



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**“BIOTRANSFORMACIÓN DE NITROFURANTOÍNA Y  
NIFURTIMOX EN MICROSOMAS HEPÁTICOS DE RATAS”**

**CARLOS ALBERTO REINOSO IBARRA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Clínicas.

**PROFESOR GUÍA: SRA. MARÍA EUGENIA LETELIER M.**

**SANTIAGO-CHILE**

**2005**



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**BIOTRANSFORMACIÓN DE NITROFURANTOÍNA Y NIFURTIMOX  
EN MICROSOMAS HEPÁTICOS DE RATAS**

**CARLOS ALBERTO REINOSO IBARRA**

NOTA FINAL: \_\_\_\_\_

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: MARÍA EUGENIA LETELIER M.	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO: LÁZARO ZÜRICH Z.	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO: HÉCTOR ADARMES A.	_____	_____

**SANTIAGO, CHILE  
2005**

*“Todos los hombres son sabios, unos  
antes, los otros después”  
Dedicada a mis padres con cariño.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Primero que todo, a mis amados padres, quienes con su esfuerzo, apoyo y eterna comprensión me guiaron para terminar esta importante etapa de mi vida. Gracias por todo.*

*A mis queridos hermanos Julia, Jorge, Luis y Patty quienes siempre creyeron y confiaron en mí.*

*A la Profesora María Eugenia Letelier, quien ha sido un pilar fundamental en mi formación. Gracias por todo su apoyo.*

*A mis compañeros de laboratorio Claudia, Cristina, Juan Ignacio, Juan Guillermo y Víctor, con quienes compartí inolvidables y gratos momentos.*

*A Don José y a la Sra. Guisela, quienes en forma desinteresada contribuyeron de manera importante al desarrollo de este trabajo.*

*A la Sra. Ximena Polanco y su equipo, quienes siempre nos brindaron su apoyo en los momentos difíciles.*

*A los Profesores Héctor Adarmes, Marcos Galleguillos y Ema González, y también a Víctor quienes me abrieron las puertas de su laboratorio. Gracias por su apoyo y amistad. También al Profesor Lázaro Zurich por su valioso tiempo dedicado.*

*A Marcela, Fernanda y Paulina por su incondicional amistad y apoyo. A Johanna por su siempre buena disposición para conmigo. Y agradecimientos especiales para la Tía Susy por su incondicional apoyo durante toda la carrera.*

## **ABREVIATURAS**

MDA	: Malondialdehído
TBA	: Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	: Ácido tricloroacético
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
GST	: Glutación transferasa microsómica

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Páginas</b>
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
SUMMARY.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Hipótesis.....	10
Objetivos Generales.....	10
Objetivos Específicos.....	10
III. MATERIALES Y METODOS.....	12
Reactivos.....	12
Animales de experimentación.....	12
Preparación de microsomas hepáticos de ratas.....	13
Determinación de proteína.....	13
Lipoperoxidación microsómica.....	13
Determinación de citocromo P450.....	14
Hidroxilación de naftaleno.....	14
Análisis estadístico.....	15
IV. RESULTADOS.....	16
V. DISCUSIÓN.....	33
VI. CONCLUSIONES.....	36
VII. PROYECCIONES DEL TRABAJO.....	36
VIII. REFERENCIAS.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras 1A y 1B	Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) a través del sistema citocromo P450. Efecto del tiempo de incubación.	17
Figuras 2A y 2B	Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) a través del sistema citocromo P450. Efecto de la concentración de proteína.	18
Figuras 3A y 3B	Efecto de la concentración de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación a través del sistema citocromo P450.	19
Figuras 4A y 4B	Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) a través del sistema citocromo P450. Efecto del GSH.	21
Figuras 5A y 5B	Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) a través del sistema citocromo P450. Efecto de un extracto hidroalcohólico de matico.	22
Figura 6	Espectro control de la absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica.	24
Figuras 7A y 7B	Efecto de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) sobre el contenido de citocromo P450.	25
Figuras 8A y 8B	Efecto de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica.	26
Figuras 9A y 9B	Efecto de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) sobre la hidroxilación de naftaleno.	30
Figura 10	Hidroxilación de naftaleno. $K_m$ y $V_{max}$ .	31
Figuras 11A y 11B	Hidroxilación de naftaleno. $K_m$ y $V_{max}$ en presencia de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B).	32

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nº 1	Efecto de Nitrofurantoína y Nifurtimox sobre el contenido de la monooxigenasa citocromo P450.	27
------------	---	----

## RESUMEN

En general los procesos de biotransformación originan metabolitos inocuos para el organismo y mayoritariamente excretables por la orina. Nitrofurantoína y Nifurtimox son compuestos lipofílicos, por lo cual deben ser oxidados para transformarse en compuestos hidrosolubles y así excretables por la orina. Al respecto, no existen antecedentes de la existencia de vías metabólicas que provoquen modificaciones oxidativas de estos fármacos y así puedan adquirir la polaridad suficiente para ser excretados por la orina. Sin embargo, la reducción enzimática de Nitrofurantoína y Nifurtimox genera un nitro anión radical ( $\text{NO}_2^-$ ) intermediario que en presencia de  $\text{O}_2$ , es capaz de sufrir reciclaje redox y generar especies reactivas del oxígeno (ROS), responsables de la inducción de estrés oxidativo celular.

En este trabajo se estudió la nitrorreducción y el posible metabolismo oxidativo de Nitrofurantoína y Nifurtimox, ambos fenómenos catalizados por el sistema citocromo P450. Para ello utilizamos una preparación enriquecida en retículo endoplásmico hepático de rata (microsomas). La incubación de los microsomas con ambos fármacos y NADPH indujo lipoperoxidación microsómica, fenómeno que fue inhibido por GSH y un extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* (matico). Por otra parte, al aumentar la concentración tanto de Nitrofurantoína como de Nifurtimox, la lipoperoxidación disminuyó de una forma bimodal; así, a concentraciones  $\mu\text{M}$  la pendiente de disminución fue 20 y 10 veces mayor que a concentraciones  $\text{mM}$  de Nitrofurantoína y Nifurtimox, respectivamente. Más aún, ambos fármacos se unieron a la monooxigenasa citocromo P450 de una forma concentración-respuesta e inhibieron competitivamente la hidroxilación de naftaleno, reacción catalizada por el sistema citocromo P450. Los resultados demuestran que tanto Nitrofurantoína como Nifurtimox podrían ser nitrorreducidos y además oxidados por el sistema oxidativo del citocromo P450. Por otra parte, dado que el estrés oxidativo fue inhibido por antioxidantes, una terapia asociada podría disminuir los efectos adversos asociados a la nitrorreducción de estos fármacos; sin embargo se necesitan nuevos experimentos que confirmen este postulado, entre ellos la identificación de metabolitos polares resultantes de la biotransformación oxidativa de estos fármacos.

