

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



**NITROARIL-1,4-DIHIDROPIRIDINAS COMO ANTIOXIDANTES CONTRA  
LA OXIDACIÓN DE MICROSOMAS HEPÁTICOS DE RATA INDUCIDA  
POR Fe<sup>3+</sup>/ASCORBATO,  
NITROFURANTOÍNA Y NAFTALENO.**

**Patrocinante:**

Prof. María Eugenia Letelier M.  
Laboratorio de Farmacología.  
Departamento de Química  
Farmacológica y Toxicológica.

**Director de memoria:**

Prof. María Eugenia Letelier M.  
Laboratorio de Farmacología.  
Departamento de Química  
Farmacológica y Toxicológica.

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

***ALFREDO ENRIQUE MOLINA BERRIOS***

SANTIAGO DE CHILE

2007

**“Lo importante no es llegar, lo  
importante es el camino”**

*A mi papá, por creer siempre.*

## **Agradecimientos**

*Quiero agradecer a mi papá, mamá y hermana por apoyarme siempre. Esto fue posible gracias a ustedes. Los quiero mucho.*

*Gran parte de este logro, se lo debo también a una persona que siempre supo qué decir para encaminarme y aprender de todo lo positivo y negativo que tiene esta carrera. Profesora María Eugenia Letelier, nunca podré agradecerle lo suficiente, por ser la guía de este camino que a veces se ve tan cuesta arriba. Muchísimas gracias por la confianza y la fe que ha puesto siempre en lo que me he propuesto lograr.*

*Debo agradecer a todos los compañeros con los que forjé amistad a lo largo de estos años, su ayuda no puede pasar inadvertida. Los trabajos nos separan, pero nunca se olvidarán los buenos momentos que pasamos juntos. En especial a dos personas cuya ayuda fue imprescindible: Juan y José, muchas gracias por su amistad.*

*Por último quiero agradecer a Sra. Guisela Muñoz y Don José Riquelme, personas que colaboraron siempre en todo lo que necesité.*

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
Reactivos.....	5
Animales de experimentación.....	6
Preparación de microsomas hepáticos de rata.....	6
Determinación de proteínas.....	6
Lipoperoxidación microsómica.....	7
Determinación de tioles totales.....	8
Conjugación de p-nitrofenol con UDPGA... ..	9
Consumo de oxígeno.....	10
Análisis estadístico.....	11
III. RESULTADOS.....	12
IV. DISCUSIÓN.....	19
VI. REFERENCIAS.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Lipoperoxidación microsómica inducida por Fe <sup>3+</sup> /ascorbato. Efecto de compuestos I, II, III y IV.	12
Figura 2	Efecto del compuesto III y V sobre la lipoperoxidación inducida por Biotransformación de Nitrofurantoína y naftaleno en presencia de NADPH.	14
Figura 3	Efecto de los compuestos III y V sobre la oxidación de los tioles microsómicos inducida por biotransformación de Nitrofurantoína en presencia de NADPH.	16
Figura 4	Consumo de oxígeno inducido por el sistema Cu <sup>2+</sup> /ascorbato. Efecto del Compuesto II.	18

## ÍNDICE DE TABLAS

**Página**

Tabla 1	Lipoperoxidación microsómica inducida por Fe <sup>3+</sup> /ascorbato: valores IC <sub>50</sub> de DHPs.	13
Tabla 2	Tioles microsómicos en presencia de Fe <sup>3+</sup> /ascorbato. Efecto de los compuestos I-IV.	15
Tabla 3	Efecto de DHPs sobre la activación de la UDPGT inducida por Fe <sup>3+</sup> /ascorbato.	17
Tabla 4	Efecto de DHPs sobre el consumo de oxígeno inducido por Cu <sup>2+</sup> /ascorbato.	18

## RESUMEN

Las 1,4-dihidropiridinas (DHPs) usadas en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, son antagonistas de canales de calcio y además son agentes antioxidantes. Estos fármacos, son metabolizados a través del sistema oxidativo del citocromo P<sub>450</sub> localizado principalmente en el retículo endoplásmico hepático. Muchos fármacos lipofílicos generan estrés oxidativo al ser metabolizados por este sistema celular. Por lo tanto, las propiedades antioxidantes de las DHPs, podrían prevenir el estrés oxidativo asociado con la biotransformación hepática de fármacos.

En este trabajo, se probó la capacidad antioxidante de varias nitro-fenil-DHPs sintéticas. Estos compuestos (I al IV) inhibieron la lipoperoxidación microsómica, la activación oxidativa de la UDPGT y la oxidación de los tioles microsómicos; todos estos fenómenos inducidos por el sistema generador de radicales libres del oxígeno, Fe<sup>3+</sup>/ascorbato. Asimismo, estos compuestos inhibieron el consumo de oxígeno inducido por el sistema Cu<sup>2+</sup>/ascorbato en ausencia de microsomas. Además, el compuesto III (2,6 – dimetil - 3,5 – dialcoxycarbonil – etil – 4 - (p - nitrofenil) - 1,4 – dihidropiridina) y el compuesto V (2,6 – dimetil - 3,5 – dialcoxycarbonil – metil – 4 - (p - nitrofenil) – N – etil - 1,4 - dihidropiridina) inhibieron la lipoperoxidación microsómica inducida por Nitrofurantoína y naftaleno en presencia de NADPH. El estrés oxidativo inducido sobre el retículo endoplásmico, puede alterar la biotransformación de fármacos, modificando así, sus concentraciones plasmáticas y sus efectos terapéuticos. Así la administración de fármacos

antioxidantes, como las DHPs, en forma conjunta con fármacos que son activados por biotransformación podría prevenir el estrés oxidativo inducido in situ.



**NITROARYL-1,4-DIHYDROPYRIDINES AS ANTIOXIDANTS AGAINST  
RAT LIVER MICROSOMES OXIDATION INDUCED BY IRON/ASCORBATE,  
NITROFURANTOIN AND NAPHTHALENE**

**SUMMARY**

1,4-Dihydropyridine (DHP) used in the treatment of cardiovascular diseases, are calcium channel antagonists and also antioxidant agents. These drugs are metabolized through cytochrome P450 oxidative system, majority localized in the hepatic endoplasmic reticulum. Several lipophilic drugs generate oxidative stress to be metabolized by this cellular system. Thus, DHP antioxidant properties could prevent the oxidative stress associated with hepatic biotransformation of drugs.

In this work, the antioxidant capacity of several synthetic nitro-phenyl-DHPs was tested. These compounds (I–IV) inhibited the microsomal lipid peroxidation, UDPGT oxidative activation and microsomal thiols oxidation, all phenomena induced by  $Fe^{3+}$ /ascorbate, a generator system of oxygen free radicals. As the same manner, these compounds inhibited the oxygen consumption induced by  $Cu^{2+}$ /ascorbate in the absence of microsomes. Furthermore, compound III (2,6 - dimethyl - 4 - (4 - nitrophenyl) - 1,4 - dihydropyridin - 3,5 - ethyl - dicarboxylate) and compound V (N - ethyl - 2,6 - dimethyl - 4 - (4 - nitrophenyl) - 1,4 - dihydropyridin - 3,5 - methyl - dicarboxylate) inhibited the microsomal lipid peroxidation induced by Nitrofurantoin and naphthalene in the presence of NADPH. Oxidative stress induced on endoplasmic reticulum may alter the biotransformation of drugs, so,

modifying their plasmatic concentrations and therapeutic effects. Therefore, oxidative stress by biotransformation may be prevented when drugs which are activated are administered together with antioxidant drugs, such as DHPs.

