

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA



**TOXICIDAD DE NITROFURANTOÍNA Y NIFURTIMOX INDUCIDA POR
BIOTRANSFORMACIÓN A TRAVÉS DEL SISTEMA DEL CITOCROMO P450.**

PROFESOR PATROCINANTE
Prof. María Eugenia Letelier M.

DIRECTOR DE MEMORIA
Prof. María Eugenia Letelier M.

Laboratorio de Farmacología
Fac. Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Laboratorio de Farmacología
Fac. Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Juan Ignacio Alberto Nicolás Larraín Sánchez

SANTIAGO DE CHILE

2005

La más larga caminata,

Comienza con un paso

A mi madre con Amor

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi madre, que con su infinita comprensión, esfuerzo y sacrificio me ha guiado. Gracias por su eterno apoyo.

A mi esposa que durante el desarrollo de la carrera me ha apoyado, dando su confianza y amor.

A mi hermana, Constanza por su apoyo sin límites.

A la Profesora María Eugenia Letelier, quien ha sido un pilar fundamental en mi formación. Gracias por toda la confianza que ha depositado en mí, por todo su apoyo y por ser una guía para mi futuro.

A mis compañeros de laboratorio; Carlos, Carolina, Claudia, Cristina, Juan Guillermo, Rodrigo y Víctor. Gracias por la amistad y por tantos momentos inolvidables.

A Don José y a la Sra. Guisela, quienes en forma desinteresada ayudaron en el desarrollo de este trabajo.

A la Sra. Ximena Polanco y su equipo, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarnos durante el trabajo en laboratorio.

A todos.....Muchas Gracias.

ABREVIATURAS

DTNB	: Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
GSH	: Glutación reducido.
MDA	: Malondialdehído
PNA	: p-nitroanisol
PNP	: p-nitrofenol
TBA	: Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	: Ácido tricloroacético
TNB	: Ácido tio-nitrobenzoico

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	7
Objetivos generales.....	7
Objetivos específicos.....	7
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Reactivos.....	8
Animales de experimentación.....	9
Preparación microsomas hepáticos de rata	9
Determinación de proteínas.....	9
Lipoperoxidación microsómica.....	10
Determinación del contenido de citocromo P450.....	10
Determinación de tioles totales.....	11
Actividad enzimática catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450: O-desmetilación de p-nitroanisol.....	12
Análisis estadístico.....	13
III. RESULTADOS.....	14
IV. DISCUSIÓN.....	30
Conclusiones.....	34
V. REFERENCIAS.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo oxidativo de Naftaleno a través del sistema citocromo P450.	Pág. 15
Figura 2	Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo de Nitrofurantoína a través del sistema citocromo P450.	Pág. 16
Figura 3	Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo de Nifurtimox a través del sistema citocromo P450.	Pág. 17
Figuras 4A, 4B y 4C	Lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación a través del sistema citocromo P450 de naftaleno (A), Nitrofurantoína (B) y Nifurtimox (C). Efecto de GSH.	Pág. 19
Figuras 5A, 5B y 5C	Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo oxidativo de Naftaleno (A), Nitrofurantoína (B) y Nifurtimox (C). Efecto del extracto hidroalcohólico de <i>Buddleja globosa</i> (matico).	Pág. 20
Figura 6	Espectro control de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica.	Pág. 22
Figuras 7A, 7B y 7C	Efecto de naftaleno (A), Nitrofurantoína (B) y Nifurtimox (C) sobre el contenido microsómico de la monooxigenasa citocromo P450.	Pág. 23
Figuras 8A, 8B y 8C	Efecto de naftaleno (A) Nitrofurantoína (B) y Nifurtimox (C) sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica.	Pág. 24
Figura 9	Contenido total de tioles microsómicos. Efecto de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox en condiciones de biotransformación por el sistema citocromo P450.	Pág. 26
Figura 10	Efecto de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox sobre la O-desmetilación de p-nitroanisol.	Pág. 28
Figuras 11A, 11B y 11C	O-Desmetilación de p-nitroanisol en presencia de naftaleno (A), Nitrofurantoína (B) y Nifurtimox (C). Efecto de GSH y DTT.	Pág. 29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Efecto de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox sobre el contenido microsómico de la monooxigenasa citocromo P450.	Pág. 25
---------	--	---------

RESUMEN

En general los procesos de biotransformación de fármacos originan metabolitos excretables por la orina. Nitrofurantoína y Nifurtimox son compuestos lipofílicos, sin embargo no existen antecedentes acerca de la eliminación de metabolitos de estos fármacos en orina. Su administración induce diversos efectos adversos asociados a la nitrorreducción que ellos sufrirían *in vivo*, reacción que genera un nitro anión radical (NO_2^-) intermediario que sufre reciclaje redox con O_2 , generando ROS. Naftaleno es un xenobiótico metabolizado por oxidación a través del sistema citocromo P450; además, induce estrés oxidativo por esta vía metabólica. En este trabajo realizamos un estudio comparativo entre el metabolismo de naftaleno y, Nitrofurantoína y Nifurtimox catalizado por el sistema citocromo P450. Para ello utilizamos una preparación enriquecida en retículo endoplásmico hepático de rata (microsomas). La incubación de los microsomas con ya sea naftaleno, Nitrofurantoína o Nifurtimox y NADPH indujo lipoperoxidación microsómica, fenómeno que fue inhibido por GSH y un extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* (matico) de una forma concentración-respuesta. La lipoperoxidación microsómica inducida por los 3 xenobióticos ensayados tuvo un comportamiento bimodal y fue dependiente de la concentración de los xenobióticos; naftaleno aumentó la lipoperoxidación y, Nitrofurantoína y Nifurtimox, la disminuyeron. Así, la primera pendiente positiva obtenida en presencia de naftaleno fue 2 veces mayor que la segunda; asimismo, la pendiente negativa obtenida a concentraciones μM de ya sea Nitrofurantoína o Nifurtimox fue 20 y 10 veces mayor que la obtenida a concentraciones mM , respectivamente. Además, los 3 xenobióticos: a) disminuyeron el contenido de tioles microsómicos en condiciones de biotransformación, b) se unieron a la monooxigenasa citocromo P450 de una forma concentración-respuesta, c) inhibieron la O-desmetilación de p-nitroanisol, reacción catalizada por el sistema citocromo P450, fenómeno que fue prevenido parcialmente por GSH y DTT. Nuestros resultados muestran que Nitrofurantoína y Nifurtimox pueden ser nitrorreducidos y además, oxidados por el sistema citocromo P450; sin embargo, se requieren nuevos experimentos que permitan confirmar este postulado. Por otra parte, ya que el estrés oxidativo inducido por la nitrorreducción fue inhibido

por antioxidantes, la administración de una terapia asociada podría ayudar a disminuir los efectos adversos descritos para estos fármacos.

SUMMARY

NITROFURANTOIN AND NIFURTIMOX TOXICITY INDUCED BY BIOTRANSFORMATION ACROSS CYTOCHROME P450 SYSTEM

In general, the drug biotransformation produces metabolites which are excreted by urine. Nitrofurantoin and Nifurtimox are lipophilic compounds; there are no data however, related with the elimination of metabolites of these drugs in urine. The administration of both drugs induce several adverse effects which are associated to its nitro-reduction *in vivo*; this reaction would generate a nitro anion radical (NO_2^-); in the presence of O_2 this intermediate suffer redox reaction, so conducting to the formation of ROS. Naphtalen is oxidized by cytochrome P450 system inducing oxidative stress. Thus, in this work, we realized a comparative study between naphtalen and, Nitrofurantoin and Nifurtimox biotransformation catalyzed by cytochrome P450 system. In this study we used a preparation enriched in endoplasmic reticulum of rat liver (microsomes). The incubation of microsomes with naphtalen, Nitrofurantoin or Nifurtimox, and NADPH induced microsomal lipoperoxidation, phenomenon which was inhibited by GSH and a hydroalcoholic extract of *Buddleja globosa* (matico) as a concentration-response manner. The microsomal lipoperoxidation induced by the 3 xenobiotics assayed was conducted as a concentration-dependent and bimodal manner; but naphtalen increased the lipoperoxidation and, Nifrofurantoin and Nifurtimox diminished it. Thus, naphtalen first slope obtained was 2 fold higher than the second slope and, the negative slope obtained to μM drug concentrations of either Nitrofurantoin or Nifurtimox was 20 fold higher than that observed to mM drug concentrations. In biotransformation conditions the 3 xenobiotics: a) diminished the microsomal thiol content and the cytochrome P450 monooxygenase microsomal content ; b) inhibited the p-nitroanisole O-demethylation catalyzed by cytochrome P450 system, phenomenon which was partially inhibited by GSH and DTT. Nitrofurantoin and Nifurtimox could be nitro-reduced and also oxidized by cytochrome P450 system; however, new experiments are required to confirm this postulate. Because oxidative stress induced by the nitro-reduction of Nitrofurantoin and Nifurtimox was inhibited by antioxidant compounds, the administration of an

associated therapy may be considered to diminish the adverse effects described for these drugs.

I. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos, entre ellos los mamíferos, constantemente están expuestos a una amplia variedad de sustancias químicas extrañas a ellos, que se les designa con el nombre de xenobióticos. Los cuales incluye entre otros; los fármacos, los contaminantes ambientales y los constituyentes de los alimentos. Estos compuestos sufren biotransformaciones conducentes a polarizar estas moléculas para su posterior excreción a través de la orina (Riddick, 1997).

En general, el proceso de biotransformación de los fármacos lipofílicos es secuencial, es decir, sufren primariamente reacciones de Fase I (oxidaciones y reducciones) y luego de Fase II (reacciones de síntesis o conjugación). Sin embargo, existen algunos fármacos que requieren sólo la biotransformación por Fase I o sólo Fase II para adquirir la polaridad necesaria y ser eliminados del organismo (Riddick, 1997). Es necesario hacer notar además, que existen fármacos que pueden ser eliminados del organismo parcial o totalmente sin sufrir metabolización (Del Arco, 1997); es el caso de Nitrofurantoína, en donde el 30% del fármaco administrado, se elimina como tal sin sufrir biotransformación (Azanza, 1997).

Las enzimas encargadas de estos procesos se ubican principalmente en el hígado, órgano metabolizador por excelencia. Sin embargo existen otros órganos tales como el riñón, pulmón, glándulas suprarrenales e intestino que también realizan procesos de biotransformación, pero en menor extensión. A nivel subcelular, el principal organelo encargado de la biotransformación de xenobióticos, entre ellos los fármacos, es el retículo endoplásmico hepático; en él se encuentran localizados el sistema oxidativo del citocromo P450 responsable mayoritario de la biotransformación de compuestos lipofílicos (sistema Fase I) y la UDP-glucuroniltransferasa, enzima que conjuga mayoritariamente alcoholes y fenoles con ácido glucurónico (Fase II), conjugados que son en general, farmacológicamente inactivos y fácilmente excretables.

Sistema oxidativo del citocromo P450 microsómico. Este sistema está constituido, entre otros, por una familia de monooxigenasas de función múltiple (hemoproteínas) localizadas fundamentalmente en el retículo endoplásmico de los hepatocitos; en el hígado humano se han descrito al menos doce isoformas (Nebert y colaboradores, 1991), las cuales poseen una amplia selectividad de sustrato. Cada isoforma de la monooxigenasa citocromo P450 es identificada actualmente por el prefijo CYP seguida de un número arábico que indica la familia de genes, una letra mayúscula que corresponde a la subfamilia de genes y un número arábico que identifica el gen individual. Las familias génicas 1, 2 y 3 del citocromo P450 (CYP1, CYP2 y CYP3) son las que codifican las enzimas que intervienen en la mayor parte de las biotransformaciones de fármacos.

Mecanismo de acción del sistema oxidativo del citocromo P450. Las reacciones catalizadas por el sistema oxidativo del citocromo P450 microsómico involucran varias etapas:

1. El xenobiótico o sustrato se une a la monooxigenasa citocromo P450 en su estado oxidado (Fe^{3+}) para formar un complejo binario xenobiótico-monooxigenasa citocromo P450.
2. El Fe^{3+} del complejo binario formado es reducido a Fe^{2+} por la flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa, la cual le transfiere un electrón que se obtiene desde el NADPH. Esta reductasa puede también transferir sus electrones al citocromo c u otro aceptor de electrones exógeno, tales como el azul de metileno, la menadiona y los compuestos nitro-arilos. Tales aceptores de electrones actúan, por lo tanto, como inhibidores de las reacciones de oxidación (Coon y Persson, 1980b). En ocasiones, los electrones son cedidos por el NADH al citocromo b_5 mediante la actividad de la NADH-citocromo b_5 -reductasa.
3. El complejo xenobiótico-monooxigenasa citocromo P450 reducido interactúa con el oxígeno molecular para formar un complejo ternario, el oxi-xenobiótico-

monooxigenasa citocromo P450. En ocasiones, dicho complejo ternario puede disociarse dando lugar a anión superóxido, regenerándose la proteína férrica.

