



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Laboratorio de Farmacología y Toxicología

**ACTIVACIÓN OXIDATIVA DE UDP-GLUCURONILTRANSFERASA:
EFECTO DE AGENTES REDUCTORES SINTÉTICOS Y
EXTRACTOS HERBALES**

Prof. Director

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

Prof. 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

ELÍAS FELIPE INZUNZA ARAYA

Santiago de Chile

2016

*Para Dios, y todas las personas que
han estado a lo largo de toda mi
formación tanto profesional como
personal, en especial a mis padres,
ya que sin ellos no hubiese llegado
hasta donde hoy estoy.*

AGRADECIMIENTOS

Agradecer primero a Dios porque siempre me da su protección, su ayuda y ha dispuesto todo en mi camino para poder llegar a esta instancia. A mis padres: Ernesto y Any, a mi familia, quienes me brindaron de todo para mi crecimiento personal y académico.

Agradecer a la Profesora María Eugenia Letelier, por todas sus enseñanzas y por permitir realizar este trabajo de memoria de título contando siempre con su disposición. A don José Riquelme y a todo el equipo del laboratorio de Farmacología y Toxicología, con lo que estuvimos todo el año trabajando, divirtiéndonos y aprendiendo.

Agradecer a las que me acompañaron los 5 duros años de la carrera, en los que reímos, lloramos y trabajamos duro por lograr nuestras metas: Camila, Constanza y Gilliam.

Agradecer a todos mis amigos por siempre sacarme una sonrisa, darme su compañía, vivir momentos entretenidos, que me ayudaron en muchas ocasiones a seguir adelante.

ABREVIATURAS

UDPGT	: UDP- glucuroniltransferasa.
UDPGA	: Ácido UDP-glucurónico.
EROs	: Especies Reactivas del Oxígeno.
DTT	: Ditioneitol.
GSH	: Glutación reducido.
PAPS	: Fosfo-adenosin-fosfo-sulfato.
GSHT	: Glutación-transferasa.
TBA	: <i>Thiobarbituric acid</i> (Ácido tiobarbitúrico).
TBARS	: Sustancias Reactivas al Ácido tiobarbitúrico.
MDA	: Malondialdehído.
TCA	: Ácido tricloroacético.
DTNB	: Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico).
TNB	: Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico.
PNP	: <i>p</i> -nitrofenol.

ÍNDICE GENERAL

PORTADA.....	Pág. I
DEDICATORIA.....	Pág. II
AGRADECIMIENTOS.....	Pág. III
ABREVIATURAS.....	Pág. IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	Pág. VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	Pág. VIII
RESUMEN.....	Pág. IX
ABSTRACT.....	Pág. X
I. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 1
Hipótesis.....	Pág. 4
Objetivos.....	Pág. 5
1. Objetivo General.....	Pág. 5
2. Objetivos Específicos.....	Pág. 5
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	Pág. 5
Reactivos.....	Pág. 5
Animales de experimentación.....	Pág. 6
Preparación de microsomas hepáticos de rata.....	Pág. 6
Cuantificación de Polifenoles.....	Pág. 8
Lipoperoxidación microsómica.....	Pág. 8
Determinación de tioles microsómicos.....	Pág. 10
Capacidad quelante de extractos herbales.....	Pág. 11
Condiciones oxidativas.....	Pág. 11
Conjugación de <i>p</i> -nitrofenol (PNP) con UDPGA.....	Pág. 11
Análisis estadístico.....	Pág. 12

III. RESULTADOS.....	Pág. 13
Determinación del contenido polifenólico de extractos herbales.....	Pág. 13
Efecto antioxidante de los extractos herbales sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato.....	Pág. 14
Efecto de los extractos herbales sobre la oxidación de tioles microsómicos provocada por el sistema oxidante Cu^{+2} /ascorbato.....	Pág. 16
Capacidad de los extractos herbales de quelar Cu^{+2}	Pág. 18
Efecto de los extractos herbales sobre la activación oxidativa de la UDPGT.....	Pág. 21
A. Inhibición de la actividad UDPGT por los extractos herbales.....	Pág. 21
B. Inhibición de la Activación oxidativa de la UDPGT por los extractos herbales.....	Pág. 21
Efecto de agentes reductores tiólicos sobre la activación de la UDPGT inducida por Cu^{+2} /ascorbato.....	Pág. 26
IV. DISCUSIÓN.....	Pág. 27
V. CONCLUSIONES.....	Pág. 32
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 33

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Título de la Figura</i>	<i>Página</i>
1	Efecto de los extractos herbales sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato.	15
2	Correlación entre la concentración de polifenoles y el efecto anti-lipoperoxidante de los extractos.	16
3	Efecto de los extractos herbales sobre la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato.	17
4	Espectros de Absorbancia de Cu^{2+} en presencia de extractos herbales.	19
5	Efecto de los extractos herbales sobre la actividad UDPGT.	23
6	Efecto temporal de Cu^{+2} /ascorbato sobre la actividad UDPGT.	24
7	Efecto de agentes reductores tiólicos sobre la activación oxidativa de la UDPGT.	26

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla</i>	<i>Título de la Tabla</i>	<i>Página</i>
1	CONTENIDO DE POLIFENOLES EN EXTRACTOS HERBALES.	14
2	VALORES DE IC ₅₀ DE LOS EXTRACTOS HERBALES PARA LA INHIBICIÓN POR SUSTRATO DE LA ACTIVIDAD UDPGT.	24
3	EFEECTO DE LOS EXTRACTOS HERBALES SOBRE LA ACTIVACIÓN OXIDATIVA DE LA UDPGT.	25

ACTIVACIÓN OXIDATIVA DE UDP-GLUCURONILTRANSFERASA: EFECTO DE AGENTES REDUCTORES SINTÉTICOS Y EXTRACTOS HERBALES. La UDP-glucuroniltransferasa (UDPGT) es una enzima tiólica. Su forma activa tiene 10 cisteínas; 3 de ellas están localizados hacia el citoplasma y estarían involucradas en el ingreso del cofactor UDPGA al retículo endoplásmico. Asimismo, residuos cisteinílicos orientados hacia el lumen de la cisterna serían los involucrados en la actividad catalítica y en la activación de la UDPGT. Muchos de los productos de biotransformación del sistema CYP450 son sustratos de la UDPGT. La biotransformación de diferentes fármacos a través de este sistema genera estrés oxidativo, condición en la cual su actividad catalítica se inhibe, en cambio la UDPGT se activa. Esto puede provocar una alteración en la biotransformación de fármacos, especialmente de aquellos lipofílicos. Por lo tanto, nuestro interés fue determinar la actividad UDPGT microsómica de hígado de rata en presencia y ausencia de Cu^{2+} /ascorbato, sistema que genera EROs a través de las reacciones de Haber Weiss/Fenton. Además, comparamos la capacidad de agentes reductores sintéticos y naturales de prevenir la activación de la UDPGT.

En nuestras condiciones de ensayo la UDPGT microsómica fue activada por Cu^{+2} /ascorbato, fenómeno que fue inhibido en distinta extensión por diferentes extractos herbales. Estos extractos previnieron, además, la oxidación de los lípidos y tioles proteicos microsómicos. Más aún, el efecto antioxidante de los extractos herbales fue significativamente mayor que el de los agentes reductores sintéticos ensayados: DTT y GSH. Estos resultados nos parecen importantes desde el punto de vista farmacocinético y farmacodinámico. La administración de preparados herbales asociada a fármacos sintéticos que generan estrés oxidativo a través de su biotransformación, podría evitar no sólo la alteración de las enzimas de biotransformación, sino, además, los efectos adversos que de estos cambios redox derivan, como también evitar cambios negativos en la eficacia terapéutica de los fármacos.

OXIDATIVE ACTIVATION OF UDP-GLUCURONYLTRANSFERASE: EFFECTS OF SYNTHETIC AND HERBAL EXTRACTS REDUCING AGENTS.

UDP-Glucuronyltransferase (UDPGT) is a thiolic enzyme. Its active form has 10 cysteines; 3 of them are located towards the cytoplasm and would be involved in the entrance of the cofactor UDPGA to the endoplasmic reticulum. Likewise, cysteine residues oriented towards the lumen of the cistern would be involved in the catalytic activity as well as in the activation of the UDPGT. Many of the biotransformation products of the CYP450 system are substrates of UDPGT. The biotransformation of different drugs through this system generates oxidative stress, a condition in which its catalytic activity is inhibited, whereas the UDPGT is activated. This may cause an alteration in the biotransformation of drugs, especially of those more lipophilic. Therefore, our interest was to determine the microsomal UDPGT activity of rat liver in the presence and absence of Cu^{2+} /ascorbate system, which generate ROS through Haber Weiss/Fenton reaction. In addition, we compared the ability of synthetic and natural reducing agents to prevent the activation of UDPGT.

In our assay conditions, microsomal UDPGT was activated by Cu^{+2} / ascorbate, a phenomenon that was inhibited to different extent by the herbal extracts tested. These extracts also prevented the oxidation of microsomal lipids and thiols. Moreover, the antioxidant effect of the herbal extracts was significantly greater than that of the synthetic reducing agents tested: DTT and GSH. From a pharmacokinetic and pharmacodynamic point of view, these results are important. The administration of herbal preparations associated with synthetic drugs that generate oxidative stress through its biotransformation could avoid not only the alteration of the biotransformation enzymes but also the adverse effects that derive from these redox changes as well as changes in the therapeutic efficacy of the drugs.

I. INTRODUCCIÓN

Los xenobióticos son compuestos externos o exógenos que nuestro organismo debe eliminar. Entre estos compuestos se encuentran los fármacos, especialmente aquellos lipofílicos, los cuales requieren ser metabolizados a compuestos polares e hidrosolubles para poder ser eliminados por la orina, principal vía de eliminación de los organismos animales.

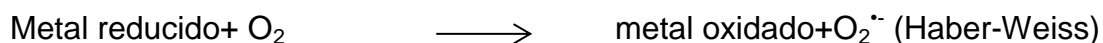
Las enzimas que catalizan la biotransformación de xenobióticos se pueden encontrar en diversos órganos del cuerpo, siendo el hígado el sitio más importante. A nivel subcelular, el retículo endoplásmico es el principal organelo encargado de esta función biológica. Existen dos tipos fundamentales de reacciones de biotransformación: fase I y fase II. Las enzimas responsables del metabolismo de fase I catalizan cambios funcionales en la molécula del fármaco, siendo el sistema oxidativo del CYP450, el principal sistema biotransformante de fase I. Este sistema metaboliza compuestos lipofílicos e involucra reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis [1-3].