## I. INTRODUCCIÓN

Las nitrofenil-1,4-dihidropiridinas (DHPs), fármacos antagonistas de los canales de calcio, son ampliamente utilizadas en enfermedades cardiovasculares, tales como isquemia-reperfusión, enfermedad inflamatoria vascular, aterosclerosis y traumas del sistema nervioso central. Por otra parte, estos fármacos han mostrado efectos protectores antioxidantes sobre diferentes sistemas biológicos: membranas cardíacas y hepáticas, cortes de cerebro, lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Janero y Burghardt 1988; Engineer y Shridar 1989; Usberti y cols., 1991; Díaz-Araya y cols., 1998; Napoli y cols., 1999; Sevanian y cols., 2000; Letelier y cols., 2004). Más aún, Nifedipino [4-(2-nitrofenil)-2,6-dimetil-3,5-dimetoxicarbonil-1,4-dihidropiridina], fármaco comercial, demostró tener una potencia antioxidante considerablemente menor que su derivado nitroso (2,6 - dimetil - 4 - (2 - nitrosofenil) - 3,5 - piridindicarboxil - dimetil ester), actividad medida por la inhibición de la peroxidación de liposomas de fosfatidil-colina (Ondrias y cols., 1989; Misik y cols., 1991). Los autores postularon que un radical nitróxido estable formado por unión covalente a la membrana lipídica durante la modificación oxidativa de los liposomas, podría explicar la capacidad antioxidante observada de las DHPs. Por otra parte, se ha observado que las DHPs N-etil- sustituidas muestran baja reactividad hacia radicales alquil-peroxilos y el radical catiónico ABTS (2,2' - azinobis - (3 - etilbencetiazolina - 6 - sulfato de amonio) comparado con TROLOX (ácido 6 - hidroxil - 2, 5, 7, 8 - tetrametilcroman - 2 - carboxílico) o Nisoldipino (López-Alarcón y cols., 2003). En todos los casos, el derivado piridínico respectivo fue detectado como el producto principal de la reacción. Usando deuterio, los autores probaron que el H-1 del anillo dihidropiridínico estaba involucrado en el mecanismo antioxidante propuesto. Si un antioxidante se comporta como atrapador de radicales libres, sería ventajoso que a partir de los productos de esta reacción se reciclara el compuesto inicial antioxidante, como por ejemplo el reciclaje de GSSG y GSH que ocurre a través de reductores endógenos. Aunque los autores proponen que la dihidropiridina podría actuar como donador de hidrógeno, el derivado piridínico, producto

final de esta reacción, es estable y no presenta actividad antioxidante.

Las DHPs, fármacos lipofílicos, sufren metabolismo oxidativo de primer paso a través del sistema oxidativo citocromo P<sub>450</sub>, el cual está localizado mayoritariamente en el retículo endoplásmico hepático (Drocourt y cols., 2001). A través de esta vía metabólica, muchos fármacos generan estrés oxidativo. Por ejemplo, Nitrofurantoína, un antibiótico utilizado en infecciones del tracto urinario, sufre nitro-reducción generando un radical nitroanión (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) intermediario; esta reacción es catalizada por reductasas, entre ellas, la citocromo P<sub>450</sub> reductasa, enzima que forma parte del sistema oxidativo citocromo P<sub>450</sub>. El NO<sub>2</sub><sup>-</sup> posteriormente sufre reciclaje redox con O<sub>2</sub> generando radicales libres del oxígeno. Así, la incubación de microsomas hepáticos (preparación enriquecida en retículo endoplásmico) con Nitrofurantoína en presencia de NADPH, provoca lipoperoxidación (Letelier y cols., 2004). Por otra parte, la UDP-glucuroniltransferasa (UDPGT) sufre activación oxidativa por las especies reactivas de oxígeno (ROS), fenómeno que es totalmente prevenido y revertido por agentes reductores, entre ellos, glutatión (GSH) y ditioneitol (DTT) (Letelier y cols., 2005). Esta enzima también está localizada en el retículo endoplásmico hepático y cataliza la conjugación de metabolitos hidroxilados producidos a través del sistema del citocromo P<sub>450</sub>. Cabe señalar que cambios en las actividades de las enzimas de biotransformación, pueden afectar las concentraciones plasmáticas de fármacos, alterando sus efectos farmacológicos.

Existen diferentes xenobióticos que al ser metabolizados a través de los sistemas biotransformantes de fármacos, inducen estrés oxidativo, como por ejemplo los contaminantes ambientales, entre ellos, los hidrocarburos aromáticos, compuestos de reconocida toxicidad. Así, el naftaleno es oxidado a través del sistema del citocromo P<sub>450</sub> a un intermediario epóxido; este compuesto reacciona con sitios nucleofílicos de proteínas y DNA, pero puede también formar un conjugado con GSH, reacción catalizada por la GSH-transferasa que corresponde a la mayor ruta de desactivación y excreción; también puede ser isomerizado produciendo naftol o puede ser convertido a dihidrodiol por la epóxido hidrolasa, metabolito que es oxidado a

naftoquinona. Todas las posibilidades mencionadas ocurren competitivamente y la naturaleza de los metabolitos observados es función de esta competencia (Quick y Shuler, 1999). Así, diversos sustratos que se metabolizan a través del sistema oxidativo citocromo P<sub>450</sub> pueden inducir estrés oxidativo a través de esta vía metabólica (Zheng y cols., 1997).

Es necesario hacer notar que la lipofilicidad de las DHPs, característica principal de los sustratos del sistema citocromo P<sub>450</sub>, también juega un rol en sus propiedades antagonistas de los canales de calcio (Stengel y cols., 1998). Así, la estructura, como también las propiedades físicas de las DHPs pueden influenciar su concentración en la matriz de la membrana, desarrollando así sus propiedades como antagonistas de calcio y como antioxidantes en forma diferencial.

Estos antecedentes muestran que el retículo endoplásmico hepático puede ser un blanco importante, donde las DHPs podrían ejercer sus propiedades antioxidantes. En este trabajo, se evaluó la capacidad antioxidante de diversas DHPs sintéticas en microsomas hepáticos de rata, preparación membranosa enriquecida en retículo endoplásmico. Como agente oxidante, se utilizaron Fe<sup>3+</sup>/ascorbato y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato, ambos sistemas generadores de radicales libres del oxígeno vía las reacciones de Haber Weiss y/o Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1990; Neuzil y cols., 1993; Satoh y cols., 1993). La capacidad antioxidante de las DHPs sintéticas se determinó a través de la inhibición de la oxidación de los lípidos microsómicos, la oxidación del contenido de tioles microsómicos y la activación de la UDPGT, todos estos fenómenos oxidativos inducidos por el sistema Fe<sup>3+</sup>/ascorbato. Asimismo, se probó la capacidad antioxidante de las DHPs, frente a la producción de radicales libres generados por la biotransformación de Nitrofurantoína y naftaleno. Por otra parte, se evaluó la capacidad de las DHPs en estudio de inhibir el consumo de oxígeno inducido por el sistema Cu<sup>2+</sup>/ascorbato, como una forma de determinar su capacidad atrapadora de radicales libres del oxígeno.

## **HIPÓTESIS**

Las nitro-aril-DHPs sintéticas evaluadas en este trabajo, se comportan como compuestos antioxidantes.

Por lo tanto, las DHPs deberían inhibir la lipoperoxidación microsómica, la oxidación de los tioles microsómicos y la activación oxidativa de la UDPGT, todos estos fenómenos inducidos por el sistema  $Fe^{3+}$ /ascorbato. Por otra parte, estos compuestos deberían inhibir el estrés oxidativo inducido por la biotransformación de Nitrofurantoína y naftaleno, e inhibir el consumo de oxígeno inducido por  $Cu^{2+}$ /ascorbato.

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo general**

Evaluar la capacidad antioxidante de diferentes nitro-aril-DHPs sintéticas.