4. El complejo ternario sufre un reordenamiento interno en donde un átomo de oxígeno permanece unido al xenobiótico y el otro reacciona con dos protones para formar agua; el xenobiótico oxidado queda liberado y el citocromo P450 se regenera en su forma férrica.

De acuerdo al mecanismo enzimático descrito, la monooxigenasa, proteína hemínica, une la droga lipofílica en su forma oxidada (Fe^{3+}); cuando esto ocurre, las propiedades espectroscópicas de la enzima cambian. Por otra parte, esta proteína es capaz de unirse a monóxido de carbono en su forma reducida (Fe^{2+}), complejo cuya absorbancia máxima corresponde a 450 nm (Omura y Sato, 1964).

Las isoenzimas de la monooxigenasa citocromo P450 poseen dos a tres grupos tiólicos cuando se encuentran insertas en la membrana microsómica; sin embargo, las isoenzimas solubilizadas exhiben cuatro a cinco grupos tiólicos (Al'terman y colaboradores, 1981). En la actualidad, se han purificado a homogeneidad varias monooxigenasas citocromo P450 y también los demás componentes del sistema oxidativo del citocromo P450, incluyendo los fosfolípidos. Se ha medido la actividad oxidativa en sistemas reconstituidos y se ha concluido que la presencia de los fosfolípidos, fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina, es indispensable para la expresión de dicha actividad (Coon y colaboradores, 1980a). De estas observaciones se deriva la importancia de mantener la integridad de la membrana del retículo endoplásmico con el objeto de conservar las actividades enzimáticas relacionadas con este sistema.

Los sustratos oxidados por este sistema son numerosos y variados y presentan como característica en común su alta lipofilidad. Estos compuestos pueden ser tanto endógenos como exógenos. De los primeros podemos mencionar las prostaglandinas, las hormonas esteroidales y el colesterol: entre los xenobióticos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos, los compuestos nitroarilos, las aminas alifáticas y aromáticas, los pesticidas órgano-halogenados y los alquil-haluros (Karuzina y Archakov, 1994).

Muchos de los sustratos del sistema oxidativo citocromo P450 pueden actuar además, como inductores y también como inhibidores competitivos de su actividad catalítica; esto último se debe a la amplia especificidad de sustrato de las isoformas de la monooxigenasa citocromo P450 (Tinel y colaboradores, 1987).

Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por biotransformación de fármacos a través del sistema citocromo P450. Como se mencionó anteriormente este sistema cataliza reacciones de oxidación y reducción; a través de ambas vías se han descrito ejemplos de xenobióticos que inducen estrés oxidativo. Así por ejemplo, ciertos hidrocarburos aromáticos al ser oxidados por el sistema citocromo P450 pueden inducir estrés oxidativo. La unión de la monooxigenasa citocromo P450 al xenobiótico y al oxígeno molecular genera especies radicalarias transitorias que corresponden a complejos oxi o peroxi-citocromo P450; estas especies altamente inestables pueden generar especies reactivas del oxígeno (ROS) por ruptura del complejo ternario oxixenobiótico-citocromo P450. Al producirse el decaimiento de estos complejos transcientes, se pueden formar además, intermediarios reactivos provenientes del xenobiótico, como epóxidos, N-óxidos, S-óxidos, aldehídos y cetonas (Halpert y colaboradores, 1986; Guengerich y colaboradores, 1990). Al respecto diversas investigaciones han demostrado que el metabolismo oxidativo de los hidrocarburos policíclicos aromáticos genera metabolitos carcinogénicos; los metabolitos se oxidan a electrófilos altamente reactivos (Bock, 1991). Así por ejemplo, el naftaleno es metabolizado por el sistema oxidativo del citocromo P450 a un epóxido, el cual posteriormente, experimenta varias reacciones competitivas: conjugación con GSH, un cambio no enzimático a naftol y la conversión enzimática al dihidrodiol (Quick y Shuler, 1999). Estos dos últimos metabolitos se convierten enzimáticamente a 1,2-naftalenodiol, el cual se oxida a naftoquinona, paso a través del cual se generarían las especies radicalarias del oxígeno, responsables de su toxicidad (Zheng y colaboradores, 1997).

Asimismo, el sistema del citocromo P450 cataliza reacciones de reducción, lo cual es posible ya que una de las enzimas que constituyen este sistema es la citocromo P450 reductasa, flavoproteína cuya actividad enzimática depende en forma específica de

NADPH. Ejemplos de este tipo de reacciones es la nitrorreducción de fármacos nitrofuranos como son la Nitrofurantoína (N-[5-nitro-2-furfurilidina]-1-amino-hidantoína) y el Nifurtimox [4-(5-nitro-furfuriliden)-amino-3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido]. La Nitrofurantoína es un fármaco antimicrobiano utilizado principalmente en infecciones urinarias y el Nifurtimox es un fármaco utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. La reducción del grupo nitro (-NO₂) a nitroso (-NO) es catalizada por la citocromo P450 reductasa, en esta reacción se forma como intermediario un nitroanión radical (NO₂⁻), el cual entra en reciclaje redox con el oxígeno molecular generándose las especies radicalarias O₂⁻ y HO[•] las cuales inducen estrés oxidativo (Letelier y colaboradores, 2004). Al respecto, existe consenso en que los efectos tóxicos que Nifurtimox produce en pacientes chagásicos tratados con este fármaco, se debería a la nitrorreducción enzimática que este compuesto sufriría *in vivo* (Núñez-Vergara y colaboradores, 1997). Asimismo, la toxicidad de la Nitrofurantoína, también ha sido asociada a una inducción de estrés oxidativo (Rossi y colaboradores, 1988; Núñez-Vergara y colaboradores, 1997). Cabe señalar en este punto que, si bien estos nitro-compuestos pueden sufrir *in vivo* nitro-reducción, el NO₂⁻ intermediario puede seguir dos caminos: a) reaccionar con oxígeno molecular generando O₂⁻, reacción en la cual se regenera el compuesto original nitro, completando así un ciclo fútil reductivo y b) continuar hacia el derivado nitroso.

Amplia es la información en la literatura acerca del metabolismo reductivo como también de los efectos adversos de Nitrofurantoína y Nifurtimox; sin embargo, no existen antecedentes acerca del metabolismo oxidativo de estos compuestos. Ambos son compuestos lipofílicos y por lo tanto, deben polarizarse a través de procesos oxidativos, para poder ser eliminados del organismo. Los antecedentes presentados muestran que el sistema del citocromo P450 podría oxidar y reducir simultáneamente a la Nitrofurantoína y al Nifurtimox. Sin embargo, las especies reactivas del oxígeno provenientes de la reducción de estos fármacos podrían inducir oxidación de los lípidos de la membrana, necesarios para la actividad enzimática del sistema citocromo P450. Cabe recordar en este punto, que naftaleno es un xenobiótico, sustrato del sistema citocromo P450 el cual es oxidado y, a su vez, induce estrés oxidativo a través de esta

vía de biotransformación oxidativa. Es por ello que en este trabajo realizamos un estudio comparativo entre el metabolismo catalizado por el sistema citocromo P450 de naftaleno y, Nitrofurantoína y Nifurtimox. Como una forma de evaluar la posible oxidación y reducción simultánea de Nitrofurantoína y Nifurtimox a través del sistema oxidativo del citocromo P450, en este trabajo se establecieron las condiciones a través de las cuales se pudieran evaluar ambos fenómenos. Para ello utilizamos como preparación biológica, microsomas hepáticos de rata (preparación enriquecida en retículo endoplásmico). En estas condiciones se estudió la capacidad de estos xenobióticos de inducir lipoperoxidación microsómica. La preincubación de los microsomas hepáticos de rata ya sea con naftaleno, Nitrofurantoína o Nifurtimox indujo lipoperoxidación microsómica, la cual fue inhibida por la presencia de GSH y un extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* o matico, enriquecido en polifenoles, los cuales son compuestos de reconocida actividad antioxidante. Por otra parte, se determinó la capacidad de estos xenobióticos de unirse a la monooxigenasa citocromo P450 en su forma oxidada (Fe^{3+}) midiendo su espectro de absorbancia de acuerdo a lo descrito en Métodos. Naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox disminuyeron la absorbancia a 450 nm de la monooxigenasa citocromo P450 de una forma concentración-respuesta, indicando con ello que los 3 xenobióticos pueden unirse a la monooxigenasa citocromo P450. Más aún, naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox fueron capaces de inhibir la O-desmetilación de p-nitrofenol, sustrato característico del sistema oxidativo del citocromo P450.

Nuestros resultados indican que Nitrofurantoína y Nifurtimox podrían sufrir no sólo nitrorreducción sino además, oxidación; ambas reacciones serían catalizadas por el sistema citocromo P450 y ocurrirían en forma competitiva y simultánea. Más aún, la nitrorreducción se favorecería a bajas concentraciones de estos fármacos (μM) y la vía oxidativa a altas concentraciones (mM). La importancia farmacológica y toxicológica de estos resultados se discute en el texto.

HIPÓTESIS

Postulamos que la Nitrofurantoína y el Nifurtimox son oxidados a través del sistema oxidativo del citocromo P450, además de inducir estrés oxidativo por nitrorreducción.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar en forma comparativa el metabolismo oxidativo y reductivo de naftaleno y, Nitrofurantoína y Nifurtimox a través del sistema oxidativo del citocromo P450 microsómico de hígado de rata.

2. Objetivos específicos

- 2.1. Evaluar la lipoperoxidación microsómica inducida por el metabolismo de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox en las condiciones catalíticas del sistema oxidativo del citocromo P450.
- 2.2. Evaluar la capacidad antioxidante de GSH y un extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* (matico) sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox.
- 2.3. Medir la capacidad de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox de unirse a la monooxigenasa citocromo P450 oxidasa, mediante la evaluación del espectro de absorbancia de esta enzima.
- 2.4. Determinar el contenido de tioles totales de la membrana microsómica en condiciones de estrés oxidativo inducido por la metabolización de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox.
- 2.5. Evaluar la O-desmetilación de p-nitro-anisol catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450 en presencia de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

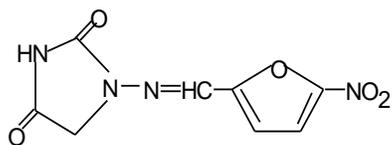
A. MATERIALES

1. Reactivos

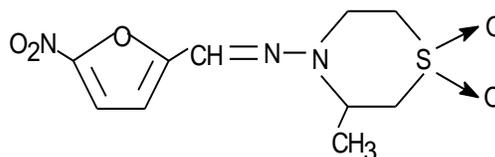
La albúmina de bovino fracción IV, el ácido-5-tio-2-nitrobenzoico (DTNB), el glutatión reducido (GSH), el β -nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato (NADP), la glucosa-6-fosfato (G-6-P), G-6-P deshidrogenasa, p-nitroanisol (PNA), p-nitrofenol (PNP) y el ditionitrito (DTT) se obtuvieron de SIGMA Chemical Co. Chile. El sulfato de cobre, el ácido tiobarbitúrico (TBA), el ácido tricloroacético (TCA), el ditionito de sodio, el ácido fórmico concentrado, el ácido sulfúrico concentrado, el dimetil-sulfóxido (DMSO), el reactivo de Folin-Ciocalteu-fenol, el carbonato de sodio, el tartrato de sodio y potasio, el fosfato diácido de potasio y el naftaleno, se obtuvieron de Merck Chile. El extracto hidroalcohólico (70:30) de *Buddleja globosa* (matico) fue preparado por Laboratorios Ximena Polanco.

Nitrofurantoína: [N-(5-nitro-2-furfurilidina)-1-amino-hidantoína] se obtuvo del recetario magistral Farmacias Ahumada.

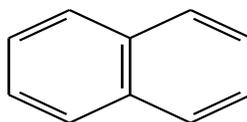
Nifurtimox: [4-(5-nitro-furfuriliden) amino-3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido] se obtuvo de Laboratorios Bayer.