El metabolismo de Fase II implica la conjugación de un cofactor endógeno a una molécula de xenobiótico que posee un grupo funcional característico. Las enzimas que cumplen con esta función se conocen como transferasas [1-3]. Ejemplos de las principales enzimas que participan habitualmente en fase II son: a) la UDP-glucuroniltransferasa (UDPGT), enzima microsómica que utiliza como cofactor endógeno, el ácido glucurónico activado (ácido UDP-glucurónico: UDPGA), b) la sulfotransferasa, enzima citosólica que utiliza como cofactor endógeno, sulfato activado (Fosfo-adenosin-fosfo-sulfato: PAPS) y la Glutatiónttransferasa (GSHT) enzima que utiliza glutatiónt (GSH) como cofactor endógeno.

UDP-glucuroniltransferasa (UDPGT). Esta enzima cataliza la transferencia de ácido α -glucurónico a un fármaco que tiene en su estructura grupos hidroxilos fenólicos o alcohólicos, grupos carboxilos y aminas aromáticas [4-8]. Esta enzima presenta diferentes isoformas las cuales se encuentran localizadas a nivel de retículo endoplásmico hepático. Entre estas isoformas las que aparecen como más importantes son la UDPGT 1A y UDPGT A2 [8-10]. Deficiencias genéticas de estas isoformas conducen a serios problemas patológicos. Uno de ellos es el síndrome de Gilbert que puede ser definido como un trastorno genético benigno del hígado. Este síndrome produce una ictericia familiar en la edad adulta debido a una hiperbilirrubinemia que implica aumento de la bilirrubina no conjugada circulante causada por un déficit parcial de la enzima glucuroniltransferasa. Cabe destacar que la bilirrubina se elimina por la orina como diglucurónido, por lo tanto, no conjugada, no se puede eliminar. Es una enfermedad leve, crónica, intermitente, que ocurre en ausencia de hemólisis o enfermedad hepatobiliar intrínseca, generalmente manifestada en la segunda década de la vida como único signo en el examen físico y habitualmente como un hallazgo casual. Entre el 3% y el 10% de la población general está afectado por esta enfermedad. La mutación causante ha sido identificada y afecta al promotor del gen que codifica dicha enzima, sin afectar a la estructura de la proteína [11].

La UDPGT es una enzima tiólica; su forma activa tiene 10 cisteínas. Tres de los residuos de cisteína están localizados en el extremo C terminal orientado hacia el citoplasma, los cuales estarían involucrados en el ingreso del cofactor UDPGA al retículo endoplásmico. Por otra parte, existen residuos cisteinílicos en esta enzima que se ubican hacia el lumen de la cisterna del retículo endoplásmico, las cuales estarían involucradas en la actividad catalítica de la UDPGT. Más aún, estas cisteínas jugarían un papel en la activación de esta enzima provocada por agentes pro-oxidantes tales como los sistemas Cu^{+2} /ascorbato y Fe^{+3} /ascorbato [7-8].

Los iones Cu^{2+} y Fe^{3+} , en presencia de un agente reductor como ascorbato, son reducidos a Cu^{1+} y Fe^{2+} , respectivamente. Estas especies reducidas catalizan la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) a través de las reacciones de Haber-Weiss y/o Fenton [7-8].



Cabe destacar que los primeros estudios de activación de la UDPGT fueron obtenidos en presencia de diferentes detergentes. Esto hizo pensar a los investigadores que la activación observada de la enzima sería la consecuencia del cambio de fluidez de la membrana del retículo endoplásmico. Este cambio facilitaría el ingreso a la membrana del UDPGA, cofactor citosólico de la UDPGT. Esta teoría se conoce con el nombre de *teoría de compartimentalización* [12-15]. En la década del 2000 sin embargo, aparecieron nuevos estudios acerca de la activación de la UDPGT. Ellos demostraron que los mecanismos involucrados en la activación provocada por detergentes podrían responder a la teoría de compartimentalización, en cambio, la activación observada en presencia de agentes oxidantes se relacionaría con un cambio en el estado redox de algunos grupos tiólicos de la UDPGT [7-8].

La mayoría de los productos de biotransformación del sistema oxidativo del CYP450 son sustratos de la UDPGT. Más aún, la biotransformación de diferentes fármacos a través del sistema CYP450 genera estrés oxidativo, fenómeno que se conoce como bioactivación [7,16]. En condiciones de estrés oxidativo la actividad del sistema CYP450 se inhibe, en cambio la UDPGT se activa. Esto puede provocar una alteración en la biotransformación de fármacos, especialmente de aquellos más lipofílicos, lo cual se puede traducir

en cambios en la farmacocinética y farmacodinamia de ellos. Por lo tanto, nuestro interés en el trabajo de esta memoria de título, es determinar la actividad UDPGT microsómica de hígado de rata en presencia y ausencia de Cu^{2+} /ascorbato; condición que genera estrés oxidativo y, por tanto, activación de la UDPGT. Además, compararemos la capacidad de agentes reductores sintéticos y naturales de prevenir este fenómeno redox. Los resultados se relacionarán con el efecto que la activación de la UDPGT puede tener sobre la farmacocinética y farmacodinamia de fármacos.

Hipótesis

Agentes reductores, ya sea sintéticos o naturales, disminuyen la activación oxidativa de la UDPGT. Además, disminuyen la oxidación de los lípidos y tioles proteicos de los microsomas hepáticos de rata, donde esta enzima se encuentra inserta.

Objetivos

Objetivo General: Estudiar el efecto oxidativo del sistema Cu^{2+} /ascorbato (génesis de EROs) sobre los lípidos, el contenido de tioles y la actividad UDP-glucuroniltransferasa de los microsomas hepáticos de rata, en presencia y ausencia de agentes reductores.

Objetivos Específicos:

- Determinar la lipoperoxidación microsómica en presencia del sistema Cu^{2+} /ascorbato y, además, en presencia de extractos herbales.
- Determinar el contenido de tioles totales microsómicos en presencia del sistema Cu^{2+} /ascorbato y, además, en presencia de extractos herbales.
- Determinar la actividad UDPGT en presencia y ausencia del sistema Cu^{2+} /ascorbato y además en presencia de extractos herbales.
- Evaluar el efecto sobre la actividad de la UDPGT de GSH, DTT.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

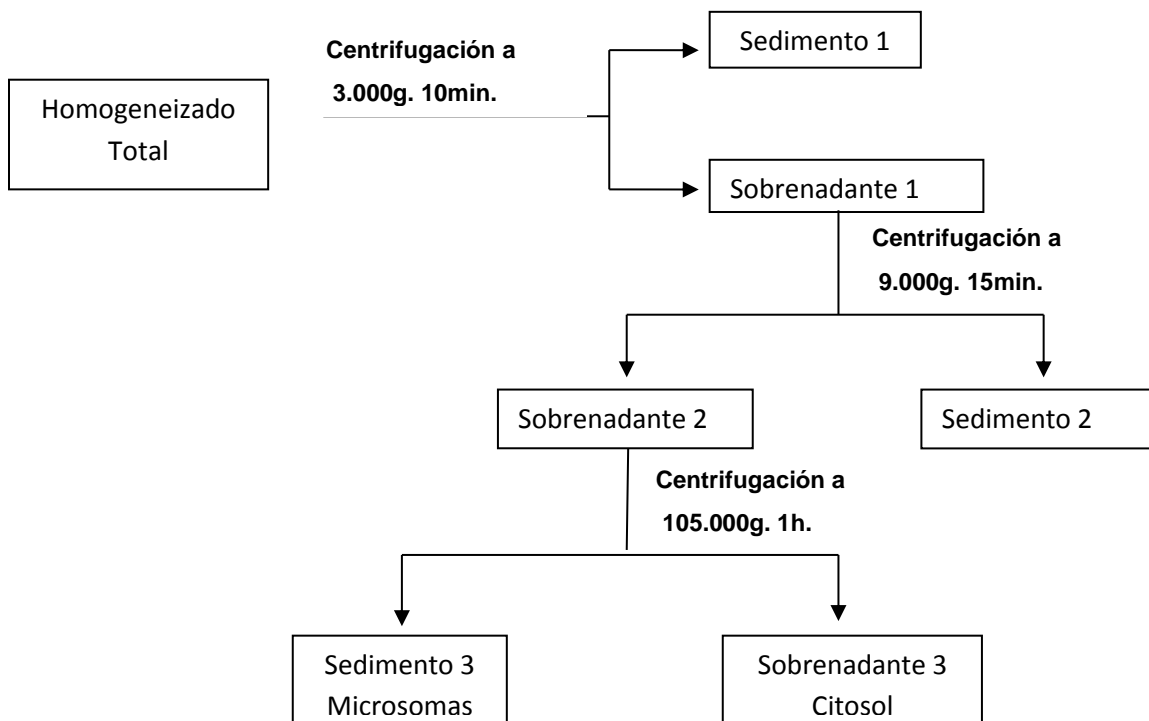
Reactivos. Catequina [(+)-cianidol-3, (2R, 3S)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2H)-benzopiran-3, 5,7-triol], ascorbato de sodio, *p*-nitrofenol (PNP) 10mM, ácido uridin-difosfato glucurónico (UDPGA) se obtendrán de Sigma-Aldrich. El ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), la albúmina sérica de bovino (Fracción IV), glutatión (GSH), ditioneitol (DTT) fueron obtenidos en Sigma Chemical Co (EE.UU.). El ácido tricloroacético (TCA), el ácido tiobarbitúrico (TBA), el CuSO_4 y el reactivo de Folin-Ciocalteau fueron adquiridos en Merck (Chile). El resto de los reactivos utilizados fueron del mejor grado analítico.

Los extractos herbales testeados fueron donados por Laboratorios Ximena Polanco (Santiago, Chile). Ellos correspondieron a extractos secos de *Melissa officinalis* (melisa), *Aristotelia chilensis* (maqui), *Buddleja globosa* (matico) y *Rosmarinus officinalis* (romero) diluidos en excipiente. El contenido de droga vegetal de los extractos es información privada de la empresa. Soluciones de todos los extractos fueron preparadas al 0,1% en una mezcla etanol: agua = 1:1. Estas soluciones fueron las utilizadas en el desarrollo de los diferentes experimentos.

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 Medicina 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.

