 ± 6,5
+ 2,5µL extracto	0.56 ± 0.01*	92,0 ± 12,5*	0.11 ± 0.03	94.4 ± 3,9*
+ 10µL extracto	0.97 ± 0,02*	41,8 ± 6,4*	0.09 ± 0,02	31,9 ± 5,2*
+ 20µL extracto	1.23 ± 0,01*	24,6 ± 5,2*	0.08 ± 0,02	17,0 ± 3,4*

Los parámetros cinéticos se calcularon a partir de gráficos de Lineweaver-Burk. La V_{máx} aparente está expresada en nmoles de conjugado formado/min/mg de proteína. Los datos corresponden a la media ± EEM de a lo menos 4 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, p<0,05.

IV. DISCUSIÓN

Los preparados herbales han sido propuestos como fuente de antioxidantes en el uso preventivo y/o para mitigar algunas patologías especialmente aquellas asociadas a estrés oxidativo, entre ellas, el envejecimiento, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Los compuestos polifenólicos son los antioxidantes herbales mayoritariamente estudiados y utilizados tanto para prevenir como para mitigar dichas patologías. Estos compuestos son especialmente abundantes en las hojas de las plantas y no existen en la célula animal. El antioxidante no-enzimático más abundante en la célula animal es el GSH. Las plantas también poseen compuestos antioxidantes azufrados, entre ellos el tripéptido tiólico GSH. La homeostasis de los circuitos tiólicos es fundamental en la mayoría de los procesos fisiológicos de todos los seres vivos. En general, las proteínas poseen en su estructura aminoacídica cisteína, aminoácido tiólico (-SH) esencial para la célula animal. Este aminoácido está generalmente involucrado ya sea en la conformación nativa y/o en la expresión de la actividad biológica de las proteínas. El grupo tiólico puede ser reversiblemente oxidado a disulfuro (-S-S-), fenómeno redox que puede aumentar o inhibir la actividad biológica de una proteína. La regulación del estado redox de los sistemas tiólicos es controlada por las tiorredoxinas (Trx), GSH y cisteína a través de sus grupos tiólicos [19-20]. No existen antecedentes en la literatura acerca de la capacidad redox de compuestos tiólicos herbales. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el extracto de

episperma del grano de *Chenopodium quinoa* Willd (quínoa), utilizado en este trabajo, contenía además de polifenoles, tioles, en una proporción polifenoles/tioles igual a 9,3. Si bien los compuestos polifenólicos como tiólicos pueden atrapar especies radicalarias del oxígeno, estos compuestos se diferencian en que la oxidación de un tiol a disulfuro es reversible, no así la oxidación de un fenol a quinona. Es por ello nuestro interés en evaluar la capacidad de este extracto de inhibir la actividad GSH-transferásica hepática de rata. Como se mencionó en la Introducción, la forma activa de las isoformas de la GST es su forma dimérica -S-S-; si este enlace disulfuro es reducido, se pierde el dímero y por tanto, también la actividad enzimática. Nuestros resultados mostraron que efectivamente el extracto herbal es capaz de inhibir la actividad GSH-transferásica citosólica y microsómica de rata. Más aún, la curva semilogarítmica de concentración de extracto herbal *versus* % de actividad residual mostró para ambas actividades enzimáticas la presencia de dos rectas con pendientes significativamente distintas (Figura 1). Ello podría indicar que el fenómeno inhibitorio observado es provocado a través de dos procesos mecanísticamente diferentes.

Una de las causas de la inhibición de la actividad GSH-transferásica observada podría ser la reducción del dímero catalíticamente activo, mecanismo que parece ser el responsable de la pérdida de actividad evidenciada por la primera pendiente (Figura 8 y 9). Este postulado se ve respaldado al analizar las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ aparentes determinadas en presencia de

2,5 μ L/mL del extracto herbal, concentración que se ubica aproximadamente en la mitad de la primera recta (Figura 1, Tabla 1). En presencia de dicha concentración la $V_{m\acute{a}x}$ aparente de las enzimas citosóllicas y microsómica, disminuyó aproximadamente a la mitad, sin cambios significativos en las K_m aparentes tanto para el GSH como para el sustrato 1-CI-2,4-DNB.