### **2. Objetivos específicos**

- 2.1.** Determinar la capacidad de las nitroaril-DHPs sintéticas de inhibir la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema  $Fe^{3+}$ /ascorbato.
- 2.2.** Determinar la capacidad de las nitroaril-DHPs de inhibir la disminución de los tioles microsómicos, fenómeno inducido por  $Fe^{3+}$ /ascorbato.
- 2.3.** Estudiar la capacidad de las nitroaril-DHPs de inhibir la activación de la UDPGT microsómica inducida por el sistema  $Fe^{3+}$ /ascorbato.
- 2.4.** Determinar la capacidad antioxidante de las nitroaril-DHPs sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por la biotransformación de Nitrofurantoína y Naftaleno.
- 2.5.** Determinar el efecto de las DHPs sobre la disminución del contenido de tioles totales de la membrana microsómica inducida por Nitrofurantoína.
- 2.6.** Evaluar la capacidad de las nitroaril-DHPs de inhibir el consumo de oxígeno inducido por el sistema  $Cu^{2+}$ /ascorbato.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. MATERIALES

#### 1. Reactivos

La albúmina de bovino fracción IV, el ácido UDP-glucurónico (UDPGA), el p-nitrofenol (PNP), el ácido-5-tio-2-nitrobenzoico (DTNB) se obtuvieron de SIGMA Chemical Co. Chile. El cloruro férrico, el ascorbato, el hidróxido de sodio, el sulfato de cobre, el ácido tiobarbitúrico (TBA), el ácido tricloroacético (TCA), el reactivo de Folin-Ciocalteu-fenol, la dimetilformamida (DMF), el hidróxido de sodio, el carbonato de sodio, el tartrato de potasio y sodio, el cloruro de sodio y potasio, el amortiguador fosfato de potasio, el amortiguador TRIS (hidroxi-metil-amino-metano) y el cloruro de magnesio se obtuvieron de Merck Chile.

Las nitro-aril-DHP utilizadas fueron donadas por el Laboratorio de Bioelectroquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Los nombres químicos y la estructura química de estos compuestos se detallan a continuación:

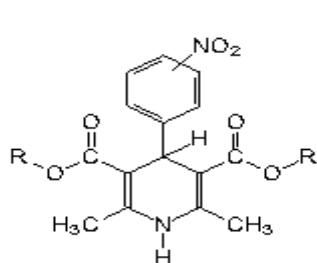
2,6-dimetil-3,5-dialcoxycarbonil-etil-4-(m-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina. (I)

2,6-dimetil-3,5-dialcoxycarbonil-isopropil-4-(m-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina. (II)

2,6-dimetil-3,5-dialcoxycarbonil-etil-4-(p-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina. (III)

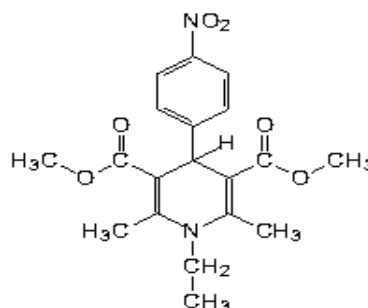
2,6-dimetil-3,5-dialcoxycarbonil-isopropil-4-(p-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina. (IV)

2,6-dimetil-3,5-dialcoxycarbonil-metil-4-(p-nitrofenil)-N-etil-1,4-dihidropiridina (V)



**Compuestos I-IV**

**R: CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>- ; (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-**



**Compuesto V**

## **2. Animales de experimentación**

Se emplearon ratas machos de la cepa Sprague Dawley de aproximadamente tres meses de edad y 200 a 250 g de peso corporal. Los animales fueron mantenidos con una dieta normal de pellet Kimber, agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiente de 21°C. Estos animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

## **B. MÉTODOS**

### **1. Preparación de microsomas hepáticos de rata**

Los microsomas fueron preparados por el método de fraccionamiento subcelular descrito en Letelier y cols. (2004). 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 Potter Elvejem. 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 por el método de Lowry y cols. (1951), utilizando albúmina de bovino, fracción IV como estándar.



### **3. Lipoperoxidación microsómica**

#### **3.1 Lipoperoxidación microsómica inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato.**

La lipoperoxidación microsómica luego de preincubar los microsomas con Fe<sup>3+</sup>/ascorbato se estimó midiendo la velocidad de generación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), según lo realizado por Letelier y cols. (2004). El malondialdehído 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.

Los microsomas (0,2 mg de proteína) suspendidos en amortiguador Fosfato pH 7,4 50 mM, fueron o no preincubados con las DHPs durante 5 min a 37°C antes de agregar FeCl<sub>3</sub> 600 µM y ascorbato de sodio 1mM. Luego, las mezclas se incubaron durante 20 min a 37°C. Los blancos no contenían microsomas. Al término de este periodo, se adicionaron a todas las mezclas 0,5 mL de TCA 20% y luego fueron centrifugadas a 9000xg durante 10 min a 4°C en una centrífuga Suprafuge 22 Heraeus. Alícuotas de 0,5 mL de los sobrenadantes y 0,5 mL de TBA 1%, se incubaron durante 60 min a 50°C. Al término de este periodo, las mezclas fueron enfriadas a temperatura ambiente para determinar la lipoperoxidación registrando la absorbancia de las TBARS en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS ( $\xi_{532nm} = 153 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La reacción de color se determinó en condiciones de linealidad respecto del tiempo de incubación y concentración de proteína. La lipoperoxidación inducida se estimó calculando la diferencia entre los microsomas incubados en presencia y en ausencia de FeCl<sub>3</sub> 600 µM y ascorbato de sodio 1mM.

#### **3.2 Lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación de Nitrofurantoína y naftaleno**

La generación de radicales libres del oxígeno inducida por Nitrofurantoína y naftaleno a través de la reducción y oxidación, respectivamente, es catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450; este sistema utiliza como cofactor específico, NADPH. Microsomas (2 mg de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato pH 7,4, fueron preincubados

con o sin las DHPs durante 5 min a 37°C antes de agregar Nitrofurantoína (10 µM) o naftaleno (100 µM) y el sistema generador de NADPH (Glucosa-6-fosfato 10 mM, NADP 1mM y 5 unidades de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). Los blancos no contenían microsomas. Todas las mezclas fueron incubadas durante 15 min a 37°C. Al cabo de este período, se les adicionó 0,5 mL de TCA 20% p/V frío (4°C) y luego, las mezclas fueron centrifugadas a 9000xg durante 10 min a 4°C en una centrífuga Suprafuge 22 Heraeus. Mezclas formadas por alícuotas de 0,5 mL de los sobrenadantes y 0,5 mL de TBA 1% p/V, se incubaron durante 60 min a 50°C. Al término de este periodo, las mezclas fueron enfriadas para determinar la lipoperoxidación, registrando la absorbancia de los TBARS en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS ( $\xi_{532\text{nm}} = 153 \text{ mM}^{-1}\text{xcm}^{-1}$ ). La reacción de color se determinó en condiciones de linealidad respecto del tiempo de incubación y concentración de proteína.

#### **4. Determinación de tioles totales**

La medición de los tioles totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita en Letelier y cols. (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  $13.600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

##### **4.1 Oxidación de tioles microsómicos inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato**

Microsomas (1 mg de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4 fueron o no preincubados con las DHPs durante 5 min a 37°C. Al cabo de este período se les adicionó FeCl<sub>3</sub> 600 µM y ascorbato de sodio 1mM; las mezclas se incubaron a 37°C durante 20 min. Los blancos no contenían microsomas. Luego, se adicionó a los blancos y las muestras DTNB 0,6 mM; las mezclas así formadas se incubaron durante 60 min a 37°C. Al término de este periodo, las proteínas fueron separadas por centrifugación a 9000xg durante 10 min a 4°C. La absorbancia de los sobrenadantes de las muestras

se registró a 412 nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS. La concentración de tioles microsómicos se calculó usando el  $\epsilon_{412\text{nm}} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Las mediciones se realizaron en condiciones de linealidad respecto del tiempo de incubación y concentración de proteína.