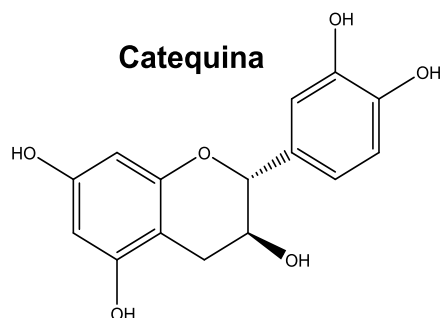
Preparación de microsomas hepáticos de rata. Esta fracción subcelular fue preparada de acuerdo a Letelier y cols., 2010 [17]. (Ver Esquema 1) Las ratas fueron sometidas a ayuno por 15h con agua *ad libitum* y sacrificadas por decapitación. Los hígados fueron perfundidos *in situ* con NaCl 0,9% p/V, removidos por incisión, y puestos en hielo. Todos los procedimientos de homogeneización y fraccionamiento fueron realizados a 4°C, y todas las centrifugaciones fueron realizadas usando ya sea una centrifuga con refrigeración Hermle modelo Z326K o una ultracentrifuga Beckman modelo XL-90. El tejido hepático carente del tejido conectivo y vascular, fue homogeneizado con 4 volúmenes de KCl 0,154M, 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, descartado. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000g por 60min (ver esquema a continuación). El pellet (microsomas) fue almacenado a -80°C en un freezer - Il Shin modelo DF8514 hasta su uso. La cuantificación de la proteína microsómica se determinó por el método de Lowry y cols., 1951 [18], utilizando albúmina sérica de bovino (fracción IV) como estándar.



Esquema 1. Preparación de microsomas hepáticos de rata.

Cuantificación de Polifenoles. La determinación de polifenoles totales se realizó de acuerdo al método de Letelier y cols., 2009b con una sola modificación [19]. Este método utiliza catequina como estándar.

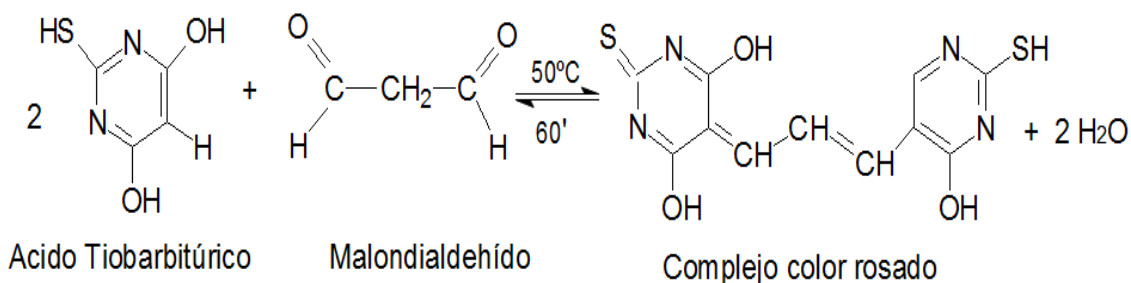


En un volumen final de 5mL la mezcla de reacción contenía: diferentes concentraciones de los agentes reductores, 100 μ L de reactivo Folin Ciocalteau, 300 μ L de carbonato de sodio 20% p/V y agua destilada suficiente para completar 5mL. El blanco contenía todos los reactivos con excepción de los extractos herbales. Todas las mezclas así obtenidas se incubaron a oscuridad durante 2h. Al finalizar este periodo, la absorbancia de las muestras se registró a 760nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS, usando los blancos respectivos como referencia. La linealidad del método se analizó realizando una curva de calibración utilizando catequina como estándar.

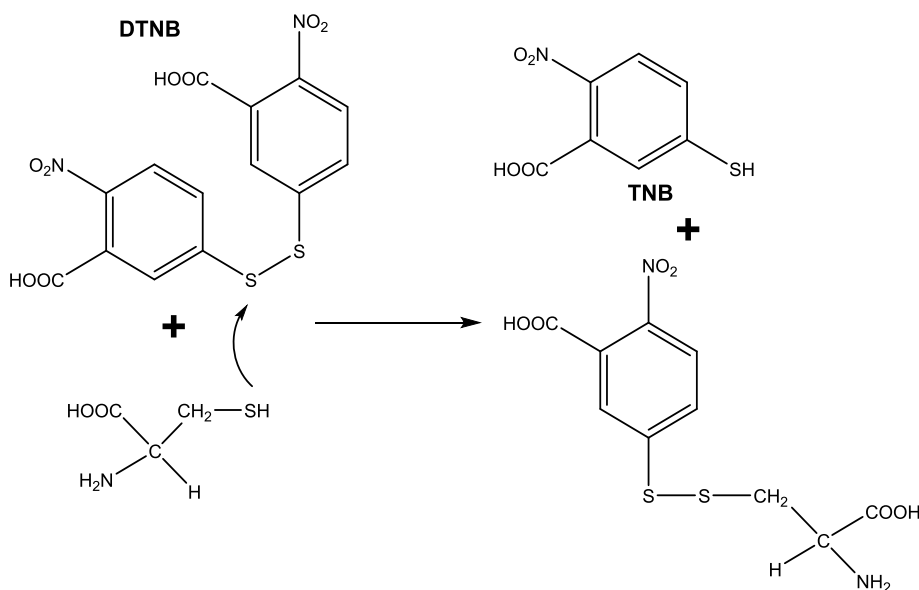
Lipoperoxidación microsómica: La lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato se estimó determinando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método descrito por Aracena y cols., 2014 [20]. El malondialdehído (MDA), generado como producto de la descomposición de los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado, el cual posee una absorbancia máxima a 532nm ($\xi_{532} = 156.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Las mezclas de reacción contenían en concentraciones finales: microsomas (0,5mg de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato 50mM, pH 7,4 las cuales fueron preincubadas con los extractos herbales durante 5min a 37°C antes de agregar el sistema oxidante Cu²⁺/ascorbato. Las cantidades de extracto seco utilizadas en estos experimentos fueron: *Rosmarinus officinalis*, 1,25 µg; *Aristotelia chilensis*, 1,25µg; *Buddleja globosa*, 2,5µg, *Melissa officinalis*, 5µg.

Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Muestras y blancos fueron incubados en un baño termostático Julabo SW-21C, durante 40min a 37°C con agitación constante. Al cabo de este período, se les adicionó 0,3mL de TCA 20% p/V frío (4°C). Luego, fueron centrifugados a 10.000g durante 10min a 4°C en una centrífuga Hermle, modelo Z326K. Alícuotas de 0,5mL de los sobrenadantes de las muestras y los blancos fueron mezcladas con 0,5mL de TBA 35mM y luego, incubadas durante 60min a 50°C para el desarrollo de color. Al término de este periodo, se registró la absorbancia de las muestras a 532nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS, usando los blancos como referencia. Los resultados fueron expresados en porcentaje de lipoperoxidación residual.



Determinación de tioles microsómicos. La medición de los tioles microsómicos se realizará de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y cols., 2005b [21]. Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) liberado en la reacción entre DTNB y los grupos sulfidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412nm y su coeficiente de extinción es $13.600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.



La mezcla de reacción contenía los reactivos siguientes en un volumen final de 1mL (concentraciones finales): amortiguador fosfato de potasio 50mM, pH 7,4; proteína microsómica 0,5mg/mL y DTNB 0,3mM. Las mezclas de reacción contenían microsomas (0,5mg/mL de proteína) los cuales fueron preincubadas con los agentes reductores durante 5min a 37°C antes de agregar el sistema oxidante Cu^{2+} /ascorbato. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Muestras y blancos fueron incubados en un baño termorregulador Julabo SW-21C, durante 1h a 37°C con agitación

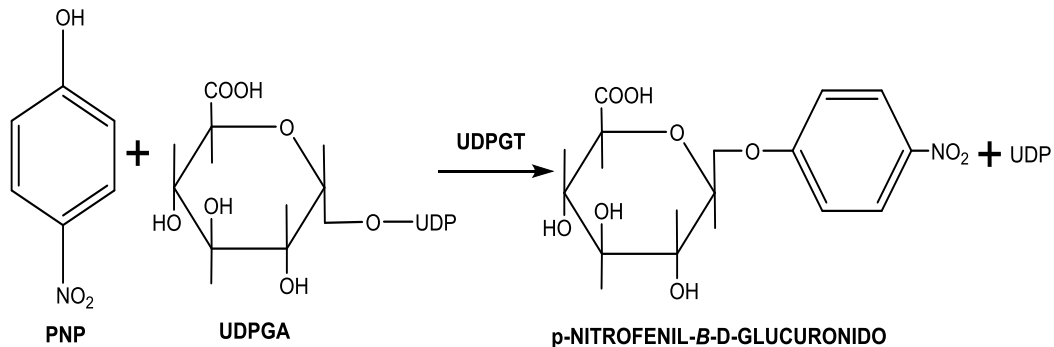
constante. Posteriormente se añadió DTNB 0,3mM y se incubó durante 30min a 37°C. A continuación, se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente y las absorbancias se leyeron a 412nm en un espectrofotómetro Unicam UV /VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos.

Capacidad quelante de extractos herbales. La actividad quelante fue determinada de acuerdo a lo descrito por Letelier y cols., 2015 [22]. Para esto, se determinó el espectro de CuSO₄ entre 200-800nm y en presencia y ausencia de los extractos herbales. Los blancos contenían todos los reactivos con excepción de CuSO₄ 0,25mM.

Condiciones oxidativas: Se utilizó CuSO₄ 25μM y ascorbato 1mM como sistema generador de EROs, ambas concentraciones finales en la mezcla de reacción. Los microsomas hepáticos fueron preincubados con el sistema oxidante antes de realizar cada experimento; los tiempos de preincubación de cada uno de ellos se indican en resultados.

Conjugación de *p*-nitrofenol (PNP) con UDPGA. La actividad UDP-glucuroniltransferásica se determinó por la técnica descrita en Letelier y cols, (2007) [8] utilizando el *p*-nitrofenol como sustrato. La actividad se estableció midiendo el *p*-nitrofenol remanente en la mezcla de reacción, aprovechando las propiedades espectroscópicas de este compuesto en medio alcalino; en estas condiciones absorbe fuertemente a 410nm, propiedad que se pierde al ser conjugado con UDPGA.