Nitrofurantoína



Nifurtimox



Naftaleno

2. Animales de experimentación

Se emplearon ratas machos de la cepa Sprague Dawley de tres meses de edad y con 200 a 230 g de peso corporal. Los animales se mantuvieron con una dieta normal de pellet Kimber, agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiental de 21° C. Estos animales se obtuvieron del vivero de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Ético Institucional.

B. MÉTODOS

1. Preparación de microsomas hepáticos de rata

Los microsomas fueron preparados por el método de fraccionamiento subcelular descrito en Letelier y colaboradores (1985). Los animales machos se mantuvieron en ayunas por 15 horas previas al sacrificio, con agua *ad libitum*, se sacrificaron por decapitación, se desangraron y los hígados fueron perfundidos, *in situ*, con cuatro volúmenes de 20 mL de NaCl 0,9% P/V. Luego, los hígados se extirparon, se limpiaron de tejido conectivo y vasos sanguíneos, se pesaron, se cortaron en pequeños trozos y se prepararon homogeneizados al 20% en KCl 1,15% P/V. La homogeneización se realizó en forma manual en un homogeneizador Douncen Wheaton tipo B, realizando 12 pases. El homogeneizado total se centrifugó a 9000 x g durante 15 min en una centrifuga refrigerada (4°C) Heraeus Sepatech, modelo Suprafuge 22, para sedimentar células intactas, fragmentos celulares, núcleos y mitocondrias. El sedimento de esta centrifugación se eliminó y el sobrenadante se centrifugó a 105.000 x g durante 1 hora (4°C) en una ultracentrífuga Beckman modelo XL-90. El sedimento de esta última centrifugación se denomina fracción microsómica y corresponde a la preparación enriquecida en retículo endoplásmico.

2. Determinación de proteínas

La proteína de la fracción microsómica se determinó mediante el método de Lowry y colaboradores (1951), utilizando como estándar, albúmina de bovino, fracción IV.

3. Lipoperoxidación microsómica

La lipoperoxidación microsómica se estimó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) por el método convencional descrito en Letelier y colaboradores, 2004. El malonaldehído generado como producto de descomposición de los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado el cual posee una absorbancia máxima a 532 nm y su coeficiente de extinción es $156 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen final de 1,0 mL: amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4; concentraciones variables de proteína microsómica/mL (0,1 a 2,0 mg/mL); concentraciones variables de Nitrofurantoína, Nifurtimox y naftaleno (0,1 a 2,0 mM); β -NADP 0,6 mM; G-6-P 6,0 mM; G-6-P deshidrogenasa 5,0 Unidades/mL. Los blancos contenían sólo amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4 y los xenobióticos respectivos; los controles que corresponden a la lipoperoxidación basal, contenían todos los reactivos a excepción del sistema generador de NADPH y los xenobióticos. Las mezclas se incubaron durante tiempos variables (5 a 60 min) con los xenobióticos a 37°C en un baño termostático, con agitación constante. Al cabo de este período, las proteínas se precipitaron agregando 500 μL de TCA al 20 % P/V frío (4°C). Luego, las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min en una centrifuga refrigerada (4°C) Heraeus Biofuge 15R, con el objeto de decantar la suspensión microsómica; alícuotas de 500 μL de los sobrenadantes se mezclaron con 500 μL de TBA al 1% P/V y se incubaron durante 60 minutos a 50° C, para desarrollar la reacción colorimétrica. Al cabo de este período, se leyó la absorbancia de las muestras a 532 nm, utilizando como referencia los blancos respectivos, en un espectrofotómetro UNICAM/VIS modelo UV 3, acoplado a un computador.

4. Determinación del contenido de citocromo P450

La cuantificación del contenido de la monooxigenasa citocromo P450 fue medida de acuerdo al método descrito por Omura y Sato (1964). Este método aprovecha la capacidad del monóxido de carbono de coordinarse con la monooxigenasa citocromo

P450 reducida y absorber a 450 nm. Los η moles de citocromo P450 se calcularon usando el coeficiente de extinción del conjugado descrito por estos autores, $91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1,0 mL: amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4; proteína microsómica 1,0 mg/mL; concentraciones variables ya sea de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox; ditionito de sodio 5,0 mM; monóxido de carbono a saturación. La referencia contenía todos los reactivos a excepción del monóxido de carbono. A continuación se realizó un barrido de absorbancia entre 390 y 500 nm, utilizando para ello un espectrofotómetro UNICAM/VIS modelo UV 3, acoplado a un computador.

5. Determinación de tioles totales

La medición de los tioles totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita en Letelier y colaboradores (2004). Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre el DTNB y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412 nm y su coeficiente de extinción es $13.600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

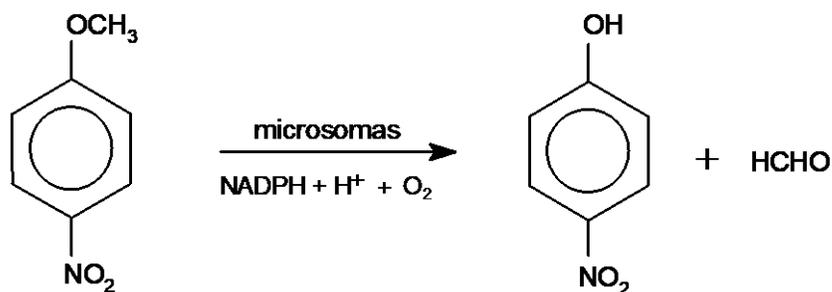
La mezcla de reacción contenía los reactivos siguientes en concentraciones finales (en un volumen de 1,0 mL): amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4; proteína microsómica 0,2 mg/mL; naftaleno 0,5 mM y Nitrofurantoína o Nifurtimox 10 μM ; β -NADP 0,6 mM; G-6-P 6,0 mM; G-6-P deshidrogenasa 5,0 Unidades/mL; DTNB 0,6 mM. Los blancos contenían todos los reactivos, a excepción de la proteína microsómica. Las mezclas se incubaron durante 10 min, a 37°C, en un baño termostático y con agitación constante. A continuación se adicionó el DTNB a las mezclas y se incubaron nuevamente durante 60 min a 37°C en un baño termostático con agitación constante. Al cabo de este período las muestras se centrifugaron a $9.000 \times g$ durante 10 min en una centrífuga refrigerada (4°C) Heraeus Biofuge 15R, con el objeto de decantar la suspensión microsómica. A continuación, se leyeron las absorbancias de los sobrenadantes a 412 nm en un espectrofotómetro UNICAM UV/VIS modelo UV3

acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos. El contenido de tioles fue expresado en η moles de tioles/0.2mg de proteína microsómica.

6. Actividad enzimática catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450: O-desmetilación de p-nitroanisol

La actividad O-desmetilante del sistema oxidativo citocromo P450 microsómico se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y colaboradores (1985). En ella se cuantifica el p-nitrofenol (PNP) formado en la reacción; este compuesto en medio básico absorbe a 410 η m.

La ecuación química que representa la reacción enzimática es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1,0 mL: amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4; proteína microsómica 2 mg/mL; p-nitroanisol (PNA) 1 mM; sistema generador de NADPH constituido por glucosa-6-fosfato 6 mM; NADP 0,6 mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 5,0 Unidades/mL. La reacción enzimática se inició agregando la G-6-P deshidrogenasa. Los blancos contenían todos los reactivos, a excepción de p-nitroanisol. Las mezclas se incubaron durante 1 hora a 37°C en un baño termorregulado, con agitación constante. La reacción se detuvo precipitando las proteínas con 500 μ L de TCA frío (4°C) al 10% P/V. Luego, se centrifugaron a 9.000 x g durante 10 min en una centrifuga refrigerada (4°C) Heraeus Biofuge 15R, con el objeto de separar las proteínas. Alícuotas de 0,5 mL de los sobrenadantes se mezclaron con 0,75 mL de NaOH 1 M y se leyó la absorbancia de ellas a 410 η m en un espectrofotómetro UNICAM UV/VIS modelo UV3, acoplado a un computador. Para cuantificar la actividad O-desmetilante del sistema oxidativo citocromo P450, se utilizó como estándar una solución de p-nitrofenol 100 η moles/mL;

ella fue expresada en η moles de p-nitro-fenol formados/min/mg de proteína microsómica.

La linealidad del método se comprobó realizando una curva estándar de p-nitrofenol. El tiempo de incubación y la concentración de proteína utilizados en la actividad oxidativa medida fueron directamente proporcionales a la concentración de producto formado (Letelier y colaboradores, 1985).

7. Análisis estadístico

Cada uno de los experimentos se realizó al menos en cuadruplicado. Los resultados se expresaron como el promedio de los valores obtenidos de cada experimento \pm las desviaciones estándar de las observaciones de las muestras en relación con sus promedios (test de t-Student); se exigió en cada caso un 95% de certeza. Con el fin de establecer si las diferencias entre los controles y las muestras (microsomas tratados con los xenobióticos) eran estadísticamente significativas, se utilizó el test de t-Student.

III. RESULTADOS

Lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox. Las figuras 1 (naftaleno), 2 (Nitrofurantoína) y 3 (Nifurtimox) muestran estos resultados. Las figuras 1A, 1B y 1C muestran el efecto del tiempo de incubación de los microsomas, la concentración de proteína microsómica y la concentración de naftaleno, respectivamente, sobre la lipoperoxidación microsómica inducida en presencia de NADPH, condición necesaria para determinar metabolismo de compuestos lipofílicos a través del sistema oxidativo del citocromo P450. La lipoperoxidación inducida por biotransformación de naftaleno aumentó en forma lineal respecto del tiempo de incubación de los microsomas con naftaleno (r_A : 0,9916), como asimismo con respecto a la concentración de proteína microsómica (r_B : 0,99972) (figuras 1A y 1B). Sin embargo, el aumento de la lipoperoxidación microsómica inducido al aumentar la concentración de naftaleno fue bimodal (figura 1C). En el rango entre 0 y 0,25 mM de concentraciones ensayadas se observó una pendiente positiva (m_1) cuyo valor fue 1,924; al aumentar las concentraciones de naftaleno desde 0,25 hasta 1 mM, este efecto disminuyó bruscamente y se estableció una nueva pendiente (m_2) cuyo valor fue: 0,864 (figura 1C).

Asimismo, la lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo de Nitrofurantoína (figura 2) y Nifurtimox (figura 3) a través del sistema citocromo P450 aumentó de una forma concentración-respuesta respecto del tiempo de incubación de los microsomas con cada uno de los fármacos (figuras 2A y 3A) como también, con respecto a la concentración de proteína microsómica (figuras 2B y 3 B). Sin embargo, al aumentar la concentración tanto de Nitrofurantoína como de Nifurtimox, la lipoperoxidación microsómica disminuyó de una forma bimodal (figuras 2C y 3C). Así, en el rango de concentración entre 0 y 0,5 mM la pendiente (m_1) para Nitrofurantoína fue: -0,265; y para Nifurtimox, -0,209; asimismo, la segunda pendiente (m_2) para Nitrofurantoína fue -0,0156 y para Nifurtimox, -0,022.