## SUMMARY

### BIOTRANSFORMATION OF NITROFURANTOIN AND NIFURTIMOX IN RAT LIVER MICROSOMES

The biotransformation processes generally produce innocuous metabolites for the organism which are majority eliminated by the urine. Nitrofurantoin and Nifurtimox are lipophilic compounds, so they must be oxidized so reaching the sufficient polarity to be eliminated by the urine. Data no exist however, related with metabolic pathways across these drugs undergo oxidative metabolism. The enzymatic reduction of Nitrofurantoin and Nifurtimox however, generate an intermediate nitro anion radical ( $\text{NO}_2^-$ ) which, in the presence of  $\text{O}_2$  suffers a redox cycle, so generating reactive oxygen species (ROS), these species induce cellular oxidative stress. So in this work we studied the enzymatic nitrorreduction and the possible oxidative metabolism of Nitrofurantoin and Nifurtimox catalyzed by cytochrome P450 system. To realize this study, we used a preparation enriched in hepatic endoplasmic reticulum of rat (microsomes). The incubation of microsomes with both drugs and NADPH induced microsomal lipoperoxidation; this phenomenon was inhibited by GSH and a hydroalcoholic extract of *Buddleja globosa* (matico). On the other hand, the microsomal lipoperoxidation induced by biotransformation decreased with the increasing of Nitrofurantoin and Nifurtimox concentrations; this phenomenon however was bimodal. Thus, the slopes obtained to  $\mu\text{M}$  concentrations were 20 and 10 fold higher than those obtained to mM concentrations of Nitrofurantoin and Nifurtimox, respectively. Moreover, binding of both drugs to cytochrome P450 monooxygenase was observed and this phenomenon was concentration-response dependent. Beside, Nitrofurantoin and Nifurtimox induced a competitive inhibition on the naphthalene hydroxylation, reaction catalyzed by cytochrome P450 system. Our results show that Nitrofurantoin and Nifurtimox may be reduced and beside, oxidized by the cytochrome P450 system. Because oxidative stress was inhibited by antioxidant compound, an associated therapy to antioxidant drugs may diminished the adverse effects associated to the nitro-reduction of these drugs; however, new experiments are necessary to confirm this postulate, between them, the identification of the polar metabolites of these drugs resulted of its oxidative biotransformation.

## I. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos, entre ellos los mamíferos, están expuestos constantemente a una amplia variedad de sustancias químicas extrañas a ellos denominadas xenobióticos. Estos xenobióticos incluyen, entre otros, los fármacos, los contaminantes ambientales y los constituyentes de los alimentos. Para ser eliminados, estos compuestos sufren biotransformaciones enzimáticas que convierten a estas sustancias en moléculas más polares y, por tanto, fácilmente eliminables por la orina (Riddick, 1997).

Desde el punto de vista farmacológico los mecanismos enzimáticos encargados de la biotransformación de xenobióticos se agrupan en reacciones de Fase I y reacciones de Fase II. Los procesos de Fase I incluyen reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis que son catalizadas principalmente por el sistema oxidativo del citocromo P450. Los procesos de Fase II en cambio corresponden a reacciones de síntesis o conjugación, las cuales son catalizadas por diferentes transferasas tales como la Glutación-transferasa (GST) o la Uridíndifosfo-glucuronil-transferasa (UDPGT) entre otras. De estas últimas, la glucuronidación representa en el hombre y en otras especies (excluidos los felinos) uno de los mecanismos de biotransformación de Fase II más importante (Kasper y Henton, 1980).

En general los procesos de biotransformación dan origen a metabolitos inactivos e inocuos para el organismo. No obstante, la biotransformación de algunos xenobióticos puede generar ciertos metabolitos tóxicos como ocurre con Nitrofurantoína y Nifurtimox; estos compuestos por reducción enzimática generan un nitro anión radical ( $\text{NO}_2^-$ ) intermediario el cual a través de un ciclo fútil, sufre sucesivas reducciones hasta regenerarse el compuesto nitroarílico. En presencia de  $\text{O}_2$ , este radical intermediario es capaz de sufrir reciclaje redox y generar el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\cdot$ ) que son capaces de generar estrés oxidativo cuando la capacidad antioxidante celular es insuficiente (Wolff *et al.*, 1986; Wallace, 1988; Neuzil *et al.*, 1993).

Existen antecedentes que indican que la toxicidad de Nitrofurantoína y Nifurtimox estaría dada por la capacidad de ambos fármacos de inducir estrés oxidativo a través de su nitrorreducción (Moreno *et al.*, 1984). Estos fármacos son compuestos lipofílicos, por lo

cual necesitan ser oxidados para ser eliminados desde el organismo; sin embargo, no existen antecedentes en la literatura de la existencia de otras vías metabólicas a través de las cuales estos fármacos puedan ser polarizados y eliminados por la orina. Es por ello que en este trabajo se inició el estudio del posible metabolismo oxidativo de Nitrofurantoína y Nifurtimox a través del sistema oxidativo citocromo P450.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

**Biotransformación de Xenobióticos.** 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. Es necesario hacer notar la existencia de ciertos 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 *et al.*, 1997).

Los cambios químicos que sufren los fármacos por biotransformación puede conducir a metabolitos farmacológicamente más activos, menos activos o inactivos; más aún, estos metabolitos pueden cambiar cualitativamente su actividad farmacológica o ser tóxicos. Así por ejemplo, la L-dopa (inactivo farmacológicamente) se convierte por descarboxilación en dopamina (metabolito activo); la hidroxilación del pentobarbital a través del sistema oxidativo del citocromo P450, genera un metabolito farmacológicamente inactivo, soluble en agua y excretable por la orina (Riddick, 1997).

En general el proceso de biotransformación de los fármacos lipofílicos es secuencial, es decir, sufren primariamente reacciones de Fase I y luego de Fase II. Sin embargo existen algunas excepciones en donde el producto de la Fase I es suficientemente polar para ser eliminado directamente sin pasar por Fase II. Por otra parte, existen fármacos que adquieren la polaridad necesaria para su eliminación pasando sólo por Fase II directamente, y así también existen otros que son suficientemente polares que no necesitan ser biotransformados para ser excretados (Riddick, 1997). El principal sistema encargado de la biotransformación de xenobióticos lipofílicos es el sistema oxidativo del citocromo P450 que cataliza principalmente reacciones de oxidación y en mucho menor grado, reacciones de reducción.

**Sistema oxidativo del citocromo P450 microsómico.** Este sistema está constituido por una familia de monooxigenasas de función múltiple localizadas fundamentalmente en el retículo endoplásmico de los hepatocitos. Estas enzimas son un grupo de hemoproteínas, las cuales al combinarse en su estado reducido (ferroso) con el monóxido de carbono,

forman un complejo cuya absorbancia máxima corresponde a 450 nm (Villar del Fresno *et al.*, 2003).