La reacción química es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía los siguientes reactivos (concentraciones finales en 0,5mL): amortiguador Tris 50mM, MgCl₂ 4,0mM, pH 8; 1mg de proteína microsómica; PNP 0,5mM; UDPGA 2,0mM. El blanco contenía todos los reactivos con excepción del UDPGA. La reacción se inició agregando el UDPGA. Las muestras se incubaron durante 15min a 37°C en un baño termostático con agitación constante. La reacción se detuvo agregando 0,5mL de TCA al 10% p/V. Las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación a 10.000g durante 10min en una centrifuga Heraeus Biofuge 15R a 4°C. Luego, se extrajeron alícuotas de 0,25mL de los sobrenadantes y se desarrolló el color agregando 2,6mL de NaOH 0,5M. Posteriormente se leyeron las absorbancias a 410nm en un espectrofotómetro Unicam UV/VIS Modelo UV3 acoplado a un computador. La cantidad de *p*-nitrofenil-glucurónido formado en la reacción enzimática (nmoles de glucurónido formado por mg de proteína microsómica), fue calculada a partir de la diferencia entre la absorbancia del blanco y el remanente en la muestra al término del ensayo enzimático.

Análisis estadístico. Todos los valores experimentales representan la media de al menos 3 experimentos independientes \pm DE de las observaciones de las muestras en relación con sus promedios (test de Student). Se exigió en cada caso un 95% de certeza.

III. RESULTADOS

Determinación del contenido polifenólico de extractos herbales. La forma de comercialización de las plantas medicinales es muy variada: hoja seca triturada, extractos líquidos, tinturas madre, etc. Por lo tanto, la cantidad de polifenoles ya sea en la droga vegetal seca como en los extractos secos con o sin excipientes, es diferente. Esta es la razón de porqué los resultados están expresados como: a) Equivalentes de catequina/g de droga vegetal; b) Equivalentes de catequina/g de extracto seco sin excipientes; c) Equivalentes de catequina/g de extracto seco más excipiente (Tabla 1).

Concordante con lo anteriormente expuesto, el contenido polifenólico de los extractos varió dependiendo de la expresión de concentración utilizada. (Tabla1). Al expresar este contenido como mg equivalentes de catequina/g de extracto seco más excipiente, el contenido de polifenoles de los extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Aristolelia chilensis*, *Buddleja globosa* y *Melissa officinalis* fue: $177,4 \pm 9,73$; $138,2 \pm 9,42$; $125,6 \pm 3,35$; $96,8 \pm 4,74$, respectivamente. Al expresar estos resultados como mg equivalentes de catequina/g de extracto seco sin excipiente, el contenido de polifenoles para *Melissa officinalis*, *Aristolelia chilensis*, *Buddleja globosa*, *Rosmarinus officinalis* fue $914,7 \pm 44,74$; $511,7 \pm 34,89$; $448,6 \pm 11,99$; $436,0 \pm 23,91$, respectivamente. Asimismo, al expresar el contenido de polifenoles como mg equivalentes de catequina/g de droga vegetal, el contenido de polifenoles de los extractos herbales de *Buddleja globosa*, *Melissa officinalis*, *Aristolelia chilensis* y *Rosmarinus officinalis* $224,3 \pm 5,99$; $156,1 \pm 7,63$; $135,5 \pm 9,26$ y $61,0 \pm 3,37$, respectivamente.

TABLA 1. CONTENIDO DE POLIFENOLES EN EXTRACTOS HERBALES

Expresión de concentración	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Aristotelia chilensis</i>	<i>Buddleja globosa</i>	<i>Melissa officinalis</i>
mg equivalentes de catequina/g droga vegetal	61,0 ± 3,37	135,5 ± 9,26	224,3 ± 5,99	156,1 ± 7,63
mg equivalentes de catequina/g extracto seco sin excipientes	436,0 ± 23,91	511,7 ± 34,89	448,6 ± 11,99	914,7 ± 44,74
mg equivalentes de catequina/g extracto seco + excipientes	177,4 ± 9,73	138,2 ± 9,42	125,6 ± 3,35	96,8 ± 4,74

La determinación de polifenoles se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± D.E.

Efecto antioxidante de los extractos herbales sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu²⁺/ascorbato. Todos los extractos herbales inhibieron la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema oxidante Cu²⁺/ascorbato (Figura 1). Como se observa en la figura 1, los porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación microsómica provocados por los 4 extractos ensayados fueron similares, cercanos al 50%. Este efecto inhibitorio, fue proporcional al contenido de polifenoles contenido en las

muestras de extracto ensayadas. El análisis estadístico mostró un coeficiente de regresión lineal $r = 0,9815$ (Figura 2).

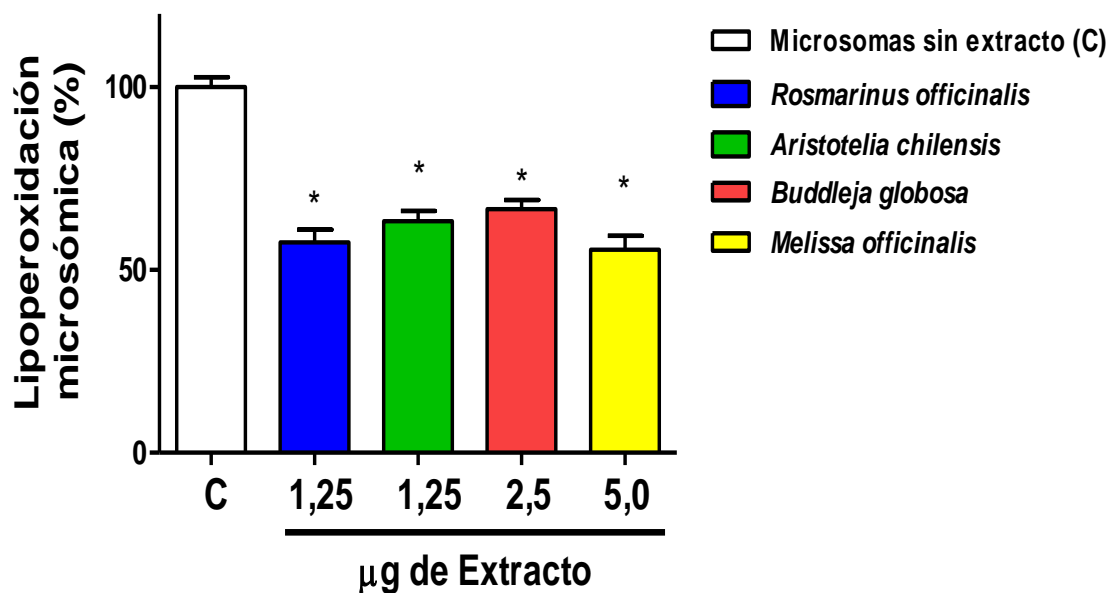


Figura 1. Efecto de los extractos herbales sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Los microsomas hepáticos (0,5mg/mL) fueron preincubados con el sistema oxidante durante 40min a 37°C antes de determinar la lipoperoxidación de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación microsómica en presencia de los extractos fueron calculados considerando como 100% la lipoperoxidación determinada en presencia del sistema oxidante y ausencia de los extractos (C). Los valores representan la media de al menos 3 experimentos independientes \pm D.E. (*) Valores estadísticamente diferentes respecto al control (C) ($p < 0,05$).

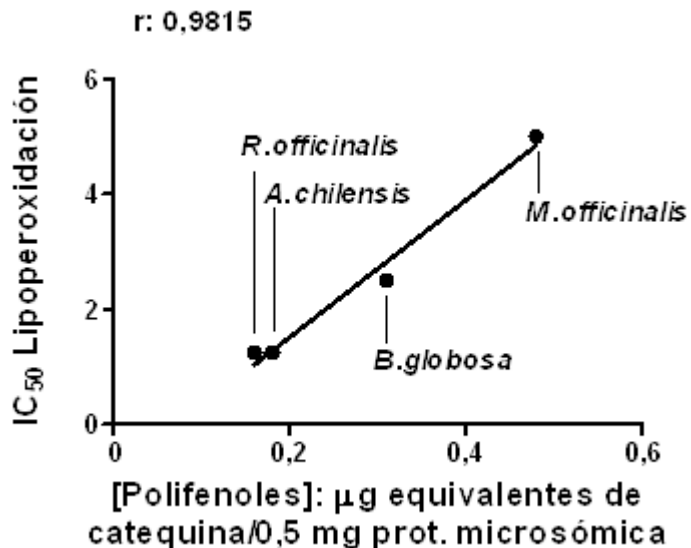


Figura 2. Correlación entre la concentración de polifenoles y el efecto anti-lipoperoxidante de los extractos. Coeficiente de relación lineal $r = 0,9815$

Efecto de los extractos herbales sobre la oxidación de tioles microsómicos provocada por el sistema oxidante Cu^{+2} /ascorbato. La capacidad de los extractos herbales para prevenir la oxidación de los tioles proteicos presentes en la membrana microsómica se muestran en la figura 3. Las cantidades de cada extracto seco y sus correspondientes contenidos de polifenoles, fueron los mismos que los usados en el efecto de los extractos sobre la lipoperoxidación microsómica. En presencia del sistema oxidante Cu^{+2} /ascorbato, el contenido de tioles microsómicos disminuyó en un $34,1\% \pm 3,14$. Todos los extractos previnieron totalmente la disminución del contenido tiólico generado por el sistema oxidante; las diferencias respecto del valor control no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