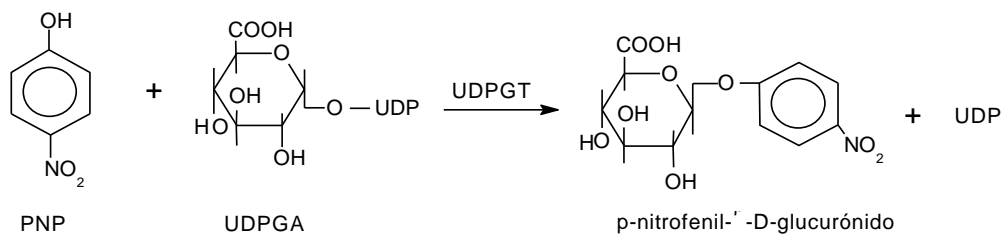
#### **4.2 Oxidación de tioles microsómicos inducida por biotransformación de Nitrofurantoína**

Microsomas (1 mg de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato pH 7,4 50 mM, fueron o no preincubados con las DHPs durante 5 min a 37°C antes de adicionar Nitrofurantoína 10  $\mu\text{M}$  y sistema generador de NADPH. Luego, las mezclas fueron incubadas a 37°C durante 90 min. Los blancos no contenían microsomas. Al término de este periodo, DTNB 0,6 mM fue adicionado a todas las mezclas, y luego, fueron incubadas durante 60 min a 37°C. Las proteínas fueron separadas por centrifugación a 9000xg por 10 min a 4°C en una centrífuga Suprafuge 22 Heraeus. La absorbancia de los sobrenadantes de las muestras se registró a 412 nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS. La concentración de tioles microsómicos se calculó usando el coeficiente de extinción ( $13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### **5. Conjugación de p-nitrofenol con UDPGA.**

La conjugación de *p*-nitrofenol (PNP) con ácido glucurónico (UDPGA) se determinó esencialmente por el método descrito en Letelier y cols. (2005). Esta técnica mide la formación de glucurónido, cuantificando la cantidad de PNP remanente en la mezcla de reacción. Para ello se aprovechan las propiedades espectroscópicas del PNP en medio básico; bajo estas condiciones, absorbe fuertemente a 410 nm, propiedad que se pierde al ser conjugado con UDPGA.

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



Microsomas (2 mg de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato pH 7,4 50 mM fueron preincubados o no con las DHPs durante 5 min a 37°C. Luego, 600  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  y 1 mM de ascorbato de sodio fueron adicionados y las mezclas fueron incubadas durante 20 min a 37°C. Al término de este periodo se agregó PNP 0,5 mM; UDPGA 2 mM; Tris HCl 100 mM, pH 8,5 y  $\text{MgCl}_2$  4 mM. A continuación las mezclas se incubaron por 15 min a 37°C. Los controles contenían todos los reactivos a excepción del UDPGA. La reacción se detuvo adicionando 0,5 mL de TCA 10% p/V. Luego las muestras y los controles se centrifugaron a 9000xg durante 10 min en una centrifuga Suprafuge 22 Heraeus. Luego, alícuotas de 1 mL de los sobrenadantes se mezclaron con 1 mL de NaOH 1M. El PNP remanente en las muestras se determinó midiendo la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS. La concentración de glucurónido se calculó utilizando como concentración inicial de PNP, aquella obtenida en los controles respectivos. Las mediciones se realizaron en condiciones de linealidad respecto del tiempo de incubación y la concentración de proteína.

## 6. Consumo de oxígeno.

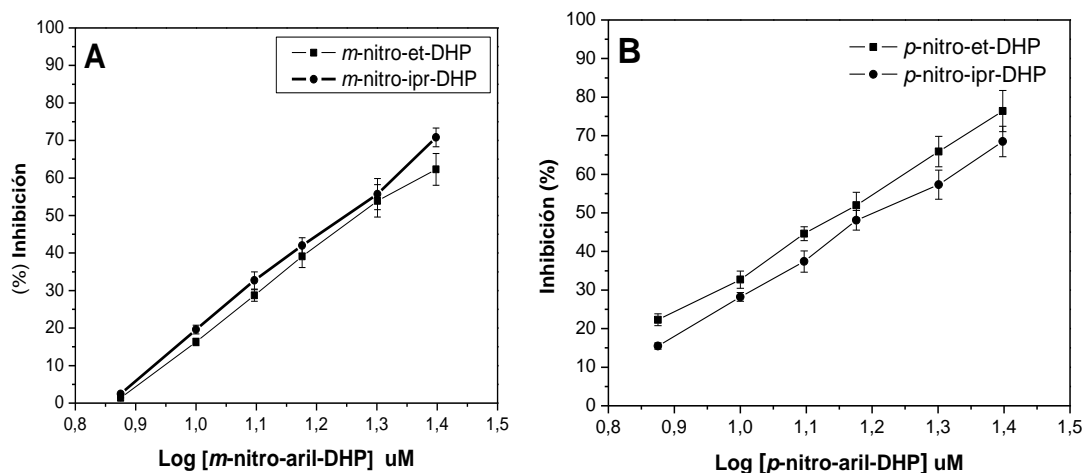
La medición del consumo de oxígeno se determinó polarográficamente de manera continua durante 10 min utilizando un electrodo Clark N° 5331 (Yellow Springs), en un oxígrafo Wilson 5/6. La mezcla de reacción contenía 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{+2}$ / 1mM ascorbato disuelto en amortiguador fosfato pH 7,4 50 mM.

## **7. Análisis estadístico.**

Cada uno de los experimentos se realizó al menos en cuadruplicado. Los resultados corresponden al 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 grupos controles y experimentales son estadísticamente significativas, se utilizó el test de t-Student. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software ORIGIN 7.5.

### III. RESULTADOS

**Lipoperoxidación microsómica inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato.** Todas las DHPs testeadas inhibieron la lipoperoxidación microsómica de una forma concentración-respuesta. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los efectos anti-lipoperoxidantes de las etil- e isopropil-*m*-nitro-fenil-DHPs (Figura 1A: compuestos I y II), ni con las etil- e isopropil-*p*-nitro-fenil-DHPs (Figura 1B: compuestos III y IV). El efecto anti-lipoperoxidante máximo alcanzado por las DHPs fue de un 70% aproximadamente a una concentración 25  $\mu$ M. Los valores IC<sub>50</sub> de la lipoperoxidación de las nitro-fenil-DHPs se muestran en la Tabla 1. El valor IC<sub>50</sub> representa la concentración de DHP que es capaz de inhibir el 50% de la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato. No se observaron diferencias significativas entre los valores IC<sub>50</sub> de las *m*- y *p*-nitro-fenil-DHPs, ni tampoco entre la etil- e isopropil-nitro-fenil-DHPs ( $p > 0.05$ ).