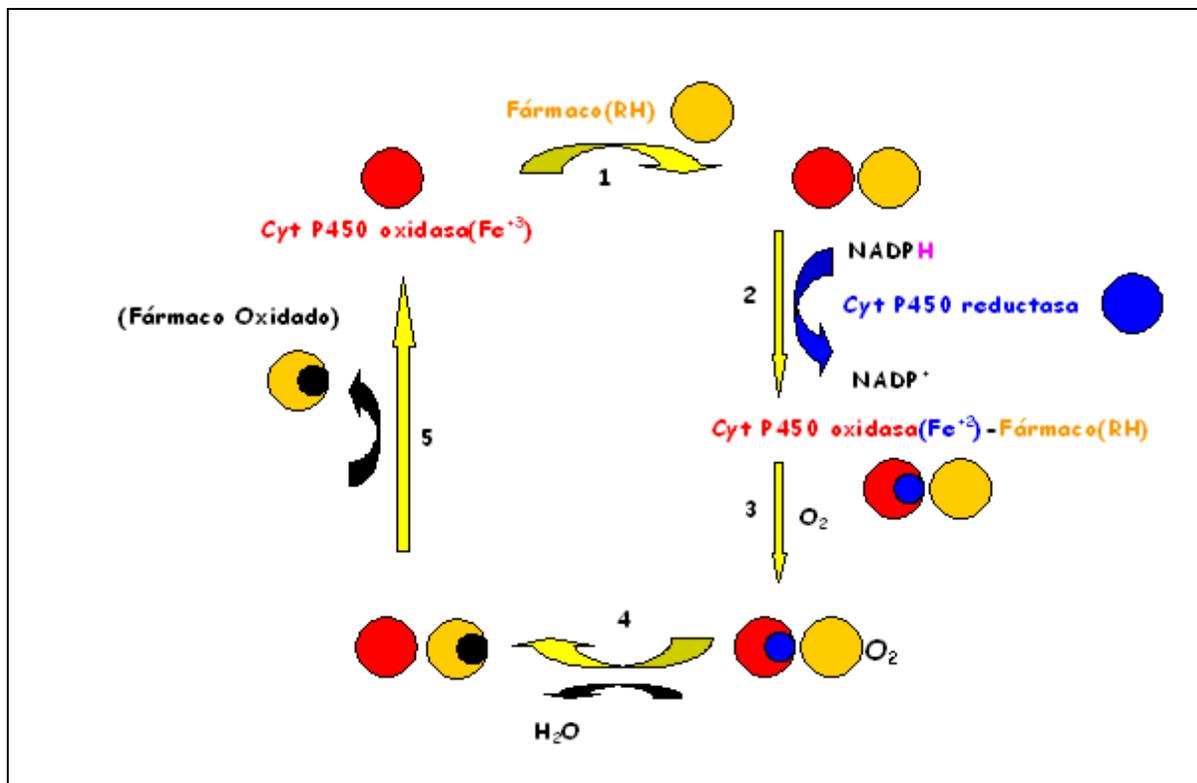
Las reacciones catalizadas por este sistema involucran varias etapas:

1. El xenobiótico o sustrato se une a la monooxigenasa citocromo P450 en su estado oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para formar el complejo binario xenobiótico-monooxigenasa citocromo P450. La unión del sustrato a esta enzima resulta en un cambio en las propiedades espectroscópicas de esta hemoproteína.

2. El  $\text{Fe}^{3+}$  del complejo binario formado es reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  por la flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa, la cual le transfiere un electrón 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 algunos compuestos nitro-arilos. Tales aceptores de electrones actúan, por lo tanto, como inhibidores de las reacciones de oxidación (Coon *et al.*, 1980). En ocasiones, los electrones son cedidos por el NADH al citocromo  $b_5$ , reacción catalizada por la NADH-citocromo  $b_5$ -reductasa.

3. El complejo xenobiótico-monooxigenasa citocromo P450 reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) interactúa con el oxígeno molecular para formar un complejo ternario, el oxi-xenobiótico-monooxigenasa citocromo P450. En ocasiones, dicho complejo ternario puede disociarse liberando  $\text{O}_2^-$ , regenerándose así la proteína férrica; cuando esto sucede, los fármacos inducen estrés oxidativo y su velocidad de metabolización disminuye.

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.



**Esquema 1.** Mecanismo de acción del sistema oxidativo del citocromo P450.

La actividad de la monooxigenasa citocromo P450 está representada por un grupo de isoenzimas; en el hígado humano se han descrito al menos doce isoformas (Nebert *et al.*, 1991), las cuales poseen una amplia selectividad de sustrato. Cada isoforma de la monooxigenasa citocromo P450 se identifica 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. Las familias restantes están involucradas principalmente en el metabolismo de sustratos endógenos, esteroides y ácidos grasos (Villar del Fresno *et al.*, 2003).

Las isoenzimas de la monooxigenasa citocromo P450 poseen dos a tres grupos tiólicos cuando se encuentran insertas en la membrana microsómica; sin embargo, las moléculas solubilizadas exhiben cuatro a cinco grupos tiólicos (Al'terman *et al.*, 1981). En la actualidad, se han purificado a homogeneidad varios citocromos P450 y también los demás componentes de este sistema oxidativo, 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 *et al.*, 1980). 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.

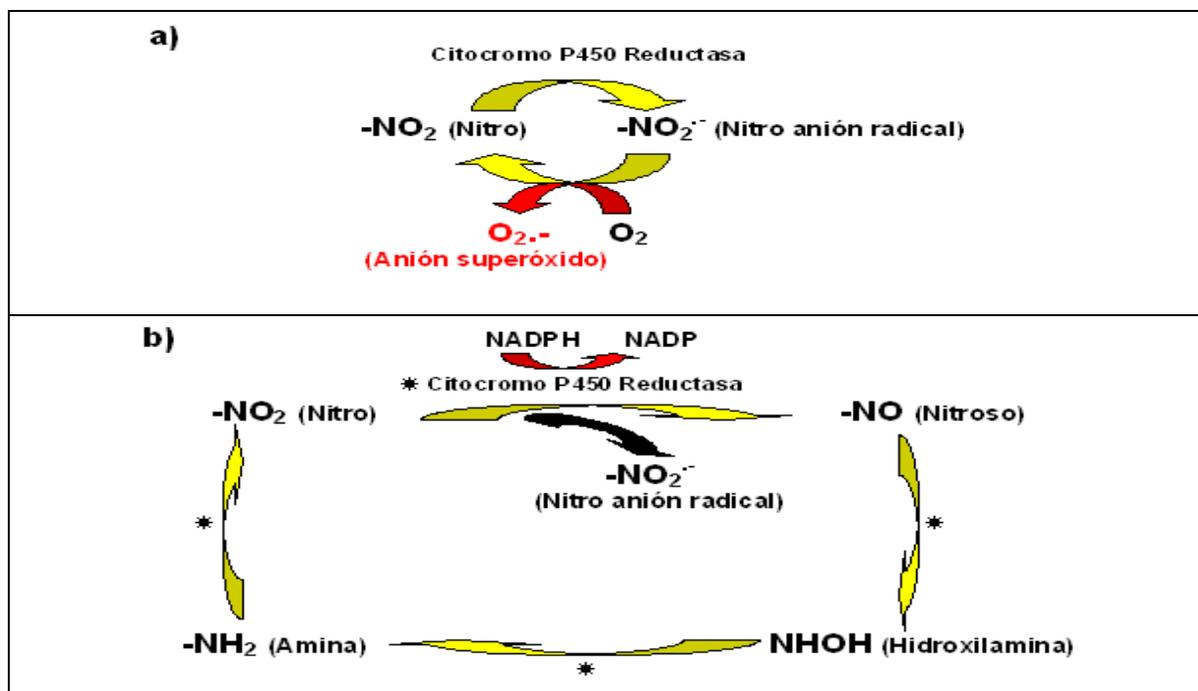
Numerosos compuestos son metabolizados por el sistema del citocromo P450 a través de una variedad de reacciones químicas. De estas reacciones podemos mencionar las hidroxilaciones alifáticas y aromáticas (fenilbutazona, propanolol, warfarina y fenobarbital son metabolizados por esta vía), las N-desalquilaciones (Ej.: teofilina, eritromicina y diazepam), las O-desalquilaciones (Ej.: codeína), las deshalogenaciones (Ej.: halotano y metoxifluorano), las epoxidaciones (Ej.: naftaleno) y las desaminaciones oxidativas (Ej.: anfetaminas) entre otras.