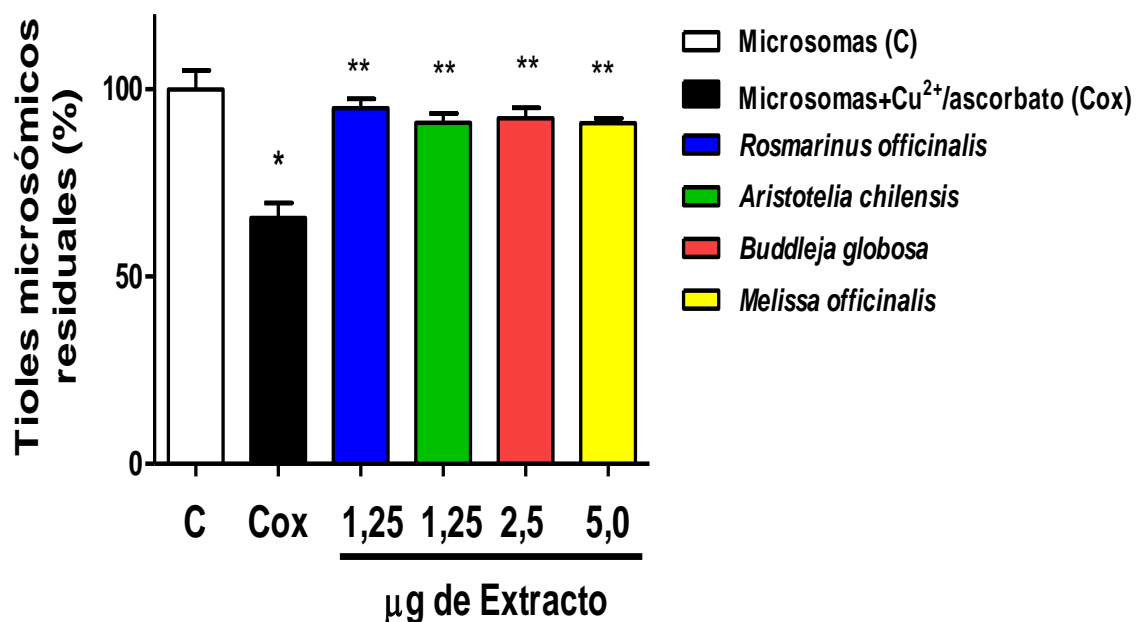
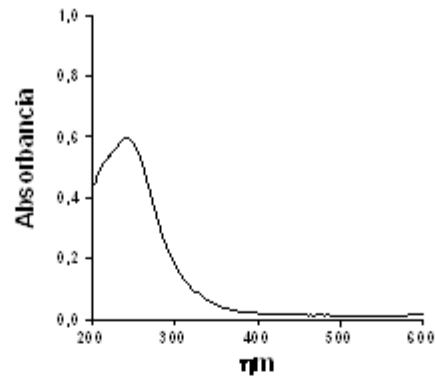
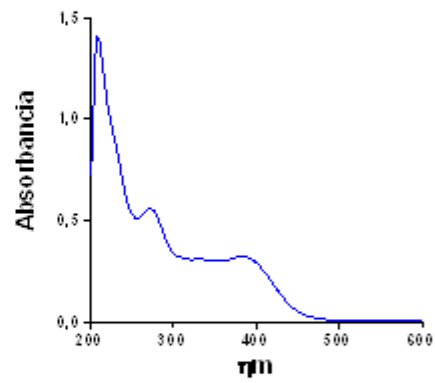
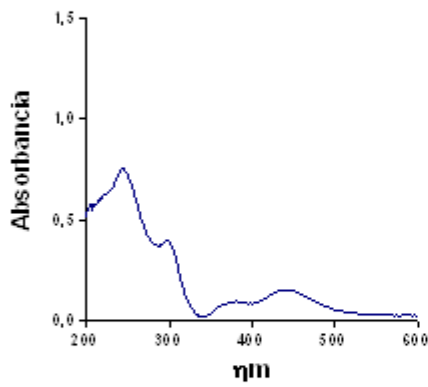


Figura 3. Efecto de los extractos herbales sobre la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Microsomas (0,5mg/mL) fueron preincubados con los extractos herbales durante 5min a 37°C antes de determinar los tioles microsómicos de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores del contenido tiólico microsómico en presencia del sistema oxidante y además en presencia de los extractos fueron calculados considerando como 100% el contenido tiólico microsómico medido en ausencia del sistema oxidante y de los extractos (C). Los valores representan la media de al menos 3 experimentos independientes \pm D.E. (*) Valor estadísticamente diferente al control (C); $p < 0,05$. (**) Valores no estadísticamente diferentes al control (C); $p > 0,05$.

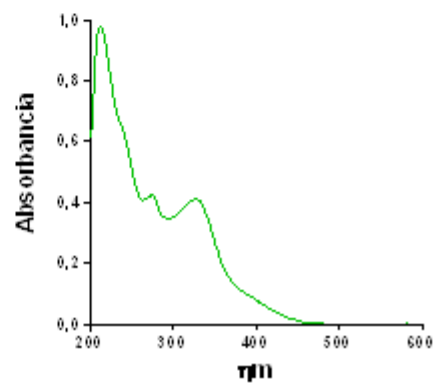
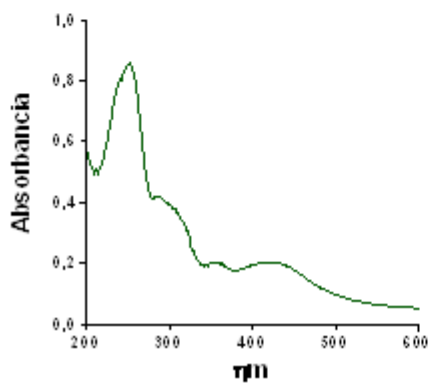
Capacidad de los extractos herbales de quelar Cu^{+2} . Los resultados se muestran en la figura 4. El espectro de absorbancia de Cu^{+2} presentó un pico característico a 243nm. Este espectro fue modificado por la adición de los extractos herbales en forma diferencial. Así, en presencia de *Rosmarinus officinalis* aparecieron nuevos picos de absorbancia a 296nm, 381nm y 440nm; *Aristolelia chilensis* presentó nuevos picos a 351nm y 424nm; *Buddleja globosa* presentó un nuevo pico a 396nm y *Melissa officinalis* uno a 378nm. Estos espectros fueron asimismo diferentes a los obtenidos en presencia sólo de los extractos.



Rosmarinus officinalis



Aristotelia chilensis



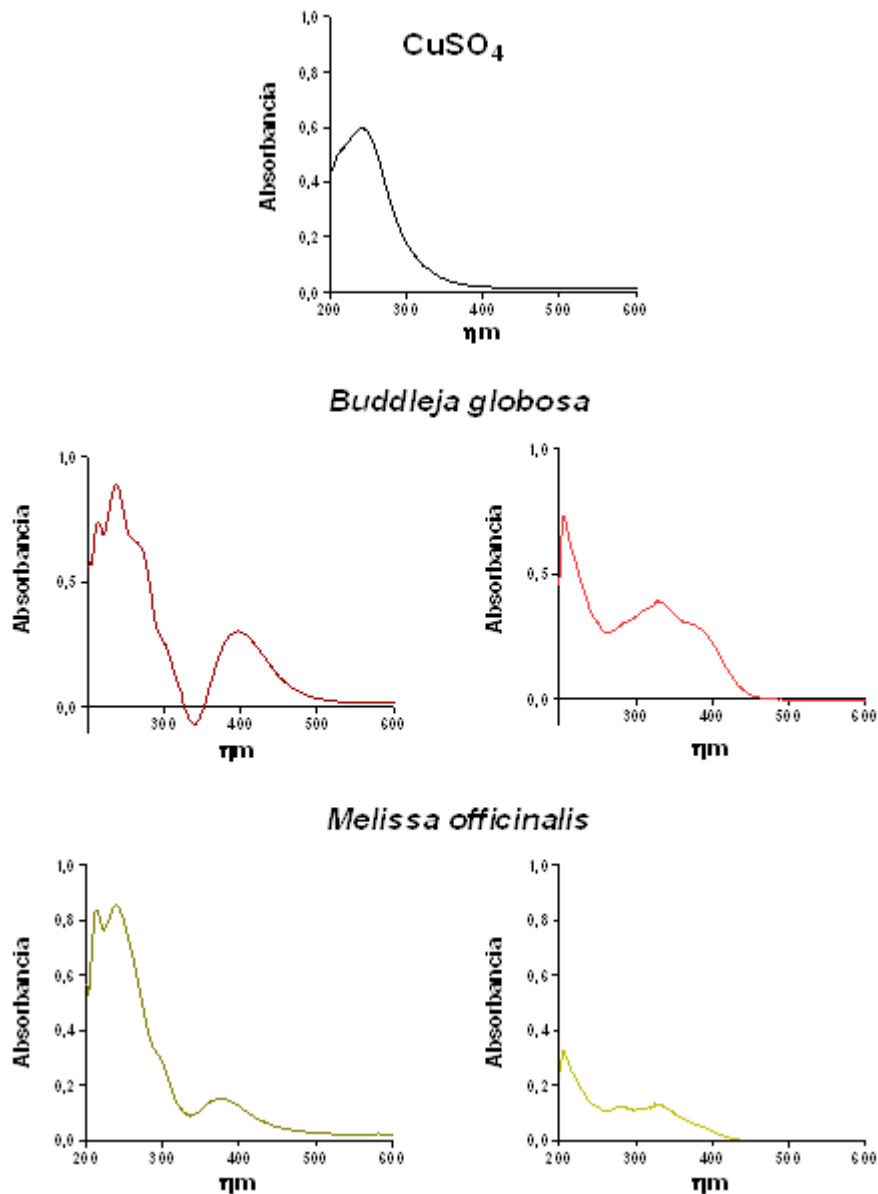


Figura 4. Espectros de Absorbancia de Cu^{2+} en presencia de extractos herbales. Los gráficos de la izquierda corresponden a los espectros obtenidos de las mezclas de los extractos herbales (250 μg) en presencia de CuSO_4 0,25mM. Los gráficos de la derecha corresponden a los *espectros* de los extractos obtenidos en ausencia de CuSO_4 . Los espectros de absorbancia fueron realizados de acuerdo a lo descrito en Métodos.

Efecto de los extractos herbales sobre la activación oxidativa de la UDPGT. Los extractos herbales testeados contienen polifenoles, compuestos que además de comportarse como antioxidantes son sustratos de la UDPGT. Es por ello que previo a medir el efecto de los extractos sobre la activación oxidativa se ensayó la capacidad de ellos de inhibir la conjugación de *p*-nitrofenol con UDPGA.

A. Inhibición de la actividad UDPGT por los extractos herbales. Todos los extractos herbales inhibieron la actividad UDPGT de una forma concentración-respuesta (Figura 5). Los valores de IC₅₀ obtenidos de las curvas semilogarítmicas concentración-respuesta (Figura 5) se muestran en la tabla 2. Los IC₅₀ para *Rosmarinus officinalis*, *Aristolelia chilensis*, *Buddleja globosa* y *Melissa officinalis*, expresados como µg de extracto /mg de proteína microsómica fueron 8,42; 8,54; 8,86; 41,58; respectivamente.