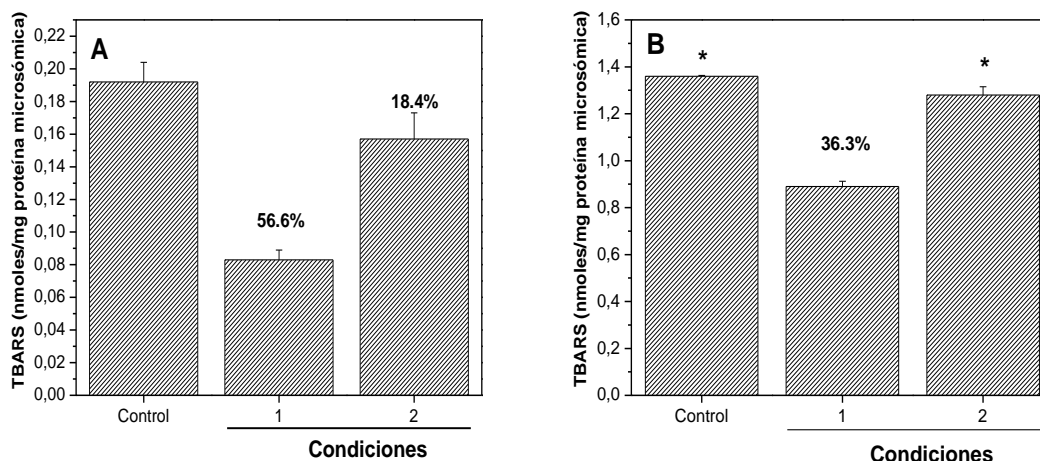


**Figura 1: Lipoperoxidación microsómica inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato. Efecto de las DHPs I y II (A) y III y IV (B).** Los % de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación medida en ausencia de DHPs. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Todos los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes  $\pm$  S.D.

Compuestos	TBARS ( $\eta$ moles de /min/ mg de proteína microsómica)	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
Fe <sup>3+</sup> /ascorbato	1.34 $\pm$ 0.08	---
<i>m</i> -nitro-etil-DHP: Compuesto I	0.69 $\pm$ 0.04	*18.4
<i>m</i> -nitro-isopropil-DHP: Compuesto II	0.69 $\pm$ 0.05	*16.6
<i>p</i> -nitro-etil-DHP: Compuesto III	0.68 $\pm$ 0.03	*15.3
<i>p</i> -nitro-isopropil-DHP: Compuesto IV	0.72 $\pm$ 0.04	*15.9

**Tabla 1. Lipoperoxidación microsómica inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato: valores IC<sub>50</sub> de DHPs.** IC<sub>50</sub> representa la concentración de DHP que inhibió 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato. Las condiciones del ensayo están descritas en métodos. Todos los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes  $\pm$  S.D. \*Valores no estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ).

**Lipoperoxidación microsómica inducida por Nitrofurantoína y naftaleno en presencia de NADPH.** La preincubación de los microsomas con los compuestos III (2,6 - dimetil - 3,5 - dialcoxycarbonil - etil - 4 - (p - nitrofenil) - 1,4-dihidropiridina) y V (2,6 - dimetil - 3,5 - dialcoxycarbonil - metil - 4 - (p- nitrofenil) - N - etil - 1,4 - dihidropiridina), por 10 minutos antes de adicionar Nitrofurantoína (10  $\mu$ M) y el sistema generador de NADPH, inhibió la lipoperoxidación microsómica inducida por bio-reducción de Nitrofurantoína en 56,6% y 18,4%, respectivamente (Figura 2A). De la misma forma, la incubación de microsomas con naftaleno 10  $\mu$ M y el sistema generador de NADPH provocó lipoperoxidación microsómica; cuando los microsomas se preincubaron durante 10 min con el compuesto III (2,6 - dimetil - 3,5 - dialcoxycarbonil - etil - 4 - (p - nitrofenil) - 1,4 - dihidropiridina), la lipoperoxidación fue inhibida un 36,3%. Sin embargo, en las mismas condiciones, el compuesto V, el cual tiene sustituido el hidrógeno de la posición 1 por un grupo etilo (2,6 - dimetil - 3,5 - dialcoxycarbonil - metil - 4 - (p - nitrofenil) - N - etil - 1,4 - dihidropiridina), no inhibió la lipoperoxidación microsómica (Figura 2B).



**Figura 2. Efecto del compuesto III y V sobre la lipoperoxidación inducida por Biotransformación de Nitrofurantoína (A) y naftaleno (B) en presencia de NADPH.** [Nitrofurantoína]: 10  $\mu$ M; [Naftaleno]: 100  $\mu$ M. **Control (A):** microsomas en presencia de Nitrofurantoína y NADPH; **control (B):** microsomas en presencia de naftaleno y NADPH. **Condición 1:** microsomas preincubados con compuesto III 100  $\mu$ M antes de inducir lipoperoxidación microsómica. **Condición 2:** microsomas preincubados con compuesto V 100  $\mu$ M antes de adicionar Nitrofurantoína o naftaleno y NADPH e inducir lipoperoxidación. Los valores sobre las barras representan el % de inhibición de la lipoperoxidación; ellos fueron calculados considerando los TBARS producidos en el control como 100%. \*Valores no estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ).

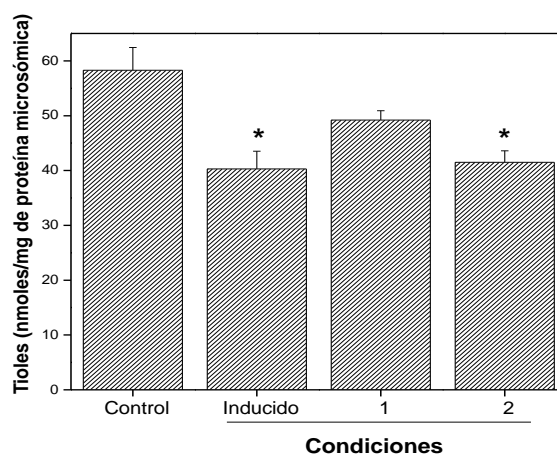
**Disminución del contenido de tioles microsómicos inducida por  $Fe^{3+}$ /ascorbato.** Las actividades biológicas de varias proteínas dependen del estado redox de sus residuos de cisteína. Un ejemplo de esto es la enzima microsómica UDPGT, la cual es activada por estrés oxidativo; esta activación oxidativa es prevenida y revertida por agentes reductores de tioles, manteniendo así, su actividad basal (Letelier y cols. 2005). La Tabla 2 muestra el efecto de las DHPs (compuestos I al IV) sobre la reducción del contenido microsómico de tioles inducida por  $Fe^{3+}$ /ascorbato. La incubación de microsomas con este sistema oxidativo disminuyó el contenido de tioles microsómicos en un 45,7%. Sin embargo, la preincubación de microsomas con nitro-fenil-DHPs (concentraciones  $IC_{50}$  obtenidas de las pruebas de lipoperoxidación), disminuyó el contenido microsómico de tioles solo en un 21%; este valor corresponde aproximadamente a la mitad del porcentaje de disminución obtenido sólo en presencia de  $Fe^{3+}$ /ascorbato (45,7%).



Condiciones	Tioles ( $\eta$ moles/mg Proteína microsómica)	% Disminución
Control	73.0 $\pm$ 0.78	----
Fe <sup>3+</sup> /ascorbato	39.7 $\pm$ 1.21	45.7
	$\Delta$ Disminución	
Fe <sup>3+</sup> /ascorbato	33.3 $\pm$ 0.95	100
<i>m</i> -nitro-etil-DHP. Compuesto I	16.4 $\pm$ 1.17	*49.2
<i>m</i> -nitro-isopropil-DHP. Compuesto II	16.1 $\pm$ 0.62	*48.3
<i>p</i> -nitro-etil-DHP. Compuesto III	16.3 $\pm$ 1.86	*48.9
<i>p</i> -nitro-isopropil-DHP. Compuesto IV	16.0 $\pm$ 0.60	*48.0

**Tabla 2. Tioles microsómicos en presencia de Fe<sup>3+</sup>/ascorbato. Efecto de los compuestos I-IV.** [DHP]: IC<sub>50</sub> obtenida de la lipoperoxidación microsómica (Tabla 1). Los valores de  $\Delta$  disminución representan las diferencias entre los  $\eta$ moles de tioles en ausencia y en presencia de Fe<sup>3+</sup>/ascorbato y DHP. El % de disminución fue calculado considerando el valor de tioles del control como el 100%. Todos los valores del contenido de tioles representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes  $\pm$  S.D. \*Valores no estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ).