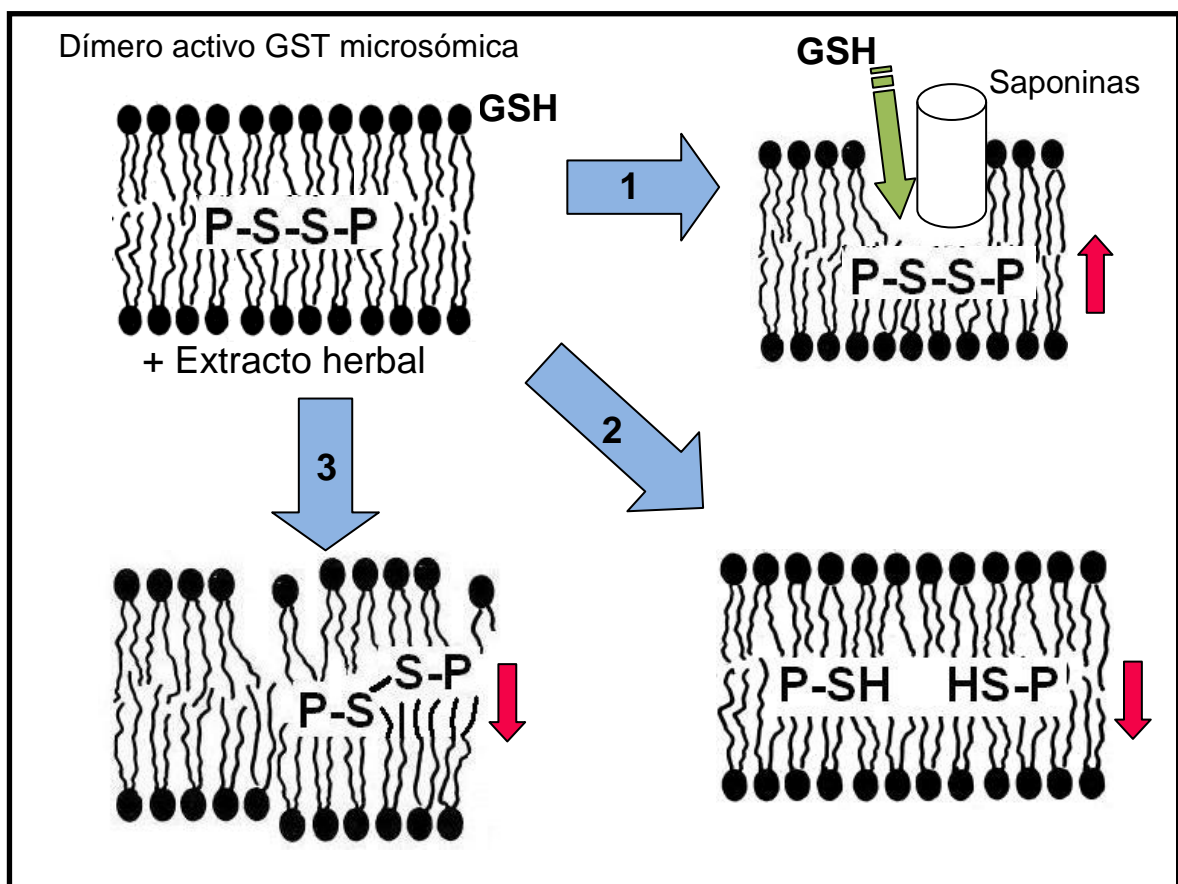


Figura 8. Efecto del extracto de episperma del grano de quínoa sobre la actividad GST microsómica hepática de rata. P-S-S-P: dímero activo GST microsómica. 1: Efecto detergente de las saponinas del extracto herbal sobre la membrana microsómica; 2: Efecto reductor del extracto herbal sobre el dímero catalíticamente activo; 3: Efecto del extracto herbal sobre la membrana microsómica. La flecha roja indica activación o inhibición de la actividad según corresponda.

constituyentes del citosol y de la fracción microsómica (Figura 9). Este proceso reductivo afectaría en mayor extensión a la membrana microsómica, cuya conformación nativa es fundamental para la expresión de la actividad catalítica de la isoforma de la GST inserta en ella (Figura 8). Este postulado puede ser apoyado por el cambio observado en la actividad UDP-glucuroniltransferásica microsómica en presencia de detergentes como el Tritón X-100 [46].