B. Inhibición de la Activación oxidativa de la UDPGT por los extractos herbales. Como agente pro-oxidante se utilizó el sistema Cu²⁺/ascorbato. El primer ensayo realizado consistió en evaluar las condiciones de linealidad respecto del tiempo de incubación de la enzima con el sistema pro-oxidante Cu²⁺/ascorbato. En nuestras condiciones de ensayo la máxima activación se obtuvo a los 15min que fue el tiempo máximo ensayado; en este tiempo la actividad fue aproximadamente el doble de la actividad control medida en ausencia de Cu²⁺/ascorbato (Figura 6). La actividad UDPGT control correspondió a 57,70 ± 3,62ηmoles de glucurónido formado/mg proteína microsómica y la de la enzima activada, 124,0 ± 2,61ηmoles de glucurónido formado/mg proteína microsómica.

Dado que los extractos por si mismos generaron inhibición de la actividad UDPGT, para evaluar el efecto antioxidante de los extractos sobre la activación oxidativa de la UDPGT, se utilizaron blancos que contenían todos los reactivos a excepción del sistema Cu^{2+} /ascorbato. Las concentraciones de extractos utilizadas fueron aquellas equivalentes al IC_{25} obtenidos del efecto de los extractos herbales sobre la actividad UDPGT medida en ausencia de Cu^{2+} /ascorbato (gráficos semilogarítmicos, Figura 5). Estas concentraciones fueron: [*R. officinalis*]: 4,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína; [*A. chilensis*]: 4,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína.; [*B. globosa*]: 4,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína; [*M. officinalis*]: 20,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína. En estas condiciones, todos los extractos anularon totalmente la activación oxidativa inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato (Tabla 3). Cabe señalar que al utilizar las concentraciones IC_{50} de los extractos herbales sobre la actividad control no se observó actividad UDPGT, ella fue inhibida completamente (datos no mostrados), tanto en el efecto de activación oxidativa de la UDPGT como de la actividad UDPGT nativa.

Dado que en la activación oxidativa de la UDPGT se postula que estarían involucrados residuos cisteinílicos de la enzima, se determinó la presencia de tioles en los extractos para relacionar su poder reductor sobre la activación (Tabla 3). Interesantemente, la concentración de tioles de los extractos testeados no se relacionó con el efecto inhibitorio de la activación oxidativa observado (Tabla 3). Más aun, no se pudo determinar presencia de tioles en el extracto de *Melissa officinalis*, incluso aumentado 10 veces la concentración testeados en los ensayos de actividad de la UDPGT.

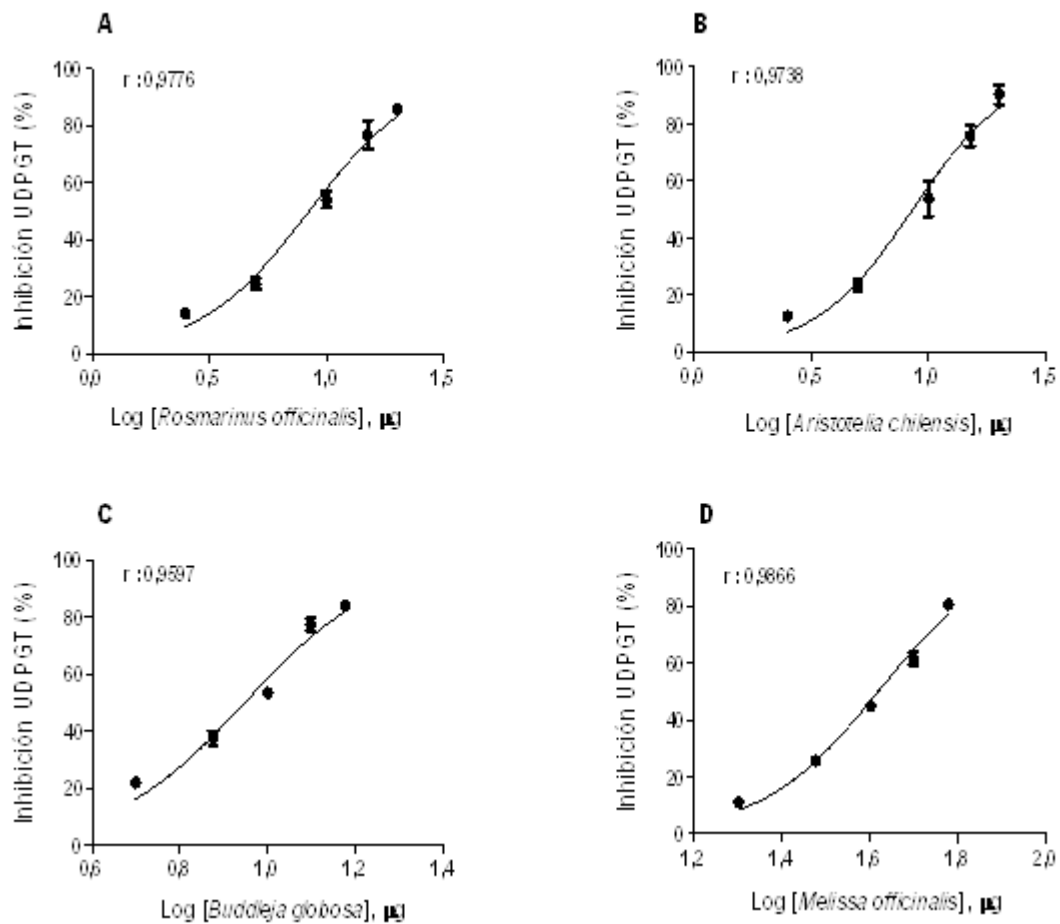


Figura 5. Efecto de los extractos herbales sobre la actividad UDPGT. Microsomas (2mg/mL) fueron preincubados durante 5 minutos con los diferentes extractos antes de evaluar la actividad UDPGT de acuerdo a lo descrito en Métodos. **(A)** *R. officinalis* (2,5 - 20 μg), **(B)** *A. chilensis* (2,5 - 20 μg), **(C)** *B. globosa* (5 - 15 μg), **(D)** *M. officinalis* (20 - 60 μg). Los porcentajes de inhibición de la actividad enzimática UDPGT en presencia de los extractos fueron calculados considerando como 100% la actividad control medida en ausencia de ellos. Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes \pm D.E; r = regresión no lineal de las curvas.

TABLA 2. VALORES DE IC₅₀ DE LOS EXTRACTOS HERBALES PARA LA INHIBICIÓN POR SUSTRATO DE LA ACTIVIDAD UDPGT

Extracto	IC ₅₀	[Polifenoles]
<i>Rosmarinus officinalis</i>	8,42	1,50
<i>Aristotelia chilensis</i>	8,54	1,18
<i>Buddleja globosa</i>	8,86	1,11
<i>Melissa officinalis</i>	41,58	4,02

IC₅₀: µg de extracto/mg de proteína microsómica. [Polifenoles]: µg equivalentes de catequina/mg de proteína microsómica/µg de extracto correspondiente a cada IC₅₀. Estos valores fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos mostrados en la figura 4.

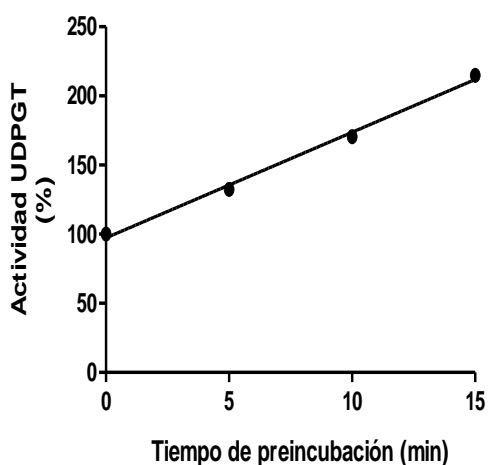


Figura 6. Efecto temporal de Cu²⁺/ascorbato sobre la actividad UDPGT. La actividad UDPGT fue calculada considerando como 100% la actividad enzimática medida en ausencia del sistema Cu²⁺/ascorbato. La actividad UDPGT se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores graficados corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ± D.E.

TABLA 3. EFECTO DE LOS EXTRACTOS HERBALES SOBRE LA ACTIVACIÓN OXIDATIVA DE LA UDPGT

Condiciones	Sin Cu ²⁺ /ascorbato (%)	Más Cu ²⁺ /ascorbato (%)	[Tioles] (mg eq. GSH/ g de extracto)	[Fenoles] /[Tioles]
Control (sin extracto herbal)	100,3 ± 6,30	214,2 ± 9,79	---	---
+ <i>Rosmarinus officinalis</i>	(*) 73,4 ± 2,96 (4,2µg)	(**) 102,4 ± 5,06 (4,2µg)	12,2 ± 0,43	14,54
+<i>Aristotelia chilensis</i>	(*) 74,1 ± 3,62 (4,3µg)	(**) 99,1 ± 5,50 (4,3µg)	1,7 ± 0,15	81,29
+<i>Buddleja globosa</i>	(*) 76,2 ± 1,78 (4,5µg)	(**) 103,0 ± 7,20 (4,5µg)	7,0 ± 0,44	17,94
+<i>Melissa officinalis</i>	(*) 73,5 ± 1,43 (20,8µg)	(**) 101,1 ± 4,04 (20,8µg)	---	----

Los valores entre paréntesis corresponden a la cantidad de cada extracto utilizado para medir su efecto sobre la activación de la UDPGT. Los microsomas (2mg/mL) fueron incubados con cada uno de los extractos durante 5min a 37°C antes de adicionar el sistema oxidante Cu²⁺/ascorbato; luego las mezclas se incubaron 15min con Cu²⁺/ascorbato y a continuación se determinó la actividad enzimática de acuerdo a lo descrito en Métodos. La actividad UDPGT fue calculada considerando como 100% la actividad medida en ausencia de extractos y sistema oxidante (Control). Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes ± D.E. (*) Valores no estadísticamente diferentes entre sí (p>0,05). (**) Valores no estadísticamente diferentes al control (p>0,05).

Efecto de agentes reductores tiólicos sobre la activación de la UDPGT inducida por Cu^{+2} /ascorbato. Como se muestra en la figura 7, la adición de GSH 0,5mM y DTT 0,25mM previnieron el efecto de la activación oxidativa UDPGT inducida por Cu^{+2} /ascorbato. En presencia de GSH 0,5mM la actividad UDPGT disminuyó aproximadamente en un 36,3% respecto del control oxidado (en presencia de Cu^{+2} /ascorbato). DTT 0,25mM disminuyó la actividad UDPGT aproximadamente un 28,9% respecto al control en presencia de Cu^{+2} /ascorbato.