Los sustratos oxidados por este sistema son numerosos y variados, presentando como característica en común su alta lipofiliidad. 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 aromáticos policíclicos, 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 *et al.*, 1987).

**Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por biotransformación de fármacos a través del citocromo P450.** La activación del oxígeno molecular a sus especies radicalarias  $O_2^{\cdot -}$  y  $HO^{\cdot}$ , ocurre en la célula bajo condiciones aeróbicas. En condiciones fisiológicas, la reducción parcial del oxígeno a sus especies radicalarias puede ser catalizada por enzimas tales como la xantina oxidasa, la monoamino-oxidasa y la citocromo P450 reductasa, la cual forma parte del sistema oxidativo del citocromo P450 (Karuzina y Archakov, 1994; Jaeschke, 1995). Cabe señalar además, que ciertos sustratos que son oxidados por este sistema, pueden generar especies radicalarias transitorias que corresponden a complejos oxi o peroxi-citocromo P450; estas especies

pueden entrar en reciclaje redox con el oxígeno molecular y generar ROS. Al producirse el decaimiento de estas especies transcientes, junto con una eventual ruptura del complejo ternario oxi-xenobiótico-monooxigenasa citocromo P450, se generan intermediarios reactivos, como epóxidos, N-óxidos, S-óxidos, aldehídos y cetonas (Halpert *et al.*, 1986; Guengerich *et al.*, 1990)

Dentro de las reducciones catalizadas por el sistema oxidativo del citocromo P450, la más conocida es la reducción monoelectrónica de los grupos nitro presentes en diversos fármacos tales como Nifurtimox, Cloranfenicol, Nifuroxacida y Nitrofurantoína. Este tipo de reducción conduce a la formación de un  $\text{-NO}_2^-$  intermediario que ~ a) en un ciclo fútil se auto-oxida rápidamente en presencia de  $\text{O}_2$ , conduciendo a la formación de  $\text{O}_2^-$  y a la regeneración del compuesto nitro- inicial (Rossi *et al.*, 1988; Suntres y Shek, 1992), y ~ b) puede transformarse en el derivado nitroso y continuar la reducción a hidroxilamina y por último a amina. Las especies reactivas del oxígeno como las provenientes del fármaco involucrado pueden inactivar al citocromo P450. Los mecanismos por los cuales se produce esta inactivación dependen de las especies involucradas. Así por ejemplo, estas especies se pueden unir covalentemente a la apoenzima en forma irreversible; ejemplo de este tipo de inactivación es la provocada por Paratión, Cloroformo y Cloranfenicol (Karuzina y Archakov, 1994). Por otra parte, los intermediarios reactivos pueden actuar como ligandos del hierro hemínico de la monooxigenasa citocromo P450; esta unión puede ser desplazada por otros compuestos lipofílicos; de aquí que se considere como una unión casi irreversible.



**Esquema 2.** Nitrorreducción catalizada por la citocromo P450 reductasa y formación del nitro anión radical ( $\text{-NO}^{\bullet}$ ).

**Fármacos Nitro-arílicos: Nitrofurantoína y Nifurtimox.** Nitrofurantoína (N-[5-nitro-2-furfurilidina]-1-amino-hidantoína), es un derivado nitrofurano que se utiliza como fármaco de elección en el tratamiento de las infecciones de las vías urinarias; su mecanismo de acción es poco conocido, pero se cree que actuaría inhibiendo diversos mecanismos enzimáticos bacterianos (Azanza *et al.*, 1997). Nifurtimox [4-(5-nitro-furfuriliden)-amino-3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido] es un derivado nitrofurano utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas; actúa tanto en las formas intracelulares como extracelulares del *Trypanosoma cruzi* causando la muerte del parásito por estrés oxidativo. Esta acción se debe a la baja capacidad antioxidante celular que posee el parásito, haciéndolo especialmente sensible a las ROS (Flórez, 1997).

Existen antecedentes que demuestran la capacidad de ambos fármacos de inducir estrés oxidativo a través de la nitrorreducción catalizada por la citocromo P450 reductasa. Esta nitrorreducción induce estrés oxidativo y modificaciones oxidativas sobre las biomoléculas: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando su estructura y actividad biológica (Letelier *et al.*, 2004). Por este motivo se piensa que pueden ser mutagénicos y carcinogénicos. Al respecto, se sabe que los efectos tóxicos que Nifurtimox produce en pacientes chagásicos tratados con este fármaco, se deberían a la nitrorreducción

enzimática ocurrida *in vivo*. Asimismo, la toxicidad de la Nitrofurantoína, también ha sido asociada a una inducción de estrés oxidativo (Rossi *et al.*, 1988).

En la literatura existen antecedentes acerca de los mecanismos a través de los cuáles Nitrofurantoína ejerce sus efectos tóxicos; por otra parte, se sabe que el 30% de la dosis administrada, se elimina como tal (Albert *et al.*, 1974). Respecto de Nifurtimox sólo existen antecedentes acerca de la nitrorreducción que este fármaco sufriría *in vivo*. No existen antecedentes acerca de la forma de eliminación de estos fármacos del organismo. Ambos fármacos son compuestos lipofílicos, por lo tanto, requieren ser oxidados y así polarizados antes de ser excretados. Dado que el sistema oxidativo del citocromo P450 es el principal responsable de la biotransformación oxidativa de fármacos lipofílicos, es probable que al menos una de las vías de biotransformación involucre a este sistema oxidativo. Cabe recordar que la monooxigenasa y la citocromo P450 reductasa forman parte del sistema oxidativo del citocromo P450. Por lo tanto, en las condiciones de biotransformación oxidativa, la oxidación y la reducción de los compuestos nitroarilos podrían ocurrir en forma simultánea y competitiva.

Los antecedentes presentados muestran que el sistema del citocromo P450 puede oxidar y reducir simultáneamente Nitrofurantoína y Nifurtimox. Es por ello que en este trabajo se establecieron las condiciones a través de las cuales se pudieran evaluar ambos fenómenos. En estas condiciones se estudió la capacidad de estos fármacos de inducir lipoperoxidación en microsomas hepáticos de rata (preparación enriquecida en retículo endoplásmico). Por otra parte, se determinó la capacidad de estos fármacos de unirse a la monooxigenasa citocromo P450 en su forma oxidada ( $Fe^{3+}$ ) midiendo los cambios de su espectro de absorbancia y la capacidad de inhibir competitivamente la hidroxilación de naftaleno, reacción catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450.