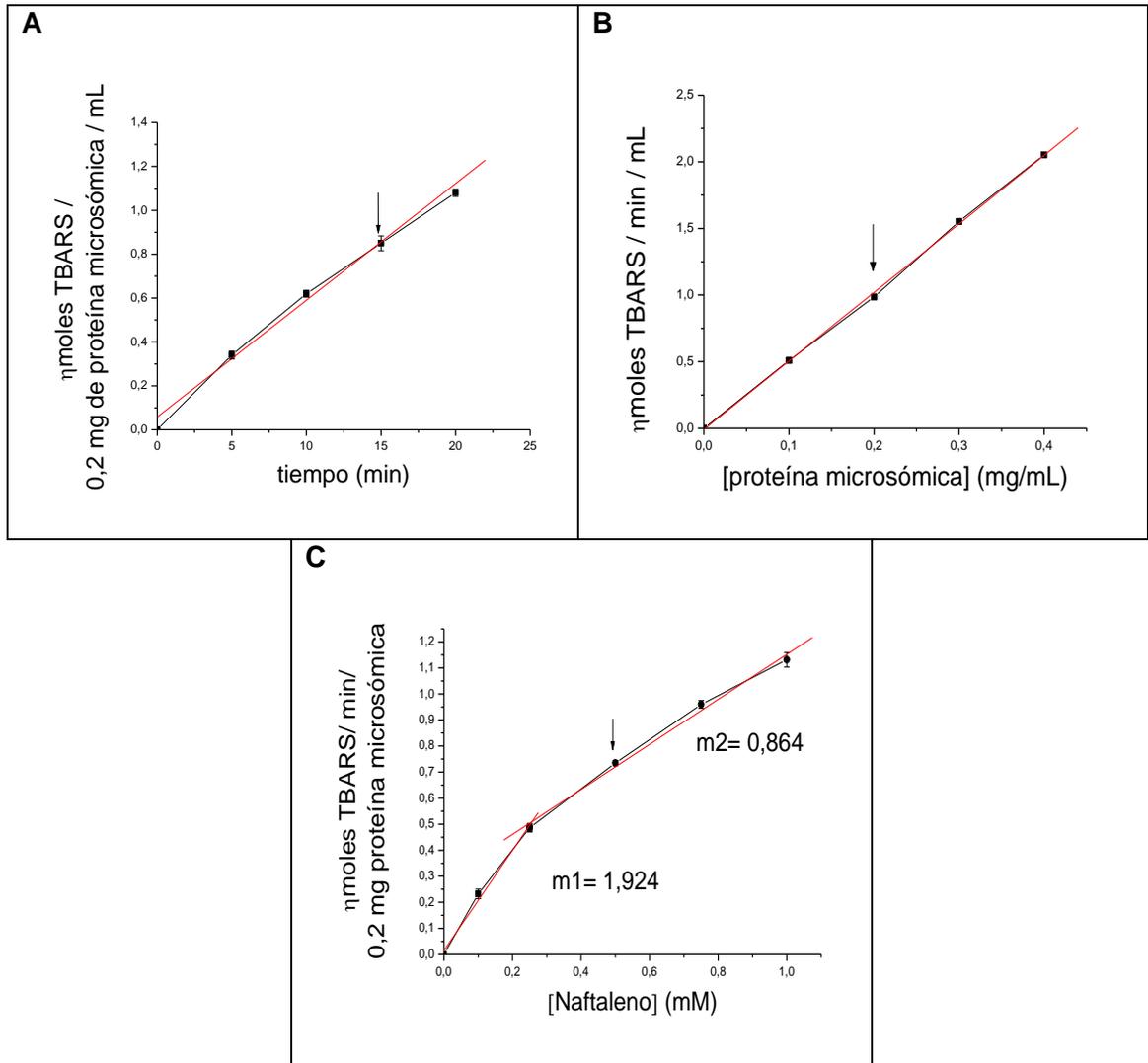


Figura 1. Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo oxidativo de Naftaleno a través del sistema citocromo P450. A: [Proteína microsómica]: 0,2 mg/mL; [Naftaleno] 0.5 mM. B: [Naftaleno]: 0.5 mM; tiempo de incubación: 15 minutos C: [Proteína microsómica]: 0.2 mg/mL; tiempo de incubación: 15 minutos. Las flechas sobre los gráficos indican las condiciones de tiempo de incubación, concentración de proteína y de naftaleno seleccionadas para realizar los experimentos posteriores. La determinación de lipoperoxidación fue realizada de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar. Los valores de regresión lineal de las rectas fueron: rA: 0,9916; rB: 0,99972; rCm1: 0,99606; rCm2:0,99666

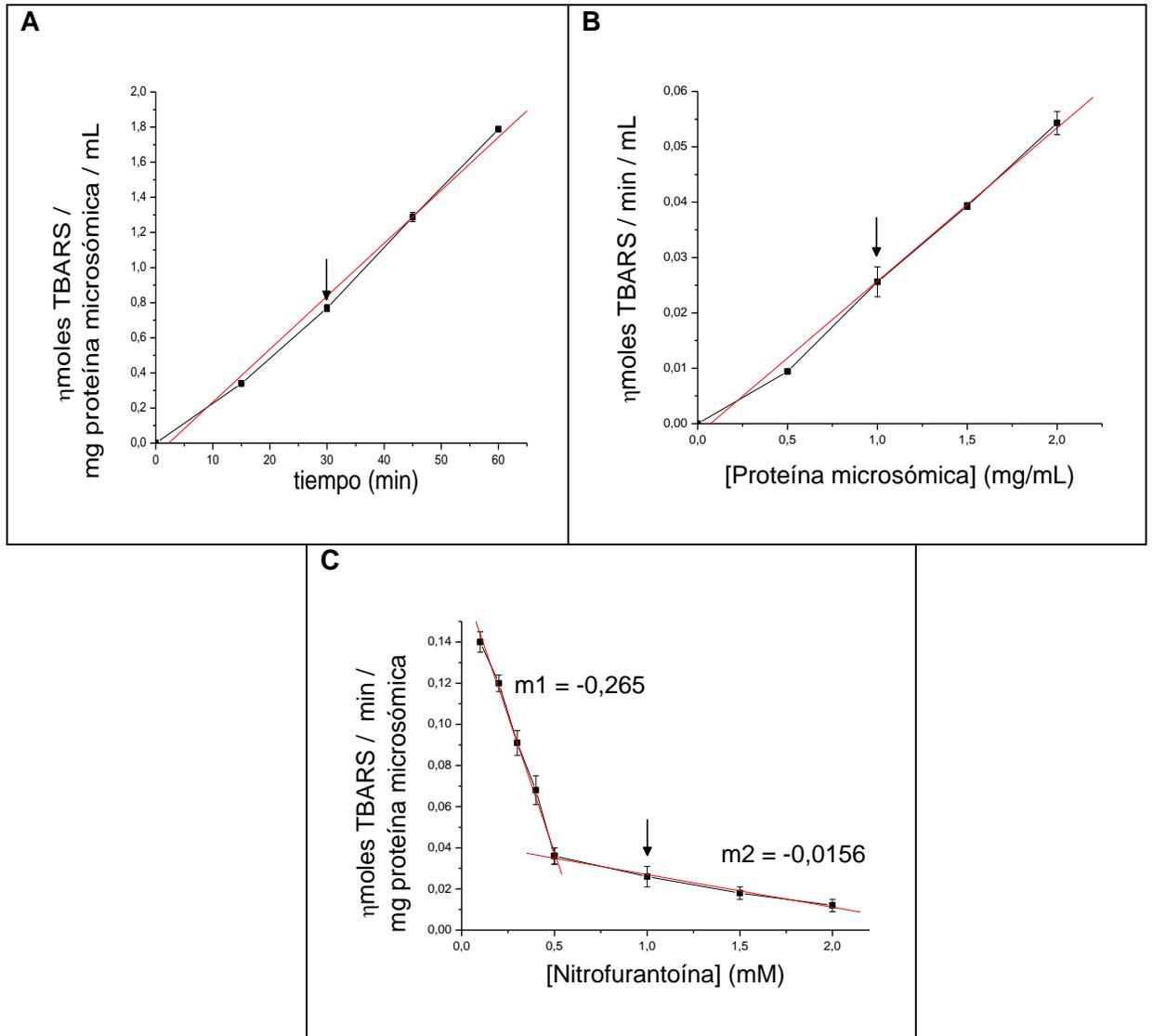


Figura 2. Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo de Nitrofurantoína a través del sistema citocromo P450. A: [Proteína microsómica]: 1,0 mg/mL; [Nitrofurantoína]:1,0 mM. B: [Nitrofurantoína]:1,0 mM; tiempo de incubación: 30 minutos. C: [Proteína microsómica]: 1,0 mg/mL; tiempo de incubación: 30 minutos. Las flechas sobre los gráficos indican las condiciones de tiempo de incubación, concentración de proteína y de Nitrofurantoína seleccionadas para realizar los experimentos posteriores. La determinación de lipoperoxidación fue realizada de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar. Los valores de regresión lineal de las rectas fueron: rA: 0,9967; rB: 0,9972; rCm1: 0,9935; rCm2: 0,9978.

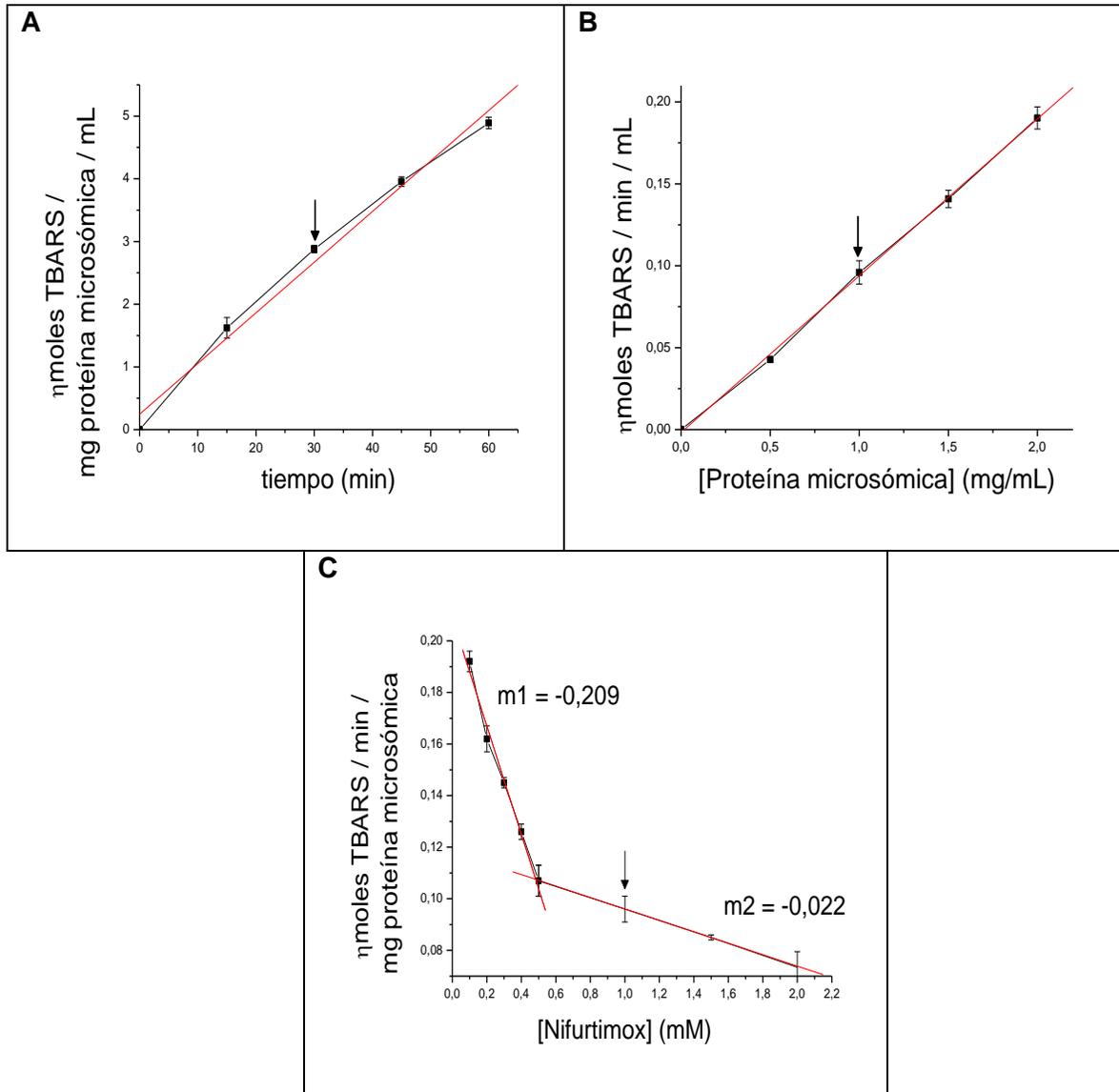


Figura 3. Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo de Nifurtimox a través del sistema citocromo P450. A: [Proteína microsómica]: 1,0 mg/mL; [Nifurtimox]:1,0 mM. B: [Nifurtimox]: 1,0 mM; tiempo de incubación: 30 minutos. C: [Proteína microsómica]: 1,0 mg/ mL; tiempo de incubación: 30 minutos. Las flechas sobre los gráficos indican las condiciones de tiempo de incubación, concentración de proteína y de Nifurtimox seleccionadas para realizar los experimentos posteriores. La determinación de lipoperoxidación fue realizada de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar. Los valores de regresión lineal de las rectas fueron: rA: 0,9940; rB: 0,9996; r_{m1}: 0,9943; r_{m2}: 0,9998.

Lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación a través del sistema citocromo P450 de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox. Efecto de GSH. El efecto de GSH sobre la lipoperoxidación inducida por biotransformación de estos xenobióticos se muestra en las figuras 4A (naftaleno), 4B (Nitrofurantoína) y 4C (Nifurtimox). GSH fue capaz de inhibir la lipoperoxidación inducida por la biotransformación a través del sistema citocromo P450 de estos 3 xenobióticos. El mayor efecto alcanzado fue sobre la lipoperoxidación inducida por Nitrofurantoína y el menor, sobre la lipoperoxidación inducida por naftaleno; esto queda demostrado al comparar los IC_{50} obtenidos que representan la concentración de GSH que inhibe el 50 % la lipoperoxidación ensayada. Así, los IC_{50} fueron: para naftaleno, 1,58 μ moles/0,2 mg de proteína microsómica (figura 4A); para Nitrofurantoína, 0,2 μ moles/mg de proteína microsómica (figura 4B) y para Nifurtimox, 0,69 μ moles/mg de proteína microsómica (figura 4C).

Lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación a través del sistema citocromo P450 de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox. Efecto de *Buddleja globosa* (matico). La preincubación de los microsomas con el extracto hidroalcohólico de matico inhibió la lipoperoxidación inducida por biotransformación a través del sistema citocromo P450 de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox, como lo muestra la figura 5. En este caso el mayor efecto se obtuvo sobre la lipoperoxidación inducida por Nifurtimox (figura 5C) y el menor, sobre aquella inducida por naftaleno (figura 5A). Los IC_{50} que representan la concentración de extracto que inhibe el 50% de la lipoperoxidación inducida por estos xenobióticos, fueron para naftaleno: 0,21 μ L de extracto/0,2 mg de proteína microsómica (figura 5A); para Nitrofurantoína: 0,27 μ L de extracto/mg de proteína microsómica (figura 5B) y para Nifurtimox: 0,16 μ L de extracto/mg de proteína microsómica (figura 5C).

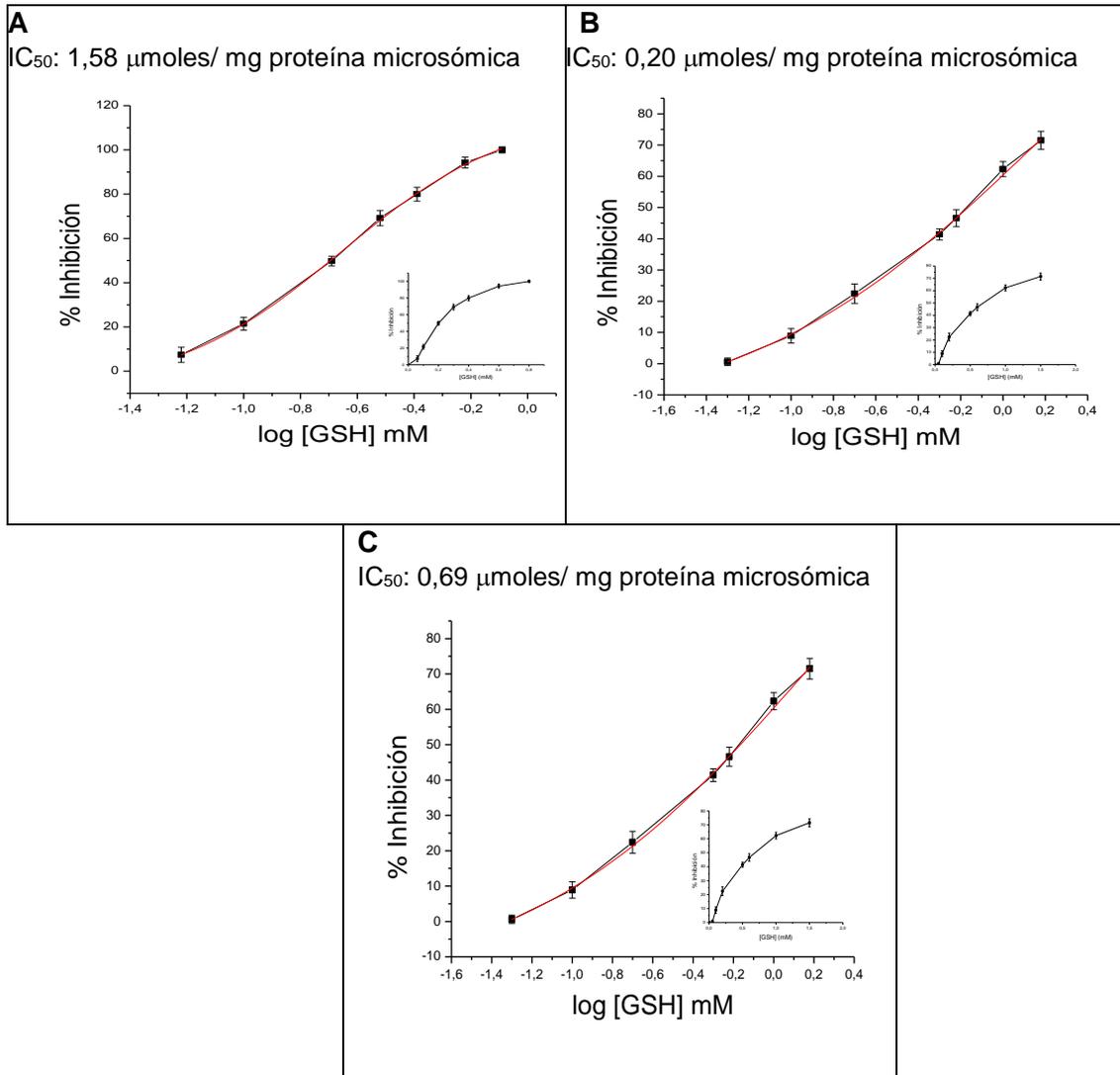


Figura 4. Lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación a través del sistema citocromo P450 de naftaleno (A), Nitrofurantoina (B) y Nifurtimox (C). Efecto de GSH. A:[Naftaleno] 0,5 mM y [proteína microsómica] 0,2 mg/mL; B: [Nitrofurantoina] 1 mM y [proteína microsómica] 1,0 mg/mL; C: [Nifurtimox] 1mM y [proteína microsómica] 1,0 mg/mL. La proteína microsómica fue preincubada a 37° C durante 10 minutos antes de inducir la lipoperoxidación de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los gráficos insertos representan las curvas concentración-respuesta obtenidas de los datos experimentales directos. El valor de IC₅₀ corresponde a la concentración de GSH que inhibió en un 50% la lipoperoxidación inducida por metabolismo de los xenobióticos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes ± su desviación estándar.

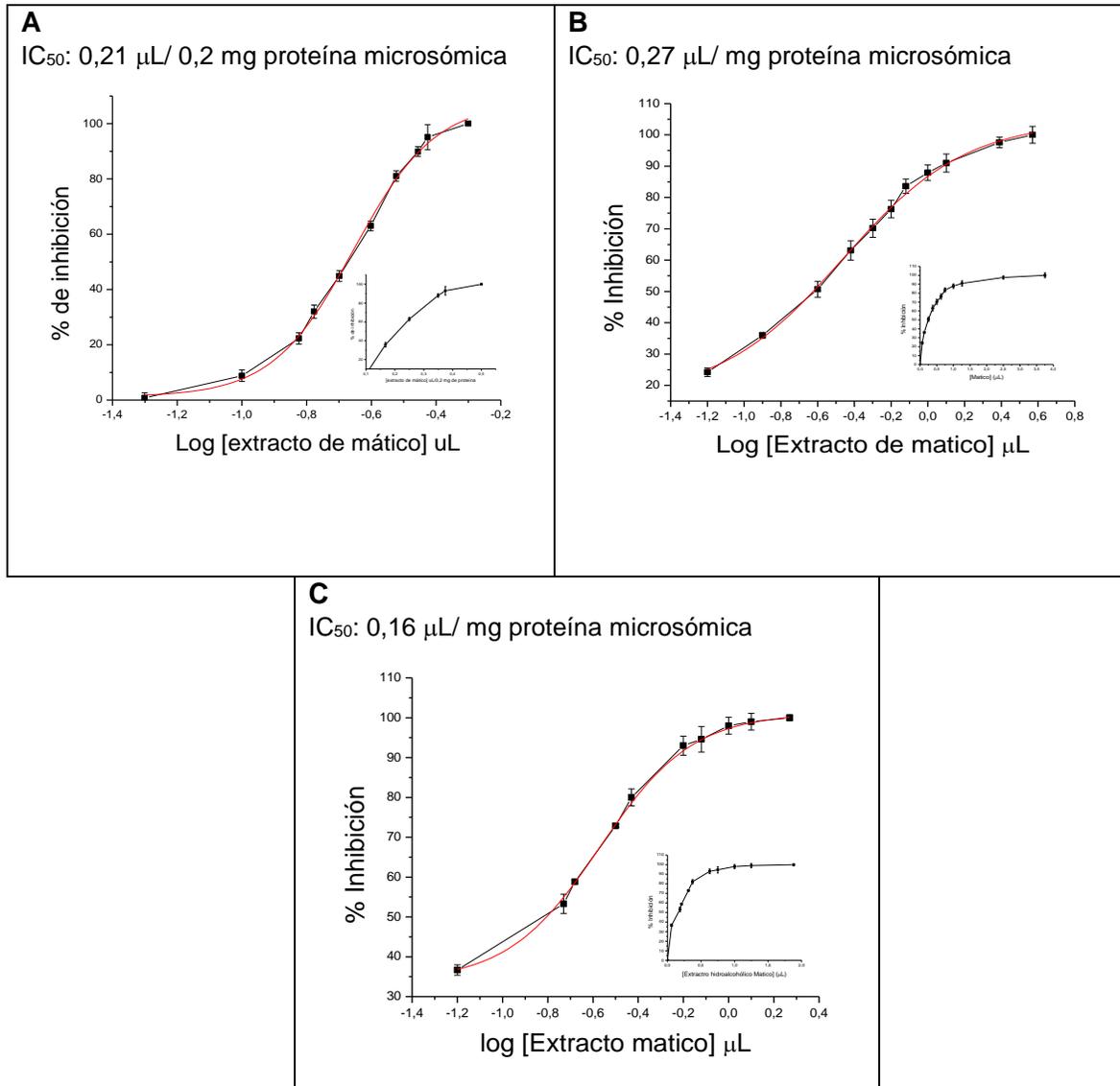


Figura 5. Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo oxidativo de Naftaleno (A), Nitrofurantoina (B) y Nifurtimox (C). Efecto del extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* (matico). A:[Naftaleno] 0,5 mM y [proteína microsómica] 0,2 mg/mL; B: [Nitrofurantoina] 1 mM y [proteína microsómica] 1,0 mg/mL; C: [Nifurtimox] 1mM y [proteína microsómica] 1,0 mg/mL. La proteína microsómica fue preincubada a 37° C durante 10 minutos con el extracto de matico antes de inducir la lipoperoxidación de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los gráficos insertos representan las curvas concentración-respuesta obtenidas de los datos experimentales directos. El valor de IC_{50} corresponde a la concentración de matico que inhibió en un 50% la lipoperoxidación inducida por metabolismo de los xenobióticos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

Efecto de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox sobre el contenido microsómico de la monooxigenasa citocromo P450. La figura 6 muestra el espectro control de la monooxigenasa citocromo P450 determinado de acuerdo a lo descrito en Métodos. La absorbancia máxima de esta enzima disminuyó de una forma concentración respuesta al preincubar los microsomas con naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox, antes de adicionar el ditionito de sodio y formar el complejo monooxigenasa citocromo P450-CO. Los resultados se muestran en la figura 7 y están expresados como η moles de monooxigenasa citocromo P450/mg de proteína microsómica *versus* la concentración de naftaleno (figura 7A), Nitrofurantoína (figura 7B) y Nifurtimox (figura 7C); los valores fueron calculados a partir de las absorbancia experimentales y el coeficiente de extinción molar descrito en Omura y Sato, 1964. La mayor disminución fue provocada por Nifurtimox y la menor por naftaleno; así para obtener una disminución desde 0,7 a 0,4 η moles de citocromo P450/mg de proteína microsómica se necesitaron concentraciones de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox de ~ 1 mM, ~ 15 μ M y ~ 4 μ M, respectivamente.