Interesantemente, el extracto de episperma del grano de quínoa parece tener un alto poder reductor de grupos disulfuros comparado con agentes reductores reconocidos como son la N-acetil-cisteína y el DTT (Figura 3). En igualdad de condiciones de ensayo, 2 μ L/mL del extracto herbal provocaron una disminución de las actividades GSH-transferásica citosólica y microsómica significativamente mayor a aquella inducida a concentraciones 1mM de NAC y DTT. Esto nos lleva a postular que concentraciones superiores a 10 μ L/mL de extracto herbal podrían crear un desbalance redox de los componentes proteicos de ambas fracciones subcelulares, citosol y microsomas, incluyendo las isoformas de las GSH-transferasas. Este postulado se ve respaldado por las constantes cinéticas determinadas en presencia de concentraciones de 10 μ L/mL o superiores del extracto herbal. En estas condiciones, la $V_{m\acute{a}x}$ aparente disminuyó ($p < 0,05$) y la K_m aparente para GSH aumentó ($p < 0,05$). Sin embargo, la K_m aparente para el sustrato 1-CI-2,4-DNB, no sufrió cambios significativos (Tabla 1). Cabe agregar que en iguales condiciones de ensayo, catequina 1mM, (polifenol purificado) se comportó también como un agente

reductor menos potente. Un $\mu\text{mol/mL}$ de catequina en la mezcla de reacción (equivalente a $290,3 \mu\text{g/mL}$), cantidad comparada con los $2\mu\text{L/mL}$ de extracto de episperma del grano de quínoa que contienen 18 nmoles equivalentes de catequina/mL produjeron inhibición de ambas actividades GST significativamente diferentes (Figura 3). En este extracto herbal la relación entre las concentraciones de polifenoles y grupos tiólicos fue $\text{Ar-OH/-SH} = 9,3$. Estos resultados estarían indicando que los tioles herbales podrían ser los responsables de la diferencia observada y estarían potenciando el efecto de los polifenoles a través de mecanismos sinérgicos, interviniendo así circuitos tiólicos. En este caso, su capacidad de participar en reacciones redox de forma reversible, les otorga a los tioles una ventaja sobre los polifenoles, ya que su oxidación a quinonas es irreversible.

Cabe discutir que el mecanismo enzimático descrito para la actividad GST es del tipo secuencial – ordenado. Así, el cofactor GSH se une a su sitio de unión en la enzima y luego, se une el sustrato, en este caso el DNB [47]. Esta sería la causa de porqué observamos sólo cambios en la K_m aparente del GSH y no en la del sustrato, en ninguna de las condiciones ensayadas para la determinación de las actividades GST citosólica y microsómica.

Por otra parte, dado que el extracto de episperma del grano de quínoa posee saponinas, el cambio de fluidez que estos compuestos pueden producir en la membrana microsómica, podría ser otra de las causas de la inhibición de la

actividad GSH-transferásica observada. Contrariamente a lo antes postulado, el detergente Tritón X-100 activó la GST microsómica, alcanzándose un máximo de 1,5 veces, a la concentración 0,3% V/V del detergente; mayores concentraciones provocaron una disminución progresiva de esta activación (Figura 2). Este efecto es semejante al observado para la UDP-glucuroniltransferasa, enzima de Fase II, también localizada en el retículo endoplásmico hepático [46].