Nuestros resultados mostraron que la preincubación de los microsomas hepáticos de rata ya sea con 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. Por otra parte, ambos fármacos disminuyeron la absorbancia a 450 nm de la monooxigenasa citocromo P450 e inhibieron competitivamente la hidroxilación de naftaleno. Estos antecedentes parecen indicar que la nitrorreducción y la oxidación de estos fármacos ocurrirían en forma competitiva y

simultánea. Más aún, la nitrorreducción se favorecería a bajas concentraciones de estos fármacos ( $\mu\text{M}$ ) y la vía oxidativa a altas concentraciones ( $\text{mM}$ ). La importancia farmacológica y toxicológica de estos resultados se discute en el texto.

## **HIPÓTESIS**

Dado que Nitrofurantoína y Nifurtimox son fármacos lipofílicos, ellos no sólo pueden sufrir nitrorreducción sino también oxidación a través del sistema oxidativo del citocromo P450. Por otra parte, tanto el proceso de nitrorreducción como el oxidativo ocurren en forma simultánea.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la participación del sistema oxidativo citocromo P450 microsómico en la biotransformación de Nitrofurantoína y Nifurtimox.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer las condiciones experimentales para evaluar los efectos oxidativos sobre los lípidos constituyentes de la membrana microsómica de hígado de rata: tiempo de incubación de la mezcla de reacción, concentración de proteína microsómica y concentración de los fármacos Nitrofurantoína y Nifurtimox.
2. Evaluar la protección que ejercen agentes antioxidantes endógenos como GSH y exógenos como *Buddleja globosa* (extracto hidroalcohólico enriquecido en polifenoles) sobre la lipoperoxidación microsómica hepática inducida por la biotransformación de Nitrofurantoína y Nifurtimox.

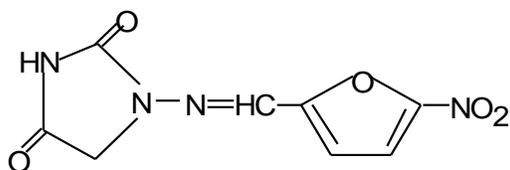
3. Determinar las interacciones que Nitrofurantoína y Nifurtimox pueden ejercer sobre la absorbancia máxima de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica.
4. Determinar la actividad hidroxilante de naftaleno, reacción catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450, en ausencia y presencia de Nitrofurantoína y Nifurtimox.
5. Determinar las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$  para la hidroxilación de naftaleno, en ausencia y presencia de Nitrofurantoína y Nifurtimox.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

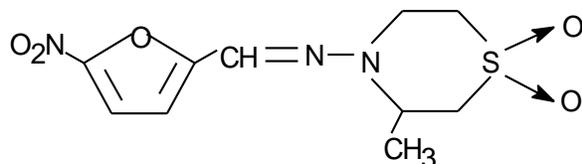
#### MATERIALES

##### Reactivos

La albúmina de bovino fracción IV, el glutatión reducido (GSH), el  $\beta$ -nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato (NADP), la glucosa-6-fosfato (G-6-P) y la G-6-P deshidrogenasa se obtuvieron de SIGMA Chemical Co. Chile. Los reactivos: ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), reactivo de Folin-Ciocalteu-fenol, carbonato de sodio, tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre, fosfato diácido de potasio, naftaleno,  $\alpha$ -naftol, dimetil-sulfóxido (DMSO), acetato de etilo, etanol, HCl concentrado, 2,6-dicloroquinonclorimida, ditionito de sodio, ácido fórmico concentrado y ácido sulfúrico concentrado, se obtuvieron de Merck Chile. La Nitrofurantoína [N-(5-nitro-2-furfurilidina)-1-amino-hidantoína] se obtuvo del recetario magistral Farmacias Ahumada; el Nifurtimox: [4-(5-nitro-furfuriliden)-amino-3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido] se obtuvo de Laboratorios Bayer; el extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* (matico) fue preparado por Laboratorios Ximena Polanco.



(Nitrofurantoína)



(Nifurtimox)

##### Animales de experimentación

Se emplearon ratas machos de la cepa Sprague Dawley de tres meses de edad (adultos jóvenes) y cuyo peso corporal fluctuó entre 200 a 230 g. 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 de la Universidad de Chile.

## MÉTODOS

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

Los animales se mantuvieron en ayunas durante 15 horas previas al sacrificio, con agua *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados por decapitación. A continuación, los hígados fueron perfundidos *in situ* con 4 volúmenes de 20 mL de NaCl 0,9 % P/V y luego fueron extirpados y limpiados de tejido conectivo y vasos sanguíneos. Los hígados obtenidos fueron cortados en pequeños trozos, y se prepararon homogeneizados al 20 % P/V 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 así preparado, se centrifugó a 9.000 x g durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada Heraeus Sepatech modelo Suprafuge 22, para sedimentar células intactas, núcleos y mitocondrias. El sedimento fue eliminado y el sobrenadante se centrifugó a 105.000 x g durante una hora en una ultracentrífuga Beckman modelo XL-90. El sedimento de esta centrifugación o fracción microsómica, se utilizó para medir lipoperoxidación y para estudiar la biotransformación oxidativa de estos fármacos.

**2. Determinación de proteína.** La proteína de la fracción microsómica se determinó por el método descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando albúmina de bovino fracción IV, como estándar. La reacción de color corresponde a la reducción del ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Folin-Ciocalteu) por la proteína previamente tratada con cobre en un medio alcalino.

**3. Lipoperoxidación.** La lipoperoxidación microsómica se estimó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por el método convencional (Letelier *et al.*, 2004). El malondialdehído generado como producto de descomposición de los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado, cuya absorbancia máxima es 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 50mM, pH 7,4; 1,0 mg de proteína microsómica/ mL;  $\beta$ -NADP 0,6 mM; G-6-P 6,0 mM; G-6-P deshidrogenasa 1,0 U y Nitrofurantoína o Nifurtimox 1,0 mM. Los blancos contenían sólo amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4 y Nitrofurantoína o Nifurtimox 1 mM; los controles que corresponden a la lipoperoxidación basal, contenían

todos los reactivos a excepción del sistema generador de NADPH y los fármacos nitroarílicos. Las mezclas y los blancos se incubaron durante 30 minutos a 37° C en un baño termostático, con agitación constante. Al cabo de este período, las proteínas se precipitaron agregando 500  $\mu$ L de TCA al 20 % P/V frío (4° C). Luego, las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos; alícuotas de 500  $\mu$ L de los sobrenadantes se mezclaron con 500  $\mu$ L 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 3, acoplado a un computador.

**4. Determinación del contenido de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica.** La cuantificación del contenido de citocromo P450 se realizó de acuerdo al método descrito por Omura y Sato (1964). Este método aprovecha la capacidad del monóxido de carbono de coordinarse con el citocromo P450 reducido (reducción inducida con ditionito de sodio) y absorber con un máximo a 450 nm. Los  $\eta$ moles de citocromo P450 se calcularon usando el coeficiente de extinción del conjugado descrito por estos autores: 91  $\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Las condiciones de los ensayos se encuentran en los pies de las figuras respectivas.