Como se mencionó en la introducción, los sustratos de la monooxigenasa sólo se unen a su forma oxidada; sin embargo, se pueden producir interacciones inespecíficas de los sustratos con componentes de la membrana microsómica, que podrían alterar la absorbancia máxima de esta enzima. Es por ello que como una forma de evaluar posibles interacciones, se repitió el experimento de la figura 7 en dos condiciones de ensayo: condición A; el xenobiótico fue incubado durante 5 min con la suspensión microsómica antes de adicionar el ditionito de sodio; condición B; la suspensión microsómica fue tratada previamente con ditionito de sodio, y luego incubada 5 min con cada uno de los xenobióticos. A continuación, se les burbujeó monóxido de carbono a ambas mezclas y se les determinaron sus espectros de absorbancia de acuerdo a lo descrito en Métodos. Una muestra de los espectros de la monooxigenasa citocromo P450 obtenidos se muestran en la figura 8 y corresponden a las concentraciones de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox utilizadas 1 mM, 15 μ M y 10 μ M, respectivamente (concentraciones seleccionadas del experimento mostrado en la figura 7). La absorbancia máxima a 450 η m de la monooxigenasa citocromo P450 para los 3 xenobióticos fue menor en la condición A que en la condición B. Como una forma

de descartar la unión inespecífica de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox a la membrana microsómica se calcularon las diferencias entre las η moles de enzima/mg de proteína microsómica obtenidas en la condición B y la condición A. Los resultados aparecen en la Tabla 1 y muestran que Nifurtimox fue el que mayoritariamente se unió a la monooxigenasa citocromo P450, le sigue la Nitrofurantoína y luego, el naftaleno, xenobiótico cuyo metabolismo oxidativo a través del sistema citocromo P450 es reconocido (Tabla 1).

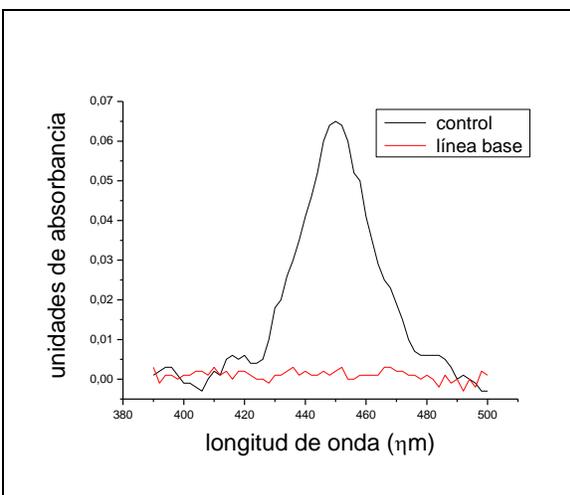


Figura 6. Espectro control de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica. [Proteína microsómica]: 1,0 mg/mL. La técnica utilizada para realizar la determinación del espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 está descrita en Métodos.

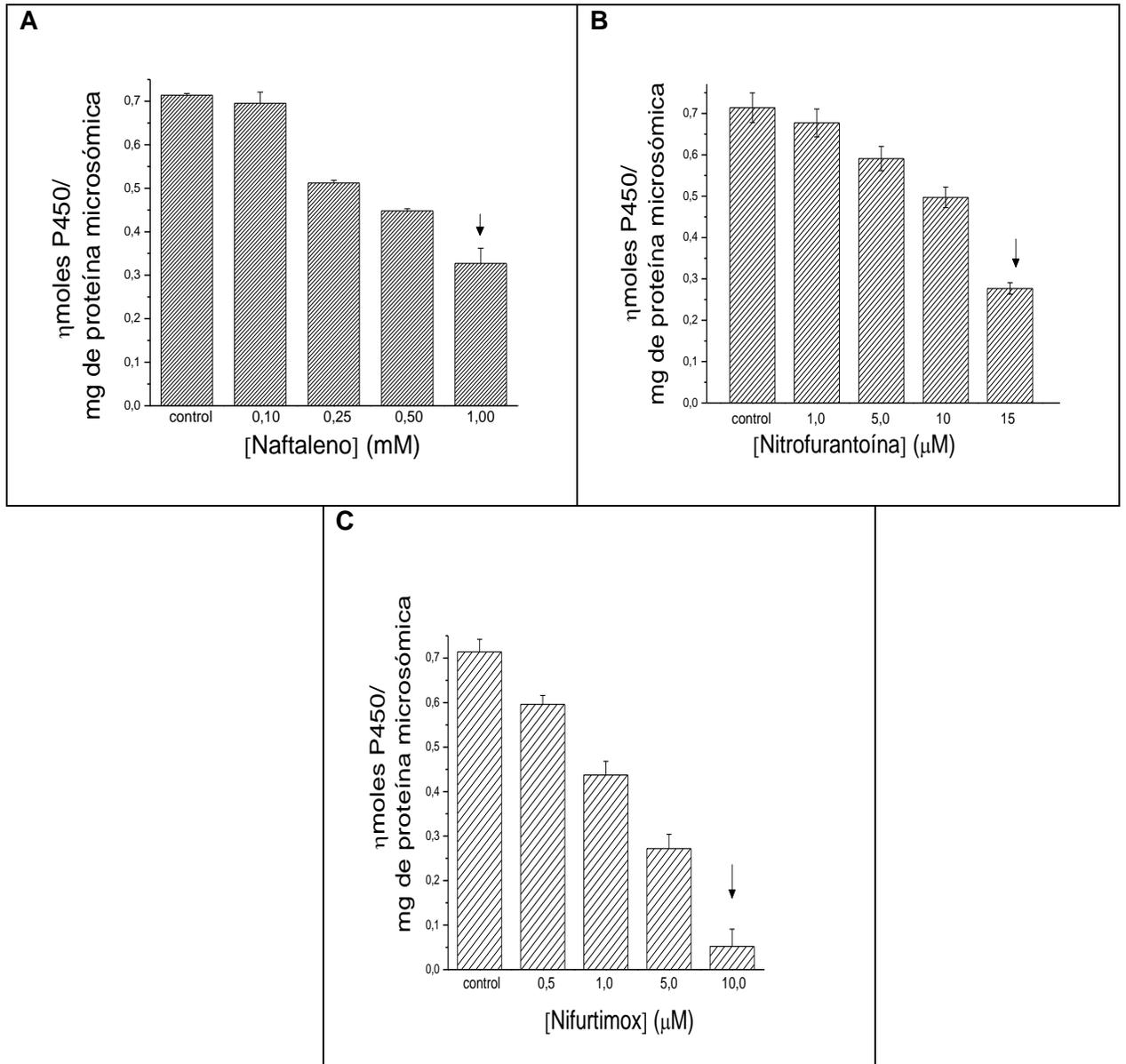


Figura 7. Efecto de naftaleno (A), Nitrofurantoina (B) y Nifurtimox (C) sobre el contenido microsómico de la monooxigenasa citocromo P450. [Proteína microsómica]: 1,0 mg/mL. El contenido de citocromo P450 se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores corresponden a la diferencia entre los ηmoles de citocromo P450 obtenidos al adicionar los xenobióticos a los microsomas antes de adicionar ditionito de sodio y después de adicionar este reductor. Las flechas sobre las barras corresponden a las concentraciones elegidas para realizar los experimentos posteriores. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

A	B
----------	----------

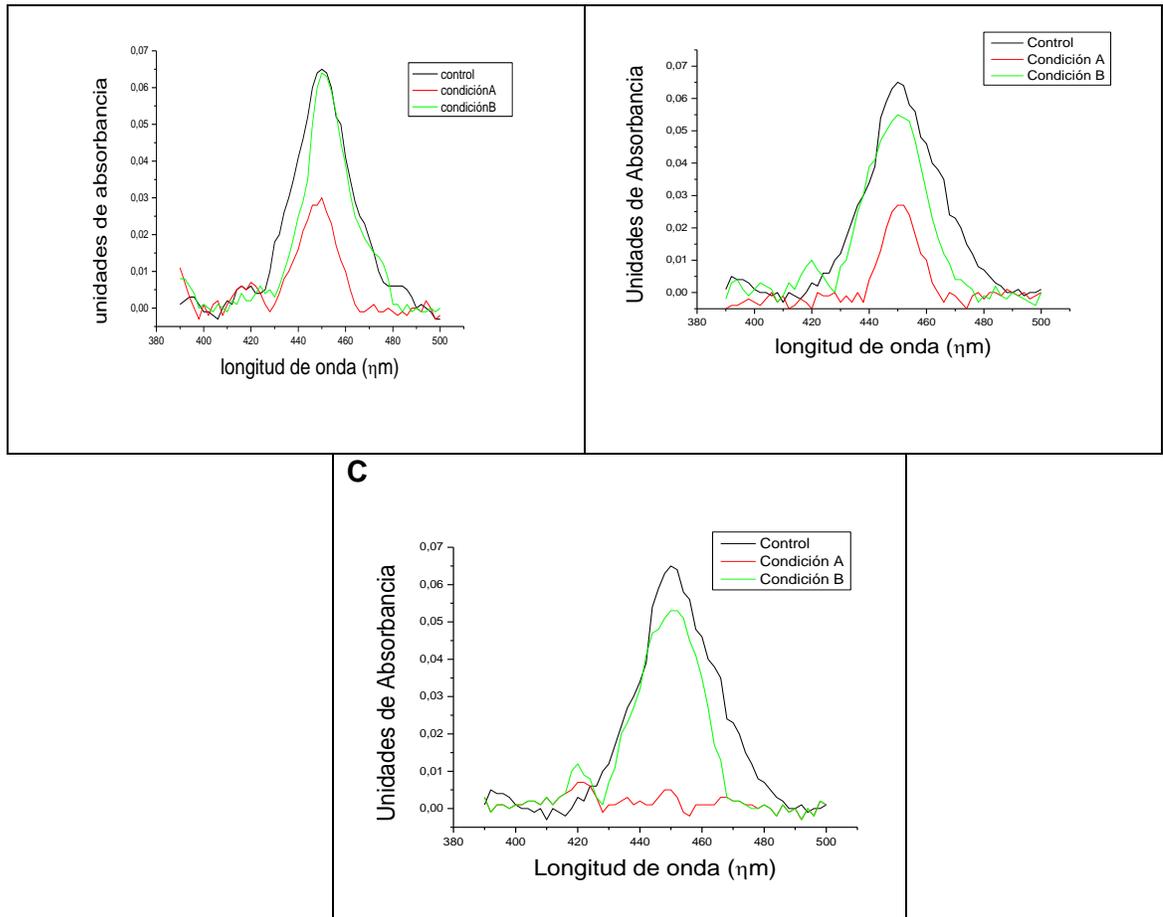


Figura 8. Efecto de naftaleno (A) Nitrofurantoína (B) y Nifurtimox (C) sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica. [Proteína microsómica]: 1,0 mg/mL. [Naftaleno]: 0,5 mM; [Nitrofurantoína]: 15 μ M; [Nifurtimox]: 10 μ M. Condición A: los microsomas fueron preincubados 5 min con el xenobiótico y luego se adicionó ditionito de sodio para determinar el espectro de absorbancia. Condición B: los microsomas, el xenobiótico y el ditionito fueron incubados durante 5 min antes de realizar el espectro de absorbancia. La determinación del espectro de absorbancia se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

--	--	--	--

Xenobiótico	Condición A	Condición B	Diferencia (B - A)
Control	0.714 ± 0.014	0.714 ± 0.004	-----
Naftaleno 1 mM	0,328 ± 0.076	0,645 ± 0.036	0,317
Nitrofurantoína 15 µM	0,277 ± 0.017	0,607 ± 0.025	0,330
Nifurtimox 10 µM	0,052 ± 0.039	0,583 ± 0.025	0,531

Tabla 1. Efecto de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox sobre el contenido microsómico de la monooxigenasa citocromo P450. Los valores están expresados expresado en η moles de citocromo P450/mg de proteína microsómica. Condición A: microsomas incubados durante 5 min con los diferentes xenobióticos, antes de adicionar ditionito de sodio. Condición B: microsomas reducidos con ditionito de sodio y luego incubados con los diferentes xenobióticos durante 5 min. Las condiciones del ensayo y la técnica utilizada están descritas en Métodos. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

Contenido de tioles microsómicos. Efecto de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox en condiciones de biotransformación a través del sistema citocromo

P450. Dado que los 3 xenobióticos ensayados en condiciones de biotransformación indujeron efectos oxidativos sobre los lípidos de la membrana, ensayamos los posibles efectos oxidativos que en estas condiciones podrían producirse sobre los tioles de las proteínas microsómicas. Como lo muestra la figura 9, efectivamente, naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox en condiciones de biotransformación a través del sistema citocromo P450 disminuyeron el contenido de tioles microsómicos; el mayor efecto fue inducido por Nifurtimox (88.1%) y el menor, por naftaleno (53.6%).