Por otra parte, resultados recientes del laboratorio mostraron que concentraciones hasta 20 $\mu\text{L/mL}$, no produjeron efecto detergente significativo sobre membrana de glóbulos rojos [31]. Estos antecedentes apoyan la idea de que *el poder reductor de este extracto herbal, prima como mecanismo de acción frente a la inhibición enzimática observada.*

Existen antecedentes que demuestran que alteraciones redox de los circuitos tiólicos son una de las causas principales del envejecimiento y las enfermedades asociadas a este proceso [19]. Nuevos experimentos se están llevando a cabo para seleccionar diferentes preparados herbales que, previamente estandarizados, nos permitan realizar estudios preclínicos y luego clínicos.

V. CONCLUSIONES

1. El extracto de episperma del grano de quínoa produjo inhibición de las actividades GST citosólica y microsómica de hígado de rata.
2. Esta inhibición fue concentración dependiente y presentó un comportamiento bimodal.
3. La primera pendiente de inhibición que ocurre a bajas concentraciones del extracto herbal ($<10\mu\text{L}/\text{mL}$) parece responder al efecto reductor de enlaces disulfuros presentes en las formas activas de la GST.
4. Este efecto reductor estaría dado por la presencia de tioles en el extracto y no por la de los polifenoles del mismo.
5. La segunda pendiente de inhibición que ocurre a concentraciones mayores a $10\mu\text{L}/\text{mL}$ del extracto herbal, parece ser la consecuencia de modificaciones redox mayores sobre las moléculas de enzima, como también cambios conformacionales de la membrana microsómica, la cual es afectada por la acción de las saponinas presentes en el extracto herbal.
6. Los cambios en la K_m aparente para GSH y no observados para el sustrato DNB, apoyan los postulados antes mencionados.

VII. REFERENCIAS

- [1] Benzie IF (2000) Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur J Nutr* 39: 53-61.
- [2] Deneke SM (2000) Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Regul* 36: 151-180.
- [3] De Gara L, Locato V, Dipierro S, de Pinto MC (2010) Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respir Physiol Neurobiol* 173 Suppl: S13-19.
- [4] Kornas A, Kuzniak E, Slesak I, Miszalski Z (2010) The key role of the redox status in regulation of metabolism in photosynthesizing organisms. *Acta Biochim Pol* 57: 143-151.
- [5] Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel CA, Mi HM (2008) Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C R Biol* 331: 433-441.
- [6] Bors W, Michel C (2002) Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann N Y Acad Sci* 957: 57-69.
- [7] Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* 31: 435-445.
- [8] Sies H (2010) Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch Biochem Biophys* 501: 2-5.
- [9] Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30: 1191-1212.
- [10] Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492.

- [11] Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C849-868.
- [12] Newcomb M, Chandrasena RE (2005) Highly reactive electrophilic oxidants in cytochrome P450 catalysis. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 394-403.
- [13] Klaassen CD, Reisman SA (2010) Nrf2 to the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 244: 57-65.
- [14] LoPachin RM, Barber DS (2006) Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxicants. *Toxicol Sci* 94: 240-255.
- [15] van Welie RT, van Dijck RG, Vermeulen NP, van Sittert NJ (1992) Mercapturic acids, protein adducts, and DNA adducts as biomarkers of electrophilic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 22: 271-306.
- [16] Coles BF, Kadlubar FF (2003) Detoxification of electrophilic compounds by glutathione *S*-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? *Biofactors* 17: 115-130.
- [17] Armstrong RN (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10: 2-18.
- [18] Rinaldi R, Eliasson E, Swedmark S, Morgenstern R (2002) Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. *Drug Metab Dispos* 30: 1053-1058.
- [19] Masella R, Mazza G (2009) Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease. Wiley, Hoboken.
- [20] Banerjee R (2008) Redox biochemistry. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.