**5. Hidroxilación del Naftaleno.** Esta reacción es catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450. Para medir esta actividad enzimática se utilizó la técnica colorimétrica descrita en Booth y Boyland (1971), la cual mide la absorbancia del  $\alpha$ -naftol producido. La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen final de 1,0 mL: amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4; 2,0 mg de proteína microsómica/ mL;  $\beta$ -NADP 1,2 mM; G-6-P 12 mM; G-6-P deshidrogenasa 1,5 U; naftaleno: distintas concentraciones que fluctuaron entre los órdenes  $\mu$ M a mM. Los blancos contenían todos los reactivos a excepción de la G-6-P deshidrogenasa. La reacción se inició agregando la G-6-P deshidrogenasa a las muestras. Las mezclas y los blancos se incubaron durante 15 minutos a 37° C con agitación constante (velocidad inicial). La reacción se detuvo precipitando las proteínas con 0,1 mL de HCl concentrado. A continuación, las muestras y los blancos se calentaron en baño María a 100° C durante 10 minutos; se enfriaron a temperatura ambiente y se les agregó 3,0 mL de acetato de etilo y se agitaron vigorosamente durante 5 minutos para acelerar la separación de ambas fases. La fase

orgánica de ellas se transfirió a un tubo de 25 mL con tapa, y se adicionó 1,0 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10 % P/V y 0,2 mL de 2,6-dicloroquinonclorimida al 0,1 % P/V en etanol. A continuación estas mezclas se agitaron vigorosamente durante 3 minutos y se midió la absorbancia de la fase orgánica a 605 nm contra sus blancos respectivos. La cantidad de  $\alpha$ -naftol (nmoles de producto formado) presente en las muestras, se determinó utilizando  $\alpha$ -naftol como estándar.

**6. Análisis estadístico.** Cada experimento se realizó al menos dos veces en cuadruplicado. Los resultados obtenidos en cada experimento fueron expresados como promedio  $\pm$  sus desviaciones estándar correspondientes. A fin de establecer si las diferencias entre las muestras controles y las muestras experimentales fueron estadísticamente significativas, se utilizó la distribución *t de Student*, exigiéndose en cada caso un 95% de confianza. Los datos obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente con el programa Origin 7.0.

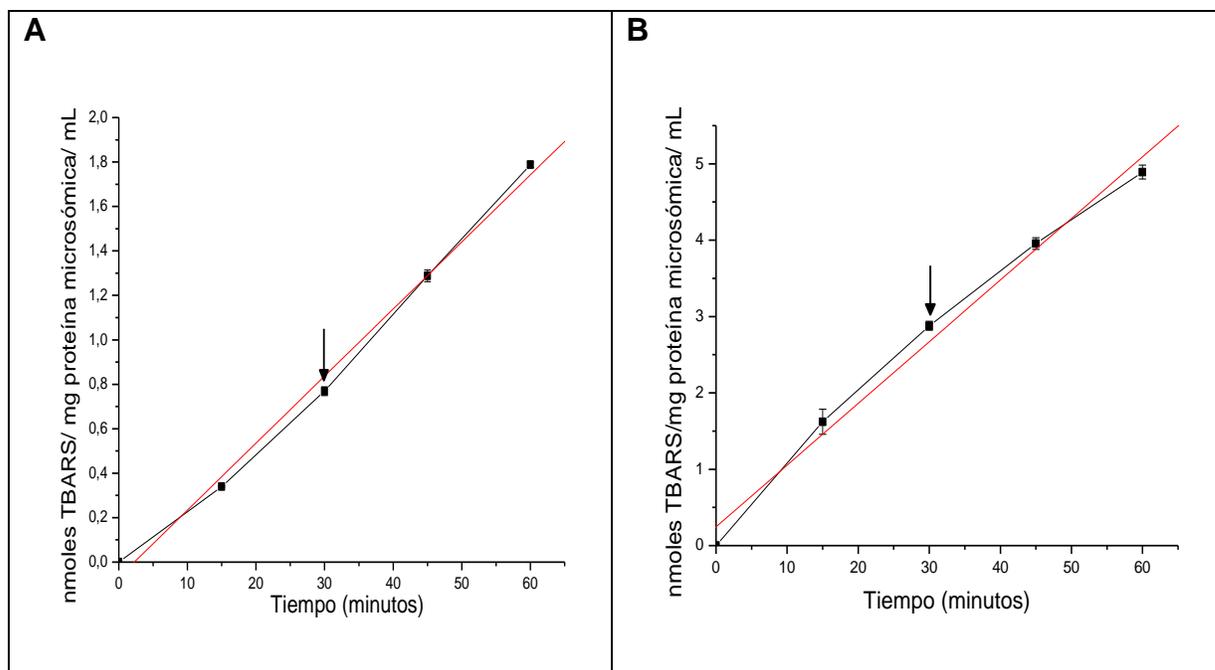
#### IV. RESULTADOS

##### **Lipoperoxidación inducida por biotransformación de Nitrofurantoína y Nifurtimox.**

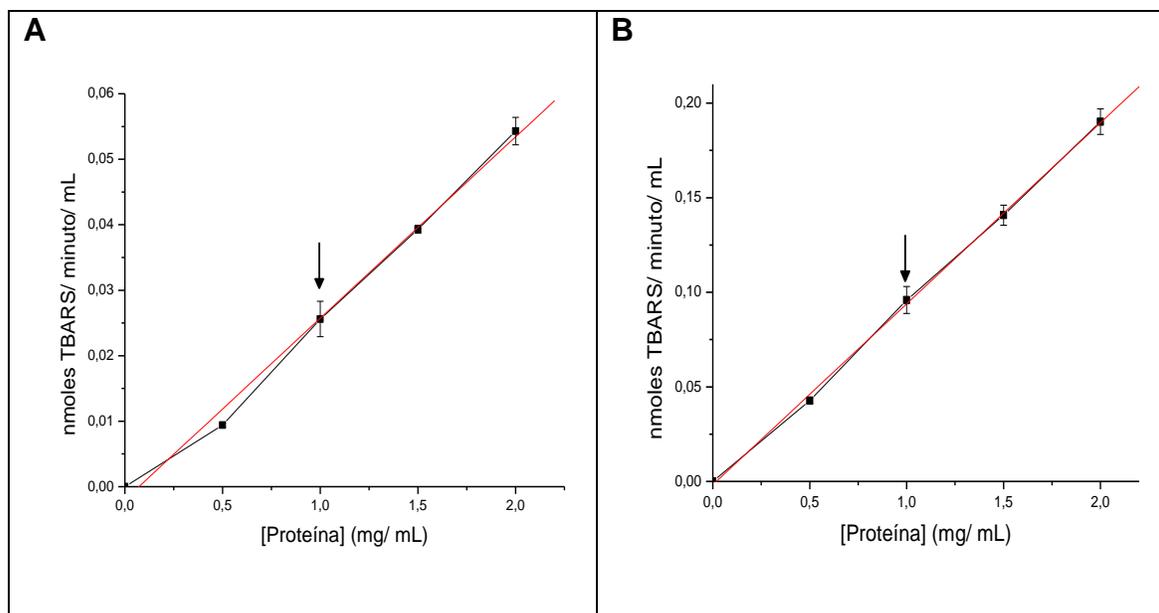
Cabe recordar que el sistema del citocromo P450 requiere para su catálisis la presencia de NADPH que es el reductor del hierro hemínico del complejo binario formado entre el fármaco y la monooxigenasa P450; esta etapa es catalizada por la citocromo P450 reductasa. En estas condiciones, la lipoperoxidación expresada en  $\eta$ moles de TBARS/ mg de proteína microsómica fue lineal respecto del tiempo de incubación de los microsomas con Nitrofurantoína (Figura 1A) y con Nifurtimox (Figura 1B); el tiempo máximo de incubación ensayado fue 60 min.