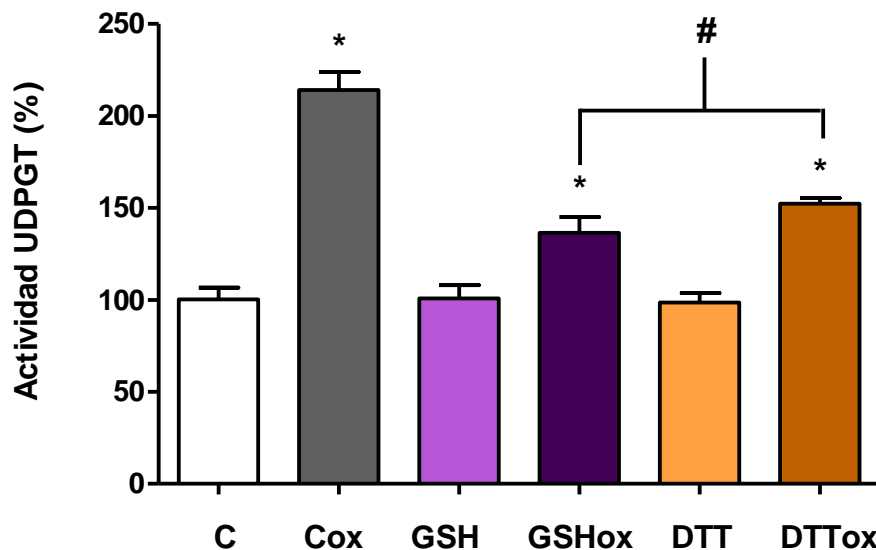


Figura 7. Efecto de agentes reductores tiólicos sobre la activación oxidativa de la UDPGT. C: Control Actividad UDPGT en ausencia del sistema Cu^{+2} /ascorbato; Cox.: Actividad UDPGT en presencia de Cu^{+2} /ascorbato; GSH y DTT: Actividad UDPGT en presencia de agentes reductores y ausencia de Cu^{+2} /ascorbato; GSHox y DTTox: Actividad UDPGT en presencia de Cu^{+2} /ascorbato y los agentes reductores. Microsomas (2mg/mL) fueron preincubados durante 5min a 37°C con GSH 0,5mM (153,65 μg /mg proteína) o DTT 0,5mM (38,55 μg /mg proteína), antes de adicionar el sistema oxidante Cu^{+2} /ascorbato. Luego, las mezclas se incubaron 15min a 37°C con Cu^{+2} /ascorbato y al cabo de este periodo se determinó la actividad enzimática de acuerdo a lo descrito en Métodos. La actividad UDPGT fue calculada considerando como 100% la actividad medida en ausencia de los agentes reductores y sistema oxidante (Control C). Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes \pm D.E. (*) Valores estadísticamente diferentes al control ($p < 0,05$). (#) Valores estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

IV. DISCUSIÓN

Como se mencionó en la Introducción, la UDPGT es una enzima tiólica [7-8]. Por lo tanto, postulamos que en la activación de esta proteína microsómica podrían estar involucrados sus residuos de cisteína. Sin embargo, se ha demostrado que agentes oxidantes como el sistema Cu^{2+} /ascorbato oxidan también los lípidos de la membrana microsómica [8, 21,23]. Estos cambios oxidativos alteran la fluidez de la membrana, como también la conformación de las proteínas insertas en ella. Por lo tanto, hasta el año 2005 se pensaba que la activación de la UDPGT provocada por agentes oxidantes como también por detergentes se debería a cambios en la conformación de la membrana microsómica. Se ha postulado que estos cambios conformacionales favorecerían la unión del cofactor UDPGA citosólico a la enzima microsómica. Esta es la teoría conocida como compartimentalización.

Letelier y colaboradores (2005a) [7] demostraron que la activación de la UDPGT desarrollada en presencia de Fe^{3+} /ascorbato era revertida por diferentes agentes reductores, entre ellos GSH, DTT y cisteína. Sin embargo, la activación producida por el detergente Tritón-X100 no fue revertida por dichos agentes químicos. Esto demostró que, en presencia de agentes oxidantes, la activación de la UDPGT se debía no sólo a cambios conformacionales de la membrana microsómica, sino además, a cambios oxidativos de esta proteína. Los extractos de plantas medicinales se caracterizan por tener altas concentraciones de antioxidantes, especialmente polifenoles. Es por ello que en este trabajo se probó la capacidad de diferentes extractos herbales estandarizados de prevenir la activación de la UDPGT provocada por el sistema Cu^{2+} /ascorbato.

Las hojas de las plantas corresponden a la parte de ellas que contiene la más alta concentración de polifenoles. Es por ello que las hojas de las plantas fueron elegidas como droga vegetal para preparar los extractos herbales testeados.

Todos los procesos involucrados desde la cosecha de las hojas hasta la obtención de los extractos secos ensayados fueron estandarizados. Cabe señalar que los extractos donados por la empresa farmacéutica correspondieron a extractos secos diluidos con excipientes; con ellos se realizaron todos los experimentos de este trabajo.

Contenido de polifenoles. Nuestro primer ensayo fue determinar el contenido de polifenoles de los extractos. Los procesos de extracción utilizados en la preparación de ellos los desconocemos porque son secretos de la empresa farmacéutica; de estos procesos depende la calidad y la concentración de polifenoles en un extracto dado. Es por ello que la concentración de polifenoles se expresó en mg equivalentes de catequina (estándar) /g de droga vegetal, /g de extracto puro y /g de extracto con excipiente; este último corresponde al preparado recibido (Tabla 1).

Los resultados expresados por g de droga vegetal mostraron que *Buddleja globosa* era la que contenía mayor cantidad de polifenoles, seguida por *Melissa officinalis*, *Aristolelia chilensis* y *Rosmarinus officinalis* que fue el extracto que contenía la menor cantidad de polifenoles. Sin embargo, al expresar el contenido de polifenoles/g de extracto puro el orden de mayor a menor contenido de polifenoles fue *Melissa officinalis*, *Aristolelia chilensis*, *Buddleja globosa*, *Rosmarinus officinalis*. Asimismo, el orden en el contenido de polifenoles expresados por g de extracto más excipiente que corresponde a los preparados recibidos, fue de mayor a menor *Rosmarinus officinalis*, *Aristolelia chilensis*, *Buddleja globosa*, *Melissa officinalis*.

Cabe señalar que las 3 expresiones de concentración utilizadas pueden tener diferentes utilidades. Por ejemplo, al empresario le interesa la expresión cantidad de polifenoles/g de droga vegetal, al químico, cantidad de polifenoles/g de extracto puro sin excipientes y a la empresa farmacéutica que es la que

elabora el fitofármaco, la expresión cantidad de polifenoles/g de extracto más excipiente, ya que el formulado debe incluir la dosis terapéutica. Como esta última expresión es la que se aplica a una futura formulación y aplicación terapéutica es la que se escogió para expresar los resultados y la que se aproxima a una relación concentración de fitofármaco y efecto.

Efecto antioxidante de los extractos. Todos los extractos inhibieron la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato (Figura 1), pero la cantidad de extracto, expresado como contenido de polifenoles, necesaria para alcanzar el IC_{50} fue diferente. El análisis estadístico mostro una correlación lineal entre el contenido de polifenoles de los extractos y su IC_{50} sobre la lipoperoxidación (Figuras 1 y 2).

Además, todos los extractos previnieron totalmente la disminución del contenido tiólico provocado por el sistema Cu^{2+} /ascorbato, indicando con ello que los extractos testeados son capaces de prevenir la oxidación de lípidos de membrana y además, la oxidación de los tioles proteicos. Esto es de especial importancia dado que la regulación de importantes cascadas bioquímicas se produce a través de la oxido-reducción de proteínas tiólicas [17, 24,25]. Más aún, los grupos tiólicos tienen reconocida capacidad quelante de metales, mecanismo a través del cual se anula la posibilidad de estos iones de generar EROs a través de las reacciones de Haber Weiss / Fenton y, además, de unirse covalentemente a proteínas alterando su función biológica [21]. Ejemplos son las proteínas encargadas del metabolismo de Cu, entre ellas las proteínas que transportan metales en el plasma sanguíneo (cupreína, ceruloplasmina,) [26] y la metalotioneína que transporta metales en el interior de la célula; un 30% de la composición aminoacídica de la metalotioneína son cisteínas, y todas ellas están involucradas en el transporte intracelular de iones metálicos. En presencia de CuSO_4 , los espectros de absorbancia de cada extracto como el del

Cu^{2+} (en ausencia de extracto) fueron modificados, indicando con ello la capacidad de los extractos de quelar a este ion metálico (Figura 4).

Todos los extractos previnieron la activación de la UDPGT generada por el sistema Cu^{2+} /ascorbato (Tabla 3) y a diferencia de la lipoperoxidación, no hubo correlación lineal entre la prevención de la activación y las concentraciones de tioles ni de polifenoles de los extractos (Tabla 3). La actividad antioxidante de un extracto herbal depende del potencial redox de los principios activos antioxidantes como también, de la concentración relativa de ellos en dicho extracto, lo cual podría explicar la diferencia observada entre la prevención de la oxidación de lípidos y tioles microsómicos.

A nivel celular, el glutatión es el antioxidante no enzimático más abundante y cumple un rol fundamental en el mantenimiento del equilibrio redox celular [27-29]. Una segunda línea de defensa frente al equilibrio redox de los circuitos tiólicos está constituida por las tiorredoxinas y glutatiorredoxinas [29-30]; estas proteínas regulan la actividad de enzimas que participan en diferentes cascadas bioquímicas como la regulación de la actividad de factores de transcripción en el núcleo a través de la interacción de la tiorredoxina con el factor 1 redox apirimidinico-apurínico-1 (APE / Ref-1). NFkB, AP1 y p53 están entre los muchos factores importantes de transcripción de mamíferos se encuentran regulados por este sistema [30]. Es por ello nuestro interés en comparar el efecto de los extractos herbales testeados con el de GSH y un tiol sintético como el DTT, sobre la activación oxidativa de la UDPGT. Ambos reductores tiólicos, previnieron parcialmente la activación oxidativa de la UDPGT provocada por el sistema Cu^{2+} /ascorbato (Figura 7). Cabe destacar que en este caso todos los extractos se comportaron como mejores antioxidantes que GSH y DTT. Los extractos fueron aproximadamente 40 veces más potentes antioxidantes que GSH y 10 veces más que DTT. El efecto de *Melisa officinalis* fue el menor de todos los extractos; sin embargo, fue mayor que el de GSH y

DTT, aproximadamente 7 y 2 veces mayor, respectivamente (Tabla 3 y Figura 7). Probablemente esta mayor potencia antioxidante de los extractos ensayados se debe a la presencia en ellos de diferentes principios activos antioxidantes, los cuales pueden, a través de mecanismos diferentes, potenciar su efecto antioxidante en forma sinérgica.