**Disminución del contenido de tioles microsómicos inducida por Nitrofurantoína en presencia de NADPH.** La incubación con Nitrofurantoína (10  $\mu$ M) y NADPH provocó una reducción del contenido microsómico de tioles (30,8%). Al preincubar los microsomas con el compuesto III (2,6-dimetil-3,5-dialcoxycarbonil-etil-4-(*p*-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina) durante 10 min, esta disminución llegó sólo a un 15.6 %. Sin embargo, en las mismas condiciones, el compuesto V (2,6 - dimetil - 3,5 - dialcoxycarbonil - metil - 4 - (*p* - nitrofenil) - N - etil - 1,4 - dihidropiridina) no modificó la disminución de los tioles microsómicos inducida por Nitrofurantoína (Figura 3).



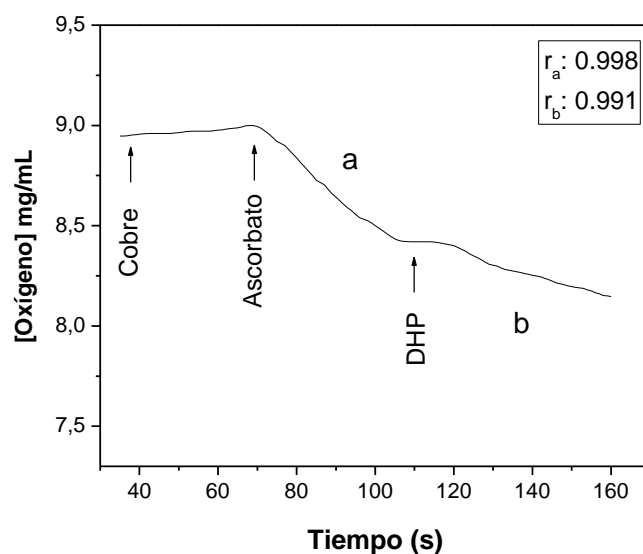
**Figura 3. Efecto de los compuestos III y V sobre la oxidación de los tioles microsómicos inducida por biotransformación de Nitrofurantoína en presencia de NADPH.** [Nitrofurantoína]: 10  $\mu$ M. **Inducido:** microsomas no preincubados con DHPs. **Condición 1:** microsomas preincubados con el compuesto III [100  $\mu$ M] y **Condición 2:** microsomas preincubados con el compuesto V [100  $\mu$ M], antes de inducir la oxidación de los tioles microsómicos en presencia de Nitrofurantoína y NADPH. \*Valores no estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**Activación oxidativa de la UDPGT.** Los efectos de las DHPs sobre la activación oxidativa de la UDPGT inducida por  $Fe^{3+}$ /ascorbato se muestran en la Tabla 3. La preincubación de los microsomas con  $Fe^{3+}$ /ascorbato incrementó la actividad microsómica de la UDPGT aproximadamente 10 veces. Interesantemente, las concentraciones  $IC_{50}$  (lipoperoxidación) de los compuestos I al IV, inhibieron 50% la activación oxidativa de la UDPGT inducida por  $Fe^{3+}$ /ascorbato.

Compuestos	Actividad UDPGT	
Control	0.21 ± 0.015	
Fe <sup>3+</sup> /ascorbato	2.07 ± 0.166	
	Δ Activación	% Activación
Fe <sup>3+</sup> /ascorbato	1.86 ± 0.165	100
<i>m</i> -nitro-etil-DHP: Compuesto I	0.94 ± 0.071	*50.5
<i>m</i> -nitro-isopropil-DHP: Compuesto II	0.97 ± 0.061	*52.1
<i>p</i> -nitro-etil-DHP: Compuesto III	0.95 ± 0.083	*51.1
<i>p</i> -nitro- isopropil-DHP: Compuesto IV	0.93 ± 0.051	*50.0

**Tabla 3. Efecto de DHPs sobre la activación de la UDPGT inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato.** [DHP]: IC<sub>50</sub> obtenida de la lipoperoxidación microsómica (Tabla 1). La actividad de la UDPGT está expresada como ηmoles de *p*-nitrofenol conjugado/min/mg de proteína microsómica. Los valores del Δ Activación corresponden a la diferencia entre la actividad de la UDPGT en presencia y en ausencia de Fe<sup>3+</sup>/ascorbato. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Los valores de la actividad UDPGT representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes ± S.D. \*Valores no estadísticamente diferentes (p>0.05).

**Consumo de oxígeno inducido por el sistema Cu<sup>2+</sup>/ascorbato.** En estos experimentos, se usó la técnica polarográfica descrita en Métodos. Las concentraciones de DHP usadas corresponden a la IC<sub>50</sub> obtenida en los ensayos de lipoperoxidación inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato (Tabla 1). La figura 4 muestra el trazado experimental del consumo de oxígeno en ausencia (pendiente a) y en presencia del compuesto II (2,6 - dimetil - 3,5 - dialcoxycarbonil - isopropil - 4 - (m - nitrofenil) - 1,4 - dihidropiridina) (pendiente b); esta condición experimental fue análoga a aquellas desarrolladas para el resto de las DHPs ensayadas. La Tabla 4 muestra los valores de las pendientes del consumo de oxígeno obtenidas en presencia de las DHPs. El consumo de oxígeno inducido por Cu<sup>2+</sup>/ascorbato (pendiente a) fue inhibido ~50% por todas las nitro-aril-DHPs (compuestos I al IV) ensayadas (pendiente b).



**Figura 4. Consumo de oxígeno inducido por el sistema  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato. Efecto del Compuesto II.** [Compuesto II]: 16.6  $\mu\text{M}$ . Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. r: representa la regresión lineal de las pendientes a y b.

Compuestos	(m $\pm$ SD) $\times 10^3$	% Inhibición
$\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato	15.0 $\pm$ 0.72	---
<i>m</i> -nitro-etil-DHP. Compuesto I	7.3 $\pm$ 0.36	*49.4
<i>m</i> -nitro-isopropil-DHP. Compuesto II	7.4 $\pm$ 0.28	*9.3
<i>p</i> -nitro-etil-DHP. Compuesto III	7.7 $\pm$ 0.32	*50.4
<i>p</i> -nitro-isopropil-DHP. Compuesto IV	7.5 $\pm$ 0.22	*50.0

**Tabla 4. Efecto de DHPs sobre el consumo de oxígeno inducido por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato.** [DHP]:  $\text{IC}_{50}$  obtenida en la lipoperoxidación microsómica inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato (Tabla 1). m: pendiente del consumo de oxígeno. Para calcular el % de inhibición, el valor de la pendiente del consumo de oxígeno inducido por  $\text{Cu}^{2+}$ /ascorbato en ausencia de DHP fue considerado como 100%. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Todos los valores de las pendientes representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes  $\pm$  S.D. \*Valores no estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