Las Figuras 2A y 2B muestran el efecto de la concentración de proteína microsómica sobre la lipoperoxidación inducida por biotransformación de Nitrofurantoína y Nifurtimox, respectivamente. La lipoperoxidación expresada en  $\eta$ moles de TBARS/ min aumentó linealmente en el rango concentraciones 0,5 y 2,0 mg de proteína, que fue el utilizado en estos experimentos.

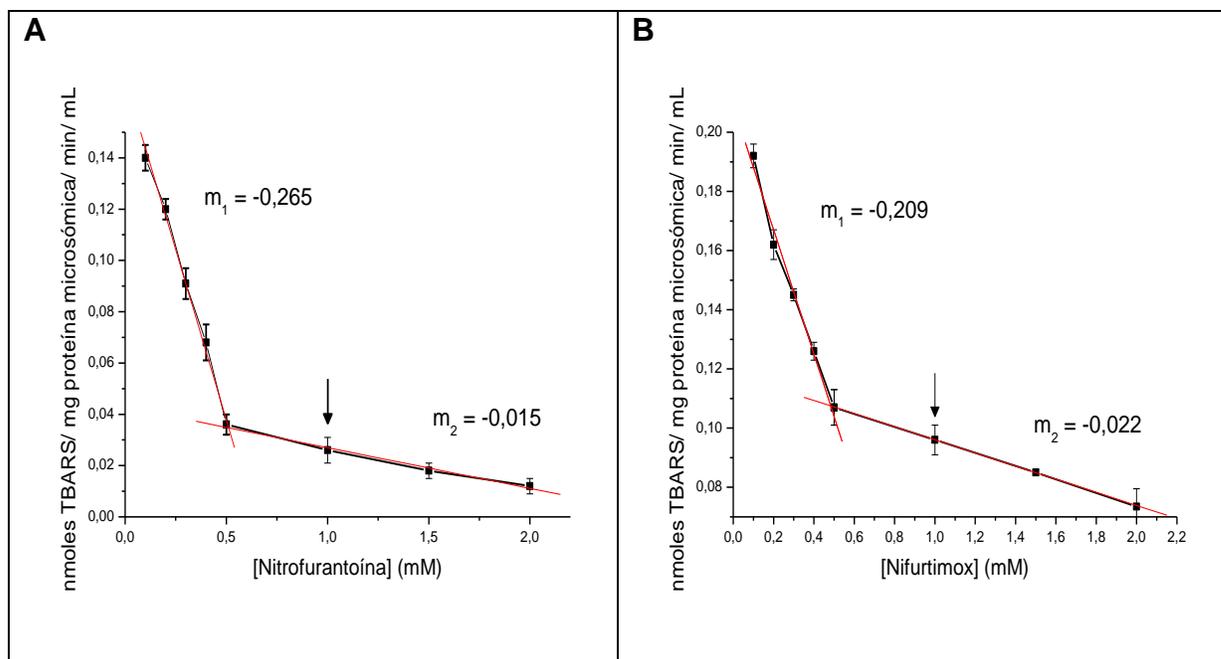
El efecto de la concentración de Nitrofurantoína y Nifurtimox sobre la lipoperoxidación inducida por biotransformación de estos fármacos se muestra en la Figura 3A (Nitrofurantoína) y Figura 3B (Nifurtimox). La máxima concentración de TBARS expresada en  $\eta$ moles de TBARS/ mg de proteína microsómica/ min se obtuvo a la concentración 0,1 mM que fue la menor concentración de estos fármacos ensayada. La concentración de TBARS disminuyó a medida que la concentración tanto de Nitrofurantoína como de Nifurtimox fue aumentada; sin embargo, esta disminución fue bifásica, es decir, se observaron dos rectas de pendientes significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). La primera pendiente se observó entre las concentraciones 0,1 y 0,5 mM y la segunda entre 0,5 y 2 mM. Los valores de la primera pendiente ( $m_1$ ) fueron: -0,2653 (Nitrofurantoína) y -0,2091 (Nifurtimox) y los de la segunda pendiente ( $m_2$ ), -0,0159 (Nitrofurantoína) y -0,0222 (Nifurtimox).



**Figura 1. Lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) a través del sistema citocromo P450. Efecto del tiempo de incubación.** [Proteína microsómica]: 1,0 mg/ mL; temperatura de incubación: 37° C; [Nitrofurantoína]: 1,0 mM; [Nifurtimox]: 1,0 mM. La determinación de lipoperoxidación fue realizada de acuerdo a lo descrito en Métodos. La flecha sobre la recta indica el tiempo elegido para realizar los experimentos siguientes. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar. rA: 0,9967 y rB: 0.9940



**Figura 2. Lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) a través del sistema citocromo P450. Efecto de la concentración de proteína.** La proteína microsómica fue incubada a 37° C durante 30 minutos con Nitrofurantoína 1,0 mM (A) y Nifurtimox 1,0 mM (B) y el sistema generador de NADPH. La flecha sobre la recta indica la concentración de proteína microsómica elegida para realizar los experimentos siguientes. 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. rA: 0,9972 y rB 0,9996