- [21] Wouters MA, Fan SW, Haworth NL (2010) Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal* 12: 53-91.
- [22] Benzie IF (2000) Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur J Nutr* 39: 53-61.
- [23] Mujica A (1984) Andean grains and legumes. In: J.E. Hernando Bermujo, J. Leon (eds), *Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective*, FAO, Rome, Italy pp. 131-148.
- [24] Wright KH, Huber KC, Fairbanks DJ, Huber CS (2002) Isolation and characterization of *Atriplex hortensis* and sweet *Chenopodium quinoa* starches. *Cereal Chem* 79(5): 715-719.
- [25] Repo-Carrasco R, Espinoza C, Jacobsen SE (2003) Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Rev Int* 19(1–2): 179-189.
- [26] Girma MW, Wink M (2001) Identification and Biological Activities of Triterpenoid Saponins from *Chenopodium quinoa*. *J Agric Food Chem* 49: 2327-2332.
- [27] Comai S, Bertazzo A (2007) The content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours. *Food Chem* 100: 1350-1355.
- [28] Kuljanabhadgavad T, Wink M (2009) Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochem Rev* 8: 473-490.
- [29] Reichert RD, Tatarynovich JT, Tyler RT (1986) Abrasive Dehulling of Quinoa (*Chenopodium quinoa*): Effect on Saponin Content as Determined by an Adapted Hemolytic Assay. *Cereal Chem* 63(6): 471-475

- [30] Gee JM, Price KR, Ridout IT, Johnson IT, Fenwick GR (1989) Effects of some purified saponins on transmural potential difference in mammalian small intestine. *Toxicol In Vitro* 3: 85–89.
- [31] Letelier ME, Rodríguez C, Sánchez-Jofré S, Aracena-Parks P (2011) Surfactant and antioxidant properties of a standardized *Chenopodium quinoa* Wild extract. *J Cereal Res* 53: 239-243.
- [32] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 51-88.
- [33] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB(1974) Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
- [34] Aniya Y, Anders MW (1992) Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by hydrogen peroxide: role for protein-dimer formation. *Arch Biochem Biophys* 296: 611-616.
- [35] Shen H, Tsuchida S, Tamai K, Sato K (1993) Identification of cysteine residues involved in disulfide formation in the inactivation of glutathione transferase P-form by hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 300: 137-141.
- [36] Ricci G, Del Boccio G, Pennelli A, Lo Bello M, Petruzzelli R, Caccuri AM, Barra D, Federici G (1991) Redox forms of human placenta glutathione transferase. *J Biol Chem* 266: 21409-21415.
- [37] Fraga CG (2007) Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life* 59: 308-315.
- [38] Letelier ME, Molina-Berrios A, Cortes-Troncoso J, Jara-Sandoval J, Müller A, Aracena-Parks P (2010) Comparative effects of superoxide anion and hydrogen peroxide on microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities of rat liver. *Biol Trace Elem Res* 134: 203-211.

- [39] Aniya Y, Anders MW (1989) Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by reduced oxygen species. *J Biol Chem* 264: 1998-2002.
- [40] Aniya Y, Naito A (1993) Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem Pharmacol* 45: 37-42.
- [41] Letelier ME, Lepe AM, Faundez M, Salazar J, Marin R, Aracena P (2005) Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem Biol Interact* 151: 71-82.
- [42] Letelier ME, Martinez M, Gonzalez-Lira V, Faundez M, Aracena-Parks P (2006) Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper. *Chem Biol Interact* 164: 39-48.
- [43] Letelier ME, Sánchez-Jofré S, Peredo-Silva L, Cortés-Troncoso J, Aracena-Parks P (2010) Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chem Biol Interact* 188: 220-227.
- [44] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- [45] Letelier ME, Molina-Berrios A, Cortés-Troncoso J, Jara-Sandoval JA, Müller A, Aracena-Parks A (2010) Comparative effects of superoxide anion and hydrogen peroxide on microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities of rat liver. *Biol Trace Elem Res* 134(2): 203-211.
- [46] Letelier ME, Pimentel A, Pino P, Lepe AM, Faúndez M, Aracena P, Speisky H (2005) Microsomal UDP-Glucuronyltransferase in Rat Liver: Oxidative Activation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96: 480–486.
- [47] Ketley JN, Habig WH, Jakoby WB (1975) Binding of nonsubstrate ligands to the glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 250(22): 8670-8673.