La enzima UDPGT tiene un importante rol en el metabolismo de xenobióticos, entre ellos los fármacos. Por otra parte, todas las patologías en menor o mayor grado están asociadas a estrés oxidativo, condiciones en las cuales, esta enzima puede sufrir activación oxidativa. Este fenómeno puede alterar el metabolismo y, por ende, la eliminación de los fármacos del organismo [7-8,31-32]. Cabe señalar, además, que muchos de los sustratos de la UDPGT son productos de la biotransformación de fármacos lipofílicos a través del sistema oxidativo CYP450, cuya actividad enzimática se inhibe frente a estrés oxidativo [16]. Esta desregulación del metabolismo de los fármacos conlleva a una alteración de las concentraciones plasmáticas de los fármacos y a la aparición de efectos adversos muchas veces severos, especialmente a nivel hepático. Estos trastornos evidentemente alteran la eficacia de las terapias [8, 16,31-32].

De lo anteriormente expuesto podemos concluir que sería importante considerar el uso de antioxidantes herbales en el tratamiento de las distintas patologías especialmente aquellas enfermedades crónicas, como las patologías cardiovasculares, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer. Frente a estas patologías los pacientes son tratados por periodos prolongados de tiempo y muchos de los fármacos que se les administran provocan efectos adversos asociados a procesos inflamatorios. Estos procesos están asociados a estrés oxidativo [33-34], fenómeno que afecta el metabolismo de los fármacos con consecuencias negativas sobre la eficacia y la seguridad de ellos.

V. CONCLUSIONES

- Todos los extractos herbales (*Rosmarinus officinalis*, *Aristotelia chilensis*, *Buddleja globosa* y *Melissa officinalis*) inhibieron los efectos oxidativos que genera el sistema Cu^{2+} /ascorbato sobre los lípidos y los grupos tiólicos proteicos microsómicos, en distinta extensión.
- Asimismo, todos los extractos herbales inhibieron la activación oxidativa de la UDPGT inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato, en forma diferencial.
- Estos resultados demuestran que en condiciones de estrés oxidativo se provocan cambios estructurales en las biomoléculas que afectan su función. Estos cambios redox pueden afectar las distintas cascadas bioquímicas a través de las cuales se llevan a cabo los distintos procesos celulares, entre ellos, la biotransformación de fármacos, especialmente involucrada en la eficacia y seguridad de ellos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B.K Park, N. R. Kitteringham, J. L. Maggs, M. Pirmohamed, D. P. Williams. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annual Review Pharmacology Toxicology* 45 (2005) 177 - 202.
- [2] C. Xu, C. Yong-Tao Li, Ah-Ng Tony Kong. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*, Vol 28. No.3 (2005) 249 - 268.
- [3] S. A. Sheweita. Drug-Metabolizing Enzymes: Mechanisms and Functions. *Current Drug Metabolism* 1 (2000) 107 - 132.
- [4] D. Zakim, A. J. Dannenberg. How does the microsomal membrane regulate UDP-glucuronosyltransferases? *Biochemical-Pharmacology*, Vol. 43. No. 7 (1992) 1385 - 1393.
- [5] G. J. Dutton. *Handbook of Experimental Pharmacology. Concepts in Biochemical Pharmacology Part 2. Glucuronide-Forming Enzymes.* Springer Berlin Heidelberg, 1971, pp. 378 - 400.
- [6] C. B. Kasper, D. Henton. Glucuronidation, in: W.B. Jacoby (Ed.), *Enzymatic Basis of Detoxication Vol. II.* Academic Press, New York, USA, 1980, pp. 3 - 36.
- [7] M. E. Letelier, A. Pimentel, P. Pino, A. M. Lepe, M. Faúndez, P. Aracena, H. Speisky. Microsomal UDP-Glucoronyltransferase in Rat Liver: Oxidative Activation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 96 (2005a) 480 - 486.

- [8] M. E. Letelier, F. Lagos, M. Faúndez, D. Miranda, M. Montoya, P. Aracena-Parks, V. González-Lira. Copper modifies liver microsomal UDP-glucuronyltransferase activity through different and opposite mechanisms. *Chemico-Biological Interactions* 167 (2007) 1 - 11.
- [9] S. S. Ghosh, Y. Lu, S. W. Lee, X. Wang, C. Guha, J. Roy-Chowdhury, N. Roy-Chowdhury. Role of cysteine residues in the function of human UDP glucuronosyltransferase isoform 1A1 (UGT1A1). *Biochemical Journal* 392 (2005) 685 - 692.
- [10] C. Senay, G. Jedlitschky, N. Terrier, B. Burchell, J. Magdalou, S. Fournel-Gigleux. The importance of cysteine 126 in the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular* 1597 (1) (2002) 90 - 96.
- [11] A. Watanabe, H. Wakabayashi, Y. Kuwabara, H. Yamamoto, S. Hattori, T. Tsuji. Liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity in chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia of adults. *Research in experimental medicine* 197 (6) (1998) 329 - 336.
- [12] D. Bentley, G. Wood, A. Graham. Effects of lipid peroxidation on the activity of microsomal UDP-glucuronosyltransferase. *Physics in Medicine and Biology* 57 (1979) 274 - 280.
- [13] E. Sánchez, T. R. Tephly. Activation of hepatic microsomal glucuronyl transferase by bilirubin. *Life Sciences* 13 (11) (1973) 1483 - 1490.

- [14] R. Fulceri, G. Bánhegy, A. Gamberucci, R. Giunti, J. Mandl, A. Benedetti: Evidence for the intraluminal positioning of *p*-nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase activity in rat liver microsomal vesicles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 309 (1994) 43 - 46.
- [15] S. T. Martin, S. D. Black. Detergent effects in rabbit liver microsomal UDP glucuronosyltransferase studied by means of a continuous spectrophotometric assay with *p*-nitrophenol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200 (2) (1994) 1093 - 1098.
- [16] M. E. Letelier, M. Faúndez, J. Jara-Sandoval, A. Molina-Berríos, J. Cortés-Troncoso, P. Aracena-Parksa, R. Marín-Catalán. Mechanisms underlying the inhibition of the cytochrome P450 system by copper ions. *Journal of Applied Toxicology* 29 (8) (2009a) 696 - 702.
- [17] M. E. Letelier, A. Molina-Berríos, J. Cortés-Troncoso, J. A. Jara-Sandoval, A. Müller, P. Aracena-Parks. Comparative effects of superoxide anion and hydrogen peroxide on microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities of rat liver. *Biological Trace Element Research* 134 (2010) 203 - 211.
- [18] O. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* (1951) 265 - 275.
- [19] M. E. Letelier, J. F. Cortés, A. M. Lepe, J. A. Jara, A. Molina-Berríos, C. Rodríguez, P. Iturra-Montecinos, M. Faúndez. Evaluation of the antioxidant properties and effects on the biotransformation of commercial herbal preparations using rat liver endoplasmic reticulum. *Boletín*

Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas Vol. 8
(2) (2009b) 110 - 120.

- [20] P. Aracena, C. Lazo-Hernández, A. Molina-Berrios, D. R. Sepúlveda, C. Reinoso, J. I. Larraín, J. Navarro, M. E. Letelier. Microsomal oxidative stress induced by NADPH is inhibited by nitrofurantoin redox biotransformation. *Free Radical Research* 48 (2) (2014) 129 - 136.
- [21] M. E. Letelier, A. M. Lepe, M. Faúndez, J. Salazar, R. Marín, P. Aracena, H. Speisky. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 15 (2005b) 71 - 82.
- [22] M. E. Letelier, C. Gallardo-Garrido, C. L. Villar-Bustamante, G. Díaz- Véliz. Relationship between antioxidant and anxiolytic activity of standardized extracts of *Melissa officinalis* and *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Phytomedicine* 7 (2015) 343 - 353.
- [23] M. E. Letelier, S. Sánchez-Jofre, L. Peredo-Silva, J. Cortés-Troncoso, P. Aracena-Parks. Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chemico-Biological Interactions* 188 (2010) 220 - 227.
- [24] H. Budde, L. Flohé. Enzymes of the thiol-dependent hydroperoxide metabolism in pathogens as potential drugs targets. *BioFactors* 17 (2003) 83 - 92.

- [25] D. M. Ziegler. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annual Review of Biochemistry* 54 (1985) 305 - 329.
- [26] R. Banerjee. *Redox Biochemistry. Redox Regulation of Physiological: Metal Homeostasis.* John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2008, pp.162 - 172.
- [27] J. Mandl, G. Bánhegyi. Role of glutathione in the regulation of liver metabolism. *BioFactors* 17 (2003) 21 - 26.
- [28] G. Wu, Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, N. D. Turner. Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition* 134 (2004) 489 - 492.
- [29] R. Masella, G. Mazza. *Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease: Antioxidant and detoxification activities.* John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2009, pp. 93 - 180.
- [30] R. Banerjee. *Redox Biochemistry. Antioxidant Enzymes: The Thioredoxin System.* John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2008, pp.68 - 74.
- [31] M. E. Letelier, P. Izquierdo, L. Godoy, A. M. Lepe, M. Faúndez. Liver microsomal biotransformation of nitro-aryl drugs: A mechanism for potential oxidative stress induction. *Journal of Applied Toxicology* 24 (6) (2004) 519 - 525.

- [32] M. E. Letelier, M. Lopez-Valledares, L. Peredo-Silva, D. Rojas-Sepúlveda. Microsomal oxidative damage promoted by acetaminophen metabolism. *Toxicology in Vitro* 25 (2011) 1310 - 1313.
- [33] M. E. Letelier, A. Molina-Berríos, J. Cortés-Troncoso, J. Jara-Sandoval, M. Holst, K. Palma, M. Montoya, D. Miranda, V. González-Lira. DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules. *Toxicology in Vitro* 22 (2008) 279 - 286.
- [34] A. P. Khan. *The Encyclopedia of Stress and Stress-related diseases* Second Edition. Facts On File Inc., New York, USA, 2006, pp.1 - 399.