#### IV. DISCUSIÓN

La información existente acerca de las propiedades antioxidantes de las nitro-fenil-1,4-DHPs comerciales, se relaciona principalmente con la prevención de la oxidación de lípidos y LDL (Janero y Burghardt 1988; Engineer y Shridar 1989; Díaz-Araya y cols., 1998; Sevanian y cols., 2000; Letelier y cols., 2004). Las DHPs son fármacos lipofílicos, característica que parece ser relevante en sus efectos terapéuticos. Debido a que las DHPs son fármacos lipofílicos, deben ser biotransformadas a compuestos polares para ser eliminadas por la orina; ellas sufren biotransformación de primer paso la cual es catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P<sub>450</sub> (Drocourt y cols., 2001). Sin embargo, a través de esta vía de biotransformación muchos fármacos son activados, generando así, estrés oxidativo. La localización principal del sistema oxidativo del citocromo P<sub>450</sub> es el retículo endoplásmico hepático. Por lo tanto, este organelo subcelular puede ser un blanco donde las DHPs podrían desarrollar sus propiedades antioxidantes. En este trabajo se evaluó la capacidad antioxidante de varias DHPs sintéticas usando microsomas hepáticos de rata (preparación experimental enriquecida en retículo endoplásmico) y Fe<sup>3+</sup>/ascorbato y Cu<sup>2+</sup>/ascorbato como sistemas generadores de radicales libres del oxígeno. Como era de esperar, las DHPs ensayadas (compuestos I al IV) inhibieron la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato (Figura 1 y Tabla 1). Sin embargo, los efectos anti-lipoperoxidativos de las formas isoméricas de las DHPs: *m*- y *p*-NO<sub>2</sub> fenil DHPs como también de la etil- e isopropil-DHP, no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Datos reportados muestran que la concentración de DHPs en la matriz lipídica de membranas depende de su lipofilicidad (Stengel y cols., 1998). De la misma forma, la prevención de la lipoperoxidación de membranas, también parece depender de la concentración de DHP en la matriz lipídica (Mason y Trumbore, 1996). Probablemente, la lipofilicidad de las DHPs ensayadas no es significativamente diferente como para provocar diferencias en las concentraciones de la matriz microsómica y por tanto en su actividad anti-lipoperoxidante.

Varios mecanismos están involucrados en la capacidad antioxidante

celular, entre ellos el atrapamiento de radicales libres del oxígeno y las propiedades quelantes de metales de diferentes moléculas. Las estructuras químicas de las DHPs emulan las del NADH; las deshidrogenasas NADH-acopladas catalizan la entrega de átomos de hidrógeno a los sustratos. Un hidrógeno es transferido desde el NADH como un ión Hidruro ( $H^-$ ) y otro, es tomado desde el medio (Lehninger, 1982). Las DHPs podrían reaccionar de forma análoga transfiriendo un átomo de hidrógeno de la posición-4 ( $H^-$ ) al anión superóxido y otro de la posición-1 ( $H^+$ ) por medio de un radical catiónico intermediario para generar derivados piridínicos y agua. Debido a que los grupos atrapadores de electrones afectan negativamente la estabilidad de los intermediarios, esto predice que los grupos nitro en el anillo fenilo podrían disminuir su actividad (Ortiz y cols., 2003; Carraway y cols., 2004). Este postulado podría explicar las diferencias descritas en la potencia anti-lipoperoxidativa de las nitro-aril-DHP y sus nitroso-derivados (Ondrias y cols., 1989; Misik y cols., 1991). Por otro lado, López-Alarcón y cols. (2003) usando deuterio, probaron que el hidrógeno de la posición-1 del anillo dihidropiridínico estaba involucrado en el mecanismo antioxidante propuesto; en todos los casos, el derivado piridínico respectivo, fue detectado como el producto principal de la reacción. Como era de esperar, Nitrofurantoína y naftaleno en presencia de NADPH, indujeron lipoperoxidación microsómica (Figura 2). A igualdad de concentraciones (100  $\mu M$ ), la preincubación de los microsomas con el compuesto III inhibió ambos fenómenos (lipoperoxidación inducida por Nitrofurantoína y también por naftaleno); sin embargo, el compuesto V sólo inhibió la lipoperoxidación inducida por la nitro-reducción de Nitrofurantoína, pero en menor porcentaje que el compuesto III (18,4% contra 56,6%) (Figura 2). Probablemente, una DHP con un grupo etilo en posición-1 transfiere el hidrógeno en posición-4 del anillo dihidropiridínico como un ión hidruro ( $H^-$ ) y  $H^+$  puede ser tomado desde el medio. Este postulado podría explicar la menor potencia antioxidante de la DHP portadora de un grupo alquilo en posición-1 (compuesto V) respecto de aquella que posee un hidrógeno en dicha posición (compuesto III) (Figura 2).

En general, los grupos tiólicos de muchas proteínas están involucrados

en sus funciones biológicas. Interesantemente, las concentraciones  $IC_{50}$  de las DHPs (compuesto I al IV) obtenidas de la lipoperoxidación microsómica, disminuyeron en el mismo porcentaje (50%) la oxidación de los tioles microsómicos provocada por  $Fe^{3+}$ /ascorbato (Tabla 2). De la misma forma, el compuesto III inhibió la reducción de los tioles microsómicos inducida por Nitrofurantoína en presencia de NADPH y el compuesto V no tuvo efecto (Figura 3). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la medición de lipoperoxidación microsómica, confirmando, por lo tanto, que el hidrógeno de la posición-1 juega un rol en las propiedades antioxidantes de las DHPs.

La UDPGT, enzima de Fase II, especialmente involucrada en la conjugación de fármacos alcohólicos y fenólicos, es una proteína tiólica. Recientemente se ha demostrado que el  $Fe^{3+}$ /ascorbato activa significativamente esta enzima y que, agentes reductores tales como DTT y GSH previenen y revierten esta activación totalmente (Letelier y cols., 2005). Cabe señalar que muchas DHPs comerciales usadas en patologías cardiovasculares, desarrollan una actividad reductora similar sobre la activación oxidativa UDPGT (Letelier y cols., 2005). Las DHPs sintéticas ensayadas (compuestos I al IV) previnieron la activación oxidativa de la UDPGT inducida por  $Fe^{3+}$ /ascorbato. Además, las concentraciones  $IC_{50}$  obtenidas de los ensayos de lipoperoxidación microsómica también inhibieron ~50% la activación oxidativa de la UDPGT, corroborando así los efectos protectores que las nitro-aril-DHPs desarrollan sobre la oxidación de proteínas tiólicas (Tabla 3).

Es necesario hacer notar, que a través de metabolismo de primer paso las DHPs clásicas son oxidadas a las piridinas correspondientes, proceso oxidativo que es catalizado por el sistema del citocromo  $P_{450}$  y que conduce a una pérdida total de la actividad antagonista de calcio (Drocourt y cols., 2001). En presencia de aire y luz diurna, también ocurre la oxidación rápida del grupo dihidropiridínico a piridina (Díaz-Araya y cols., 1998). Este fenómeno provoca la subsiguiente pérdida de la naturaleza secundaria del nitrógeno de la posición-1 y así, la pérdida del hidrógeno unido a este nitrógeno. Diferentes

autores han postulado que estos cambios químicos pueden alterar el antagonismo de los canales de calcio (Ondrias y cols., 1989; Hayase y cols., 1995; Díaz-Araya y cols. 1998). Por lo tanto, la resistencia de las DHPs a la oxidación puede explicar la duración prolongada de la actividad antihipertensiva al compararla con fármacos dihidropiridínicos clásicos tipo-Nifedipino (Kappe, 1998). Al respecto, ha sido reportado que las corrientes de canales T de  $\text{Ca}^{2+}$  en la línea celular NG108-15 de células del neuroblastomaglioma, son inhibidas con potencia decreciente en el orden Niguldipino > Nicardipino > Nimodipino > Nifedipino (valores  $\text{IC}_{50}$  244  $\eta\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 9,8  $\mu\text{M}$ , 39  $\mu\text{M}$ ) (Stengel y cols., 1998). Estos datos contribuyen a sostener la idea de que el grupo  $-\text{NH}-$  del anillo dihidropiridínico puede estar involucrado tanto en el antagonismo de canales de calcio y en las propiedades antioxidantes de las DHPs. Más aún, ambos fenómenos podrían ocurrir de forma simultánea, cancelándose entre sí, postulado que debe ser confirmado.