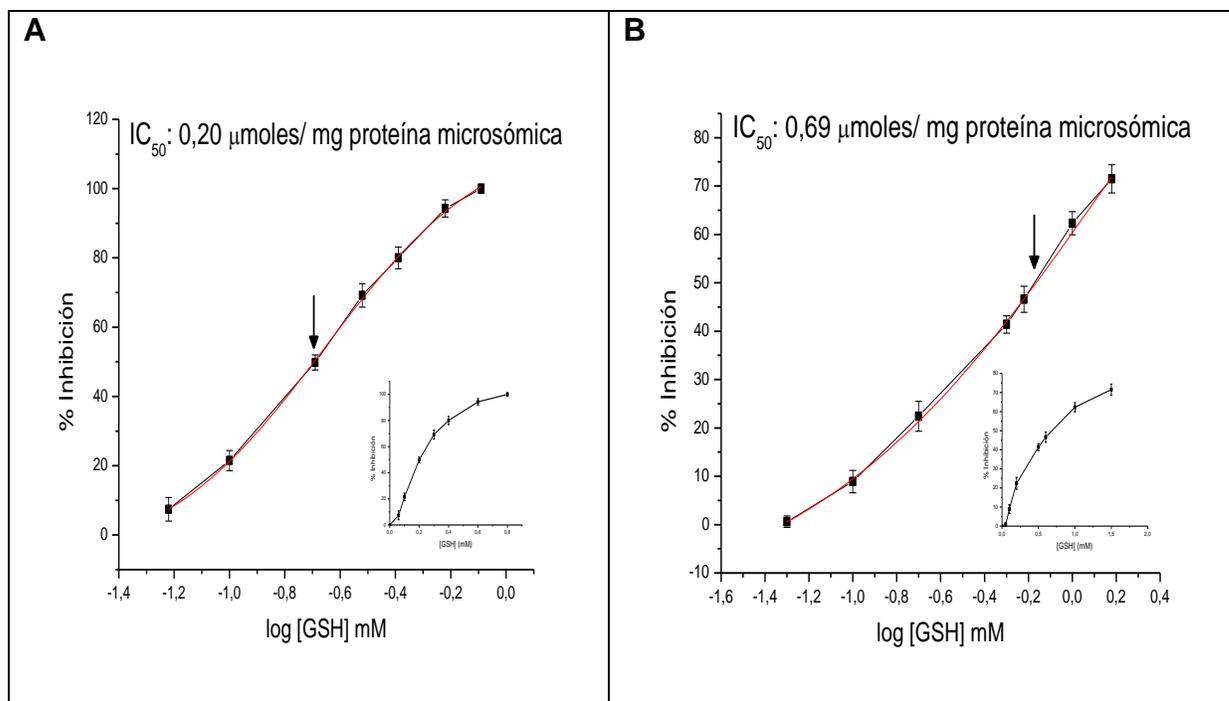


**Figura 3. Lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) a través del sistema citocromo P450. Efecto de la concentración de fármaco.** La proteína microsómica (1,0 mg/ mL) fue incubada a 37° C durante 30 minutos con Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) y el sistema generador de NADPH. La determinación de lipoperoxidación fue realizada de acuerdo a lo descrito en Métodos. La flecha sobre la recta indica la concentración de Nitrofurantoína y Nifurtimox elegida para realizar los experimentos siguientes. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar. r1A: 0,9935 y r2A: 0,9978; r1B: 0,9943 y r2B: 0,9998.

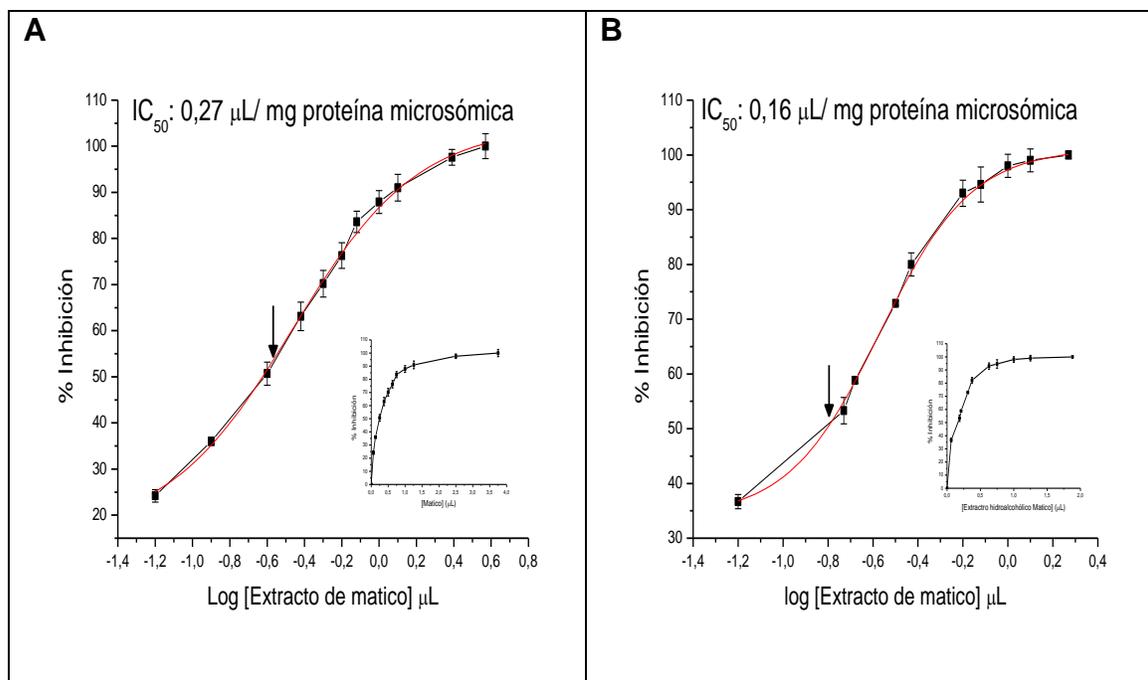
**Efecto de GSH y *Buddleja globosa* sobre la lipoperoxidación inducida por Nitrofurantoína y Nifurtimox.** Las condiciones en la linealidad seleccionadas para evaluar el efecto de GSH y de un extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* (matico) sobre la lipoperoxidación inducida por biotransformación de Nitrofurantoína y Nifurtimox fueron las siguientes: 30 minutos de incubación de la mezcla de reacción; 1,0 mg/ mL de proteína microsómica y 1,0 mM de Nitrofurantoína y Nifurtimox.

Las Figuras 4A y 4B representan los gráficos semilogarítmicos correspondientes al efecto del GSH sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación de Nitrofurantoína y Nifurtimox, respectivamente. En ellos están graficados los porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación inducida por el sistema oxidante vs el logaritmo de las diferentes concentraciones de GSH ensayadas. La incubación de los microsomas con GSH, previa a la adición del sistema generador de NADPH y Nitrofurantoína (Figura 4A) y Nifurtimox (Figura 4B) inhibió la lipoperoxidación microsómica de una forma concentración-respuesta. Los  $IC_{50}$ , concentración que inhibe la lipoperoxidación en un 50%, fueron calculados de estos gráficos; estos valores fueron 0,20 y 0,69  $\mu$ moles de GSH/ mg de proteína microsómica para Nitrofurantoína y Nifurtimox, respectivamente.

Las Figuras 5A y 5B muestran el efecto del extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por biotransformación de Nitrofurantoína y Nifurtimox, respectivamente. Estas figuras muestran los gráficos semilogarítmicos en los cuales se graficaron los porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación inducida por el sistema oxidante vs el logaritmo de diferentes concentraciones de *Buddleja globosa* (extracto hidroalcohólico), expresadas en  $\mu$ L del extracto/ mL de mezcla de reacción. La incubación de los microsomas con matico, previa a la adición del sistema generador de NADPH y los fármacos, inhibió la lipoperoxidación de una forma concentración-respuesta. Los  $IC_{50}$  calculados de estos gráficos fueron 0,27 y 0,16  $\mu$ L de extracto (37,6 y 22,3  $\mu$ g de droga vegetal respectivamente)/ mg de proteína microsómica para Nitrofurantoína y Nifurtimox, respectivamente.



**Figura 4. Liperoxidación microsómica inducida por metabolismo de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) a través del sistema citocromo P450. Efecto de GSH.** La proteína microsómica (1,0 mg/ mL) fue pre-incubada con GSH durante 10 minutos a 37° C antes de inducir la liperoxidación con Nitrofurantoína (1,0 mM) y con Nifurtimox (1,0 mM). La flecha indica el IC<sub>50</sub> obtenido. La determinación de liperoxidación fue realizada de acuerdo a lo descrito en Métodos. El gráfico inserto representa la curva obtenida de los datos experimentales directos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes ± su desviación estándar.