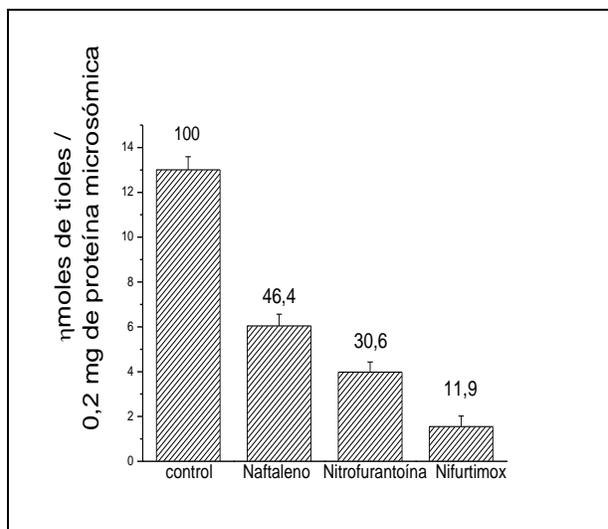


Figura 9. Contenido total de tioles microsómicos. Efecto de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox en condiciones de biotransformación por el sistema citocromo P450. [Proteína microsómica]: 0,2 mg/mL; [naftaleno]: 0,5 mM; [Nitrofurantoína]: 10 μ M; [Nifurtimox]: 10 μ M. El contenido total de tioles se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

O-Desmetilación de p-nitroanisol medida en presencia de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox. Como se mencionó en la introducción, los sustratos del

sistema citocromo P450 pueden actuar como inhibidores de las reacciones catalizadas por este sistema. La O-desmetilación de p-nitroanisol es una reacción que se utiliza comúnmente para medir la actividad enzimática oxidativa del sistema citocromo P450. Como otra forma de evaluar la capacidad de Nitrofurantoína y Nifurtimox de comportarse como sustratos del sistema oxidativo del citocromo P450, se determinó la O-desmetilación de p-nitroanisol en presencia de naftaleno (0,5 mM), Nitrofurantoína (10 μ M) y Nifurtimox (10 μ M). Estos resultados se muestran en la figura 10. Los 3 xenobióticos ensayados inhibieron la O-desmetilación de p-nitroanisol; los porcentajes fueron los siguientes: Nitrofurantoína 83,3%, Nifurtimox 74% y naftaleno 52,5%.

La inducción de estrés oxidativo por biotransformación a través del citocromo P450 puede inactivar al sistema oxidativo del citocromo P450; esta inactivación puede ser provocada por la oxidación de los grupos tiólicos de la monooxigenasa citocromo P450, como también por la oxidación de los lípidos de la membrana microsómica, los cuales son fundamentales para el desarrollo de su actividad enzimática. Así, el efecto inhibitorio sobre la O-desmetilación de p-nitroanisol inducido por naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox observado, podría ser provocado por la inactivación parcial del sistema citocromo P450 por el estrés oxidativo inducido por biotransformación de estos xenobióticos. Como una forma de diferenciar los efectos oxidativos de los estrictamente debidos a la biotransformación, se repitió la O-desmetilación en presencia de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox, pero ahora en presencia además, de GSH y DTT. Los resultados se muestran en la figura 11. GSH 2 mM y DTT 2 mM disminuyeron parcialmente el efecto inhibitorio sobre la O-desmetilación provocado por naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox. Así, al preincubar los microsomas con GSH la actividad residual O-desmetilante de p-nitroanisol obtenida en presencia de naftaleno aumentó desde 47,5 % a 81,6% (figura 11, condición A) y con DTT, desde 47,5% a 88,5% (figura 11, condición B). Asimismo, en presencia de GSH la actividad residual O-desmetilante de p-nitroanisol obtenida en presencia de Nitrofurantoína y Nifurtimox aumentó desde 16,7% a 64,6% y 26% a 48,1%, respectivamente (figuras 11 B y 11C, condición A); de la misma forma, al preincubar los microsomas con DTT la actividad residual O-desmetilante de Nitrofurantoína y Nifurtimox aumentó desde 16,7% a 89% y desde 26% al 64,8%, respectivamente (figura 11 B y 11C, condición B).

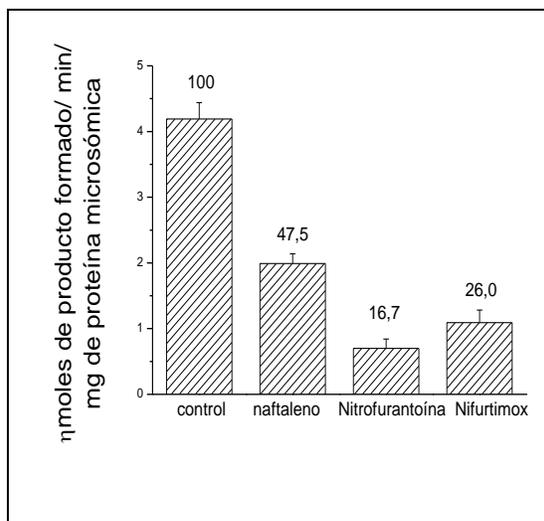


Figura 10. Efecto de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox sobre la O-desmetilación de p-nitroanisol. [Proteína microsómica]: 2 mg/mL; [naftaleno]: 0,5 mM; [Nitrofurantoína] 10 μ M; [Nifurtimox] 10 μ M. Control: sistema en ausencia de los xenobióticos. La O-desmetilación se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

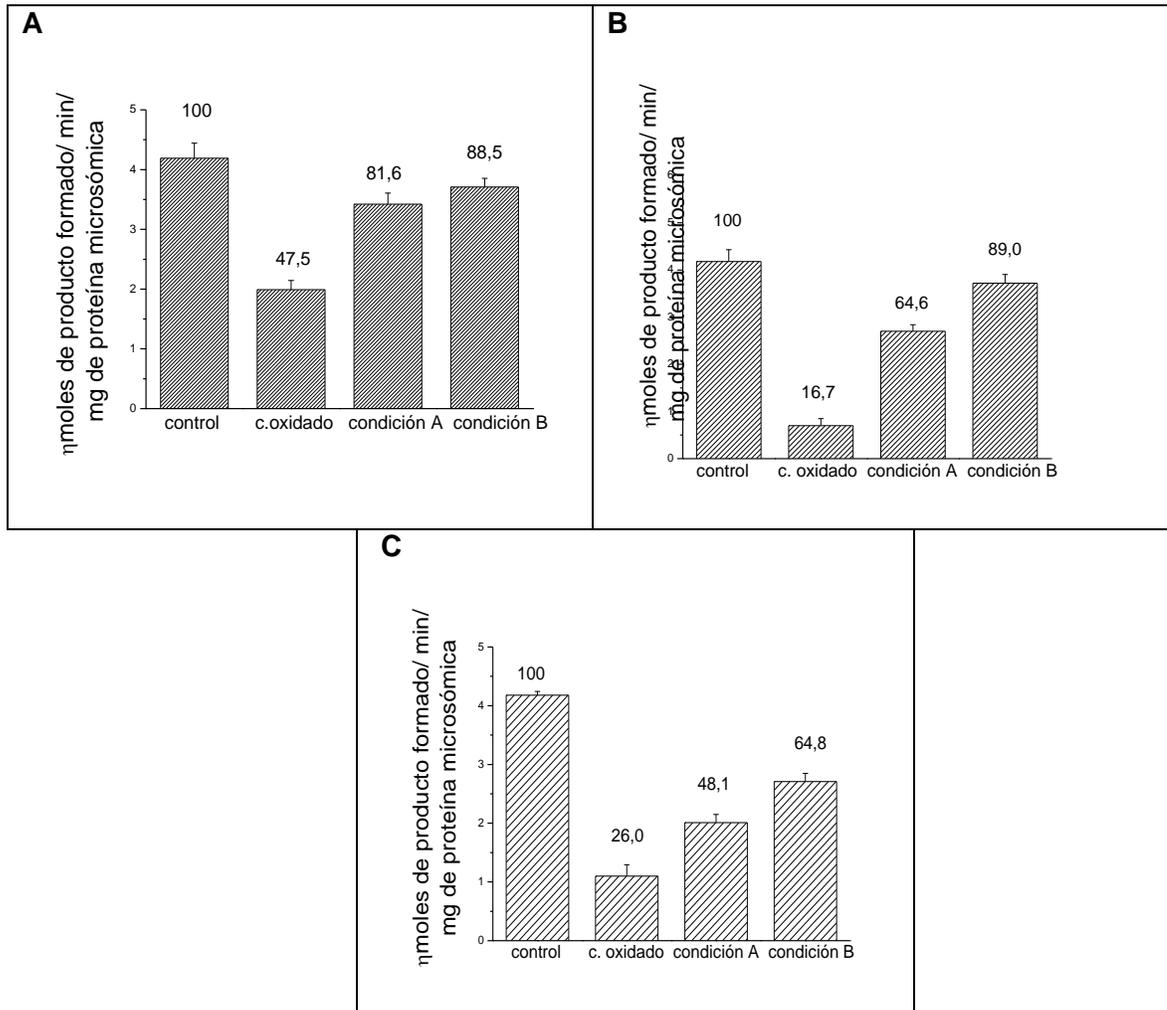


Figura 11. O-Desmetilación de p-nitroanisol en presencia de naftaleno (A), Nitrofurantoína (B) y Nifurtimox (C). Efecto de GSH y DTT. [Proteína microsómica]: 2 mg/mL; [naftaleno]: 0,5 mM; [Nitrofurantoína] 10 μ M; [Nifurtimox] 10 μ M. Control: sistema en ausencia de los xenobióticos. C. oxidado: sistema en presencia de los xenobióticos. Condición A: La proteína microsómica se preincubó durante 5 minutos con GSH 2 mM y luego se adicionaron los xenobióticos. Condición B: La proteína microsómica se preincubó durante 5 minutos con DTT 2 mM y luego se adicionaron los xenobióticos. La O-desmetilación se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes \pm su desviación estándar

IV. DISCUSIÓN

La Nitrofurantoína es un fármaco antimicrobiano utilizado principalmente en infecciones urinarias y el Nifurtimox es un fármaco trypanocida utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Son numerosos los antecedentes que existen en la literatura acerca del metabolismo reductivo como también de los efectos adversos producidos por la administración de Nitrofurantoína y Nifurtimox (Rossi y colaboradores, 1988; Núñez-Vergara y colaboradores, 1997; Letelier y colaboradores, 2004). Ambos son compuestos lipofílicos y por lo tanto, deben polarizarse a través de procesos oxidativos para poder ser eliminados del organismo; sin embargo, no existen antecedentes acerca del metabolismo oxidativo de estos compuestos, ni tampoco de la presencia en orina de metabolitos de estos fármacos. El principal responsable del metabolismo oxidativo de xenobióticos lipofílicos es el sistema oxidativo del citocromo P450, el cual se localiza principalmente en el retículo endoplásmico hepático. Letelier y colaboradores (2004) demostraron que microsomas hepáticos de rata en presencia de NADPH y Nitrofurantoína como Nifurtimox (condiciones de biotransformación oxidativa), eran capaces de generar especies reactivas del oxígeno (ROS) e inducir lipoperoxidación microsómica, disminución de los tioles microsómicos y activación oxidativa de la UDP-glucuroniltransferasa. Los autores demostraron que las especies reactivas del oxígeno eran provenientes de la nitrorreducción tanto de Nitrofurantoína como Nifurtimox, reacción catalizada por la citocromo P450 reductasa, enzima que forma parte del sistema oxidativo del citocromo P450. Al respecto cabe señalar que hidrocarburos aromáticos policíclicos, como naftaleno por ejemplo, no sólo son oxidados por el sistema del citocromo P450, sino además, inducen estrés oxidativo a través de su biotransformación oxidativa (Bock, 1991; Zheng y colaboradores, 1997). Sin embargo, la generación de ROS que este proceso conlleva, induce oxidación de lípidos y grupos tiólicos de proteínas, entre ellas la monooxigenasa del citocromo P450, enzima tiólica que une los sustratos lipofílicos a oxidar por el sistema del citocromo P450. En este punto cabe recordar que tanto los lípidos de la membrana microsómica como los grupos tiólicos de esta enzima, son fundamentales para su actividad enzimática (Omura y Sato, 1964; Al'terman y colaboradores, 1981).