Desde el punto de vista biológico, un fármaco antioxidante es aquel capaz de mostrar sus efectos antioxidantes celulares a bajas concentraciones. Los efectos antioxidantes microsómicos fueron exhibidos a concentraciones  $\mu\text{M}$  de las DHPs ensayadas, por lo que pueden considerarse como antioxidantes biológicos. Debido a que las DHPs sufren metabolismo de primer paso hepático, el retículo endoplásmico puede representar un blanco en el cual ellas podrían ejercer sus propiedades antioxidantes. Por ejemplo, Nitrofurantoína, un antibiótico usado en infecciones urinarias, provoca varios efectos adversos derivados de su metabolismo reductivo que induce estrés oxidativo. Las enfermedades cardiovasculares afectan principalmente a pacientes de tercera edad que además, sufren concomitantemente este tipo de infecciones. Por lo tanto, la administración simultánea de DHPs y Nitrofurantoína podría reducir los efectos adversos del antibiótico en estos pacientes; sin embargo, el estrés oxidativo podría también ejercer una oxidación rápida del grupo dihidropiridínico a piridina, alterando sus propiedades antagonistas de los canales de calcio (Ondrias y cols., 1989; Hayase y cols., 1995; Díaz-Araya y cols., 1998). La oxidación del grupo



dihidropiridínico dependerá de la extensión del estrés oxidativo provocado por la nitro-reducción de Nitrofurantoína. Cabe señalar además, que varios metabolitos derivados del sistema del citocromo P<sub>450</sub> son farmacológicamente activos, y en general, sustratos de la UDP-glucuroniltransferasa. Los glucurónidos son hidrosolubles y metabolitos farmacológicamente inactivos. Ya que el estrés oxidativo activa la UDP-glucuroniltransferasa, en esta condición, la velocidad de eliminación de los fármacos podría aumentar, disminuyendo así las concentraciones plasmáticas y sus efectos farmacológicos. Estas observaciones abren un amplio campo en la investigación de la biotransformación hepática de fármacos asociados a estrés oxidativo.

## V. REFERENCIAS

Carraway, R., Hassan, S., Cochrane, D. 2004. Polyphenolic Antioxidants Mimic the Effects of 1,4-Dihydropyridines on Neurotensin Receptor Function in PC3 Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 309 (1): 92-101.

Díaz-Araya, G., Godoy, L., Naranjo, L., Squella, J.A., Letelier, M.E., Núñez-Vergara, L. 1998. Antioxidant effects of 1,4-dihydropyridine and nitroso aryl derivatives on the Fe<sup>+3</sup>/ascorbate-stimulated lipid peroxidation in rat brain slices. *General Pharmacology* 31: 385-391.

Drocourt, L., Pascussi, J.M., Assenat, E., Fabre, J. M., Maurel, P., Vilarem, M.J. 2001. Modulators of the dihydropyridine family are human pregnane x receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 29 (10): 1325-1331.

Engineer, F., Sridhar, R. 1989. Inhibition of rat heart and liver microsómica lipid peroxidation by nifedipine. *Biochemical Pharmacology* 38: 1279-1285.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1990. Rol of free radicals and catalytic metals ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology* 186: 1-85.

Hayase, N., Inagaki, S., Abiko, Y. 1995. Effects of photodegradation products of nifedipine: The nitroso-derivative relaxes contractions of de rat aortic strip induced by norepinephrine and other agonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 275: 813-821.

Janero, D.R., Burghardt, B. 1988. Analysis of cardiac membrane phospholipid peroxidation kinetics as malondialdehyde: nonspecificity of thiobarbituric acid-reactivity. *Lipids* 23: 452-458.

Kappe, C. O. 1998. 4-Aryldihydropyrimidines via the Biginelli Condensation: Aza-Analogs of Nifedipine-Type Calcium Channel Modulators. *Molecules*, 3: 1-9.

Lehninger, A.L. 1982. Electron transport, oxidative phosphorylation and regulation of ATP production. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York, pp. 467-510.

Letelier, M.E., Izquierdo, P., Godoy, L., Lepe, A.M., Faúndez, M. 2004. Liver Microsómica Biotransformation of Nitro-aryl Drugs: Mechanism for Potencial Oxidative Stress Induction. Journal of Applied Toxicology 24: 519-525.

Letelier, M.E., Pimentel, A., Pino, P., Lepe, A.M., Faúndez, M., Aracena, P., Speisky, H. 2005. Microsómica UDP-glucuronyltransferase of rat liver. Oxidative activation. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 96: 480-486.

López-Alarcón, C., Navarrete, P., Camargo, C., Squella, J.A., Nuñez-Vergara, L. 2003. Reactivity of 1,4-dihydropyridines toward alkyl, alkylperoxyl radicals, and ABTS radical cation. Chemical Research in Toxicology, 16: 208-215.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-273.

Mason, R.P., Trumbore, M.W. 1996. Differential membrane interactions of calcium channel blockers. Implications for antioxidant activity. Biochemical Pharmacology, 51: 653-660.

Misik, V., Stasko, A., Gergel D., Ondrias, K. 1991. Spin-trapping and antioxidant properties of illuminated and nonilluminated nifedipine and nimodipine in heart homogenate and model system. Molecular Pharmacology, 40: 435-439.

Napoli, C., Salomone, S., Godfraind, T., Palinski, W., Capuzzi, D.M., Palumbo, G., D'Armiento, F.P., Donzelli, R., de Nigris, F., Capizzi, R.L., Mancini, M., J.S. Gonnella, J.S., Bianchi, A. 1999. 1,4-Dihydropyridine Calcium Channel Blockers Inhibit Plasma and LDL Oxidation and Formation of Oxidation-Specific Epitopes in the Arterial Wall and Prolong Survival in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Stroke*, 30: 1907-1915.

Neuzil, J. Gebicki, J.M. Stocker R. 1993. Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochemical Journal*, 293: 601 - 606.

Ondrias, K., Misik, V., Gergel, D., Stasko, A. 1989. Lipid peroxidation of phosphatidylcholine liposomes depressed by the calcium channel blockers Nifedipine and Verapamil and by antiarrhythmic-antihypoxic drug, Stobadine. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1003: 238-245.

Ortiz, M.E., Nunez-Vergara L.J., Squella, J.A. 2003. Relative reactivity of dihydropyridine derivatives to electrogenerated superoxide ion in DMSO solutions: a voltametric approach. *Pharmaceutical Research*, 20: 292-296.

Quick, D.J., 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. *Biotechnology Progress*. 14: 540-555.

Satoh, M.S., Jones, C.J., Wood, R.D., Lindahl, T., 1993. DNA excision-repair defect of xerodermapigmentosum prevents removal of a class of oxygen free radical-induced base lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 6335 - 6339.

Sevanian, A., Shen, L., Ursini F. 2000. Inhibition of LDL-induced Cytotoxicity by Dihydropyridine Calcium antagonists. *Pharmaceutical Research*, 17: 999-1006.

Stengel, W., Jinz, M. Andreas, K. 1998. Different potencies of dihydropyridines derivatives in blocking T-type but not L-type  $Ca^{2+}$  channels in neuroblastoma-glioma hybrid cells. *European Journal Of Pharmacology*, 342(2-3): 339-345.

Usberti, M., Gerardi, G.M., Gazzotti, R.M., Benedini, S., Archetti, S., Sugherini, L., Valentini, M., Tira, P., Bufano, G., Albertini, A., Di Lorenzo, D. 1991. Oxidative stress and cardiovascular disease in dialyzed patients. *Nephron*, 1: 25-33.

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. *Chemical Research In Toxicology*, 10: 1008-1014.