Estos antecedentes nos llevaron a intentar probar la participación del sistema del citocromo P450 no sólo en la nitrorreducción sino también, en la oxidación de Nitrofurantoína y Nifurtimox. Las curvas de concentración de Nitrofurantoína y Nifurtimox *versus* la lipoperoxidación microsómica inducida en condiciones de biotransformación, disminuyeron la lipoperoxidación, fenómeno bimodal dependiente de la concentración de estos fármacos, así, a concentraciones μM de Nitrofurantoína y Nifurtimox, la pendiente de disminución fue 20 y 10 veces mayor que a concentraciones mM , respectivamente (figuras 2C y 3C). Estos resultados muestran que probablemente Nitrofurantoína como Nifurtimox están siendo derivados a algún otro proceso de biotransformación microsómica, más allá de la nitrorreducción que ellos sufren. Este proceso metabólico podría ser su biotransformación oxidativa por el sistema del citocromo P450. Sin embargo, el cambio tan brusco de pendiente desde las concentraciones μM a mM , podría indicar también que las especies oxidantes generadas por nitrorreducción (ROS) puedan estar siendo atrapadas por algún mecanismo antioxidante microsómico. En este sentido cabe señalar que en el microsoma se encuentra presente una isoforma de la GSH-transferasa, enzima que además de conjugar sustratos lipofílicos y altamente electrofílicos es capaz de reducir lipoperóxidos (Mosialou y Morgenstern, 1989). Más aún, esta enzima se activa frente a H_2O_2 (Aniya y Naito, 1993) Así, probablemente, los lipoperóxidos acumulados por la oxidación de los lípidos podrían estar siendo reducidos por la GSH-transferasa, lo cual impediría la formación de malondialdehído que es el producto de la lipoperoxidación que medimos en nuestros experimentos (figuras 2C y 3C). Sin embargo, la lipoperoxidación microsómica aumentó al aumentar la concentración de naftaleno en forma también bimodal (figura 1C). Cabe recordar en este punto que la oxidación de este xenobiótico y la inducción de estrés oxidativo inducida por biotransformación son llevados a cabo por la vía oxidativa del citocromo P450; es decir, en ambos procesos es la monooxigenasa del citocromo P450 la que une al xenobiótico y luego el complejo ternario monooxigenasa-xenobiótico-oxígeno se desestabiliza generando ROS. En cambio, el estrés oxidativo inducido por la biotransformación de Nitrofurantoína y Nifurtimox es provocado por la nitrorreducción de estos compuestos, reacción que es catalizada por el citocromo P450 reductasa, enzima que forma parte del sistema del citocromo P450. Esto nos lleva a pensar que la localización subcelular tanto de esta

reductasa como de la monooxigenasa citocromo P450 es muy cercana. Los postulados presentados podrían explicar las respuestas opuestas observadas frente al efecto de concentración sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación de naftaleno y, Nitrofurantoína y Nifurtimox.

Dado que Nitrofurantoína y Nifurtimox son altamente lipofílicos, en estas condiciones su interacción con la monooxigenasa es probable. Como se mencionó en la introducción, esta enzima es una proteína hemínica y en la primera etapa del mecanismo de reacción los sustratos lipofílicos del sistema oxidativo del citocromo P450 se unen a esta monooxigenasa en su estado Fe^{3+} ; el complejo binario formado posteriormente es reducido por la citocromo P450 reductasa. Nuestros resultados mostraron que ambos fármacos se unen a la monooxigenasa citocromo P450 de una forma concentración-respuesta (figuras 7 y 8; Tabla 1), ensayo determinado evaluando los cambios en la absorbancia máxima de la monooxigenasa citocromo P450 por interacción con los fármacos en estudio (Omura y Sato, 1964). Por otra parte, es un hecho conocido que los sustratos del sistema oxidativo citocromo P450 pueden actuar como inhibidores competitivos de la actividad catalítica de este sistema (Tinel y colaboradores, 1987). Si dos compuestos son sustratos del sistema oxidativo del citocromo P450, competirán por la unión a la monooxigenasa citocromo P450 para formar el complejo binario y por tanto, la biotransformación de ellos se inhibe. Por otra parte, la conservación de los lípidos como la de los grupos tiólicos microsómicos son indispensables en la actividad del sistema del citocromo P450 (Al'terman y colaboradores, 1981). Sin embargo, la biotransformación de naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox indujo lipoperoxidación microsómica y oxidación de los tioles proteicos microsómicos (figura 9), fenómenos que pueden inhibir la actividad del sistema oxidativo del citocromo P450. Al respecto, la O-desmetilación de p-nitroanisol reconocida reacción catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450 fue inhibida por naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox (figura 10), fenómeno que fue prevenido parcialmente por GSH y DTT (ambos reductores que no son sustratos del sistema oxidativo del citocromo P450) (figura 11). Estos resultados indican que la inhibición de la O-desmetilación de p-nitroanisol observada en presencia de naftaleno,

Nitrofurantoína y Nifurtimox tendría dos componentes: el estrés oxidativo inducido por biotransformación y la inhibición competitiva por sustrato.

Por otra parte, la lipoperoxidación microsómica fue inhibida por la presencia de GSH y *Buddleja globosa* o matico, extracto hidroalcohólico enriquecido en polifenoles, compuestos de reconocida actividad antioxidante. Cabe señalar que se aconseja que la administración de Nitrofurantoína no debiera superar los 10 días de tratamiento para evitar los efectos adversos asociados a el estrés oxidativo que este fármaco induce *in vivo* (Dwyer y O'Reilly, 2002). Asimismo, los efectos adversos en los pacientes chagásicos tratados con Nifurtimox se asocian a la inducción de estrés oxidativo inducido por su nitrorreducción. Generalmente los fármacos que inducen estrés oxidativo por biotransformación se consideran de alto riesgo por la capacidad de inducir carcinogénesis y por lo mismo son eliminados del comercio. Sin embargo, la falta de otras alternativas terapéuticas hace que el uso de algunos de ellos persista; este es el caso de Nitrofurantoína y Nifurtimox. Por lo tanto, la evaluación de terapias antioxidantes asociadas al uso de este tipo de fármacos debería ser evaluada, lo cual ayudaría a disminuir el alto riesgo implícito en el uso de este tipo de fármacos.

Resumiendo podemos decir que Nitrofurantoína y Nifurtimox se metabolizarían no sólo por nitrorreducción sino también, por oxidación a través del sistema oxidativo del citocromo P450, fenómenos que sucederían en forma competitiva y simultánea. Este postulado requiere ser confirmado y para ello estamos realizando experimentos que demuestren: a) la inhibición competitiva que Nitrofurantoína y Nifurtimox ejercerían sobre diferentes reacciones catalizadas por el sistema citocromo P450; y b) la presencia de los posibles metabolitos provenientes de la biotransformación oxidativa de estos fármacos.

CONCLUSIONES

- Naftaleno aumentó la lipoperoxidación microsómica y, Nitrofurantoína y Nifurtimox, la disminuyeron. De una forma concentración-respuesta. Este fenómeno tuvo un comportamiento bimodal, es decir, la primera pendiente positiva obtenida en presencia de naftaleno fue 2 veces mayor que la segunda; asimismo, la pendiente negativa obtenida a concentraciones μM de ya sea Nitrofurantoína o Nifurtimox fue 20 y 10 veces mayor que la obtenida a concentraciones mM , respectivamente.
- El proceso oxidativo inducido por los 3 xenobióticos fue inhibido por GSH y por un extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* (matico) de una forma concentración-respuesta.
- Naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox se unieron a la monooxigenasa citocromo P450 de una forma concentración-respuesta.
- Naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox disminuyeron el contenido de tioles microsómicos en condiciones de biotransformación.
- Naftaleno, Nitrofurantoína y Nifurtimox inhibieron la O-desmetilación de p-nitroanisol, reacción catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450, fenómeno que fue prevenido parcialmente por GSH y DTT.
- Nitrofurantoína y Nifurtimox se nitrorreducen y además, se oxidarían a través del sistema oxidativo del citocromo P450.

V. REF ERENCIAS

1. Al'terman, M.; Marekushev, S.; Levchenko, I.; Raevskii, A. y Devichenskii, V. (1981). Cytochrome P450 distribution in endoplasmic reticulum membranes of rat liver. *Biokhimiia*. **46(2)**: 222-229.
2. Aniya Y. y Naito A. (1993). Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem Pharmacol*. **45(1)**: 37-42.
3. Azanza, J.; Sádaba, D. y Mediavilla, A. (1997). Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. Nitrofurantoína. In: Flórez J. (Editor). *Farmacología Humana*. 3ª Edición. Masson S.A. Barcelona, España. pp 1145-1157
4. Bock, K.W. (1991). Roles of UDP-glucuronyltransferases in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **26(2)**: 129-150.
5. Coon, M.; Person, A. y French, J. (1980a). On the possible relationship of cytochrome P-450 to alcohol metabolism: fundamental aspects of the microsomal hydroxylation system, including properties and interactions of the components. *Adv. Exp. Med. Biol*. **132**: 11-22. Review.
6. Coon, M.J. y Persson, A.V. (1980b). Microsomal Cytochrome P450: A Central Catalyst in Detoxication Reactions. In: *Enzymatic Basis of Detoxication*. (Jacoby, W.B., ed.). **Vol. I**: 117-134. Academic Press. New York.
7. Del Arco, C. (1997). Metabolismo de los fármacos. In: Flórez J. (Editor). *Farmacología Humana*. 3ª Edición. Masson S.A. Barcelona, España. pp 73-85.

8. Dwyer P. y O'Reilly M. (2002). Recurrent urinary tract infection in the female. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2002. **14(5)**: 537-543.
9. Guengerich, F.; Shimada, T.; Iwasaki, M. y Martin, M. (1990). Activation of mutagens by human cytochrome P-450 enzymes. *Prog. Clin Biol. Res.* **340B**: 87-96.
10. Halpert, J.; Balfour, C.; Miller, N. y Kaminsky, L. (1986). Dichloromethyl compounds as mechanism-based inactivators of rat liver cytochromes P-450 in vitro. *Mol Pharmacol.* **30(1)**: 19-24.
11. Karuzina, I. y Archakov, A. (1994). Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P450 during monooxygenasa reactions. *Free Radical Biol. Med.* **17(6)**: 557-567.
12. Letelier, M. E.; Del Villar, E. y Sánchez, E. (1985). Drug tolerance and detoxicating enzymes in *Octodon degus* and Wistar rats. A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.* **80c(1)**: 195-198.
13. Letelier, M. E.; Izquierdo, P.; Godoy, L.; Lepe A. M. y Faúndez, M. (2004). Liver microsomal biotransformation of nitro-aryl drugs: A mechanism for potencial oxidative stress induction. *J. Appl. Toxicol.*, **24(6)**: 519-525.
14. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-273.
15. Mosialou, E. y Morgenstern, R. (1989). Activity of rat liver microsomal glutathione transferase toward products of lipid peroxidation and studies of the effect of inhibitors on glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **275 (1)**: 289-294.
16. Nebert, D.; Nelson, D.; Coon, M.; Estabrook, R.; Feyereisen, R.; Fujii-Kuriyama, Y.; González, F.; Guengerich, F.; Gunsalus, I. y Johnson, E. (1991).

The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* **10(1)**: 1-14.

17. Nuñez-Vergara, L.; J., Squella, J. A.; Aldunate, J.; Letelier, M. E.; Bollo, S., Repetto, Y.; Morello, A. y Spencer, P. L. (1997). Nitro radical anion formation from Nifurtimox, Part I: Biological evidences in *Tripanosoma cruzi*. *Bioelectrochem. & Bioenerg.* **43**: 151-155.
18. Omura, T. y Sato, R. (1964). The Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* **239(7)**: 2370-2378.
19. Quick, D. J. y Shuler, M. L. (1999). Use of in vitro data for construction of a physiologically based pharmacokinetic model for naphthalene in rats and mice to probe species differences. *Biotechnol. Prog.* **14**: 540-555.
20. Riddick, D. (1997). General principles of pharmacology. In: Kallant H.; Roschlau W. (Eds.). *Principles of Medical Pharmacology*. 6^a ed. Oxford University Press. New York, USA. pp. 38-54.
21. Rossi, L.; Silva, J.M.; McGirr, L.G. y O'Brien, P.J., (1988). Nitrofurantoin-mediated oxidative stress cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharm.*, **37 (16)**: 3109-3117.
22. Tinel, M.; Belghiti, J.; Descatoire, V.; Amouyal, G.; Letteron, P.; Geneve, J.; Larrey, D. y Pessayre, D. (1987). Inactivation of human liver cytochrome P450 by the drug methoxsalen and other psoralen derivates. *Biochem. Pharmacol.* **36(6)**: 951-955.
23. Zheng, J.; Cho M.; Jones, A. D.; Hammock B. D. (1997). Evidence of quinone metabolites of naphthalene covalently bound to sulfur nucleophiles of proteins of murine clara cells after exposure to naphthalene. *Chem. Res. Toxicol.* **10**: 1008-1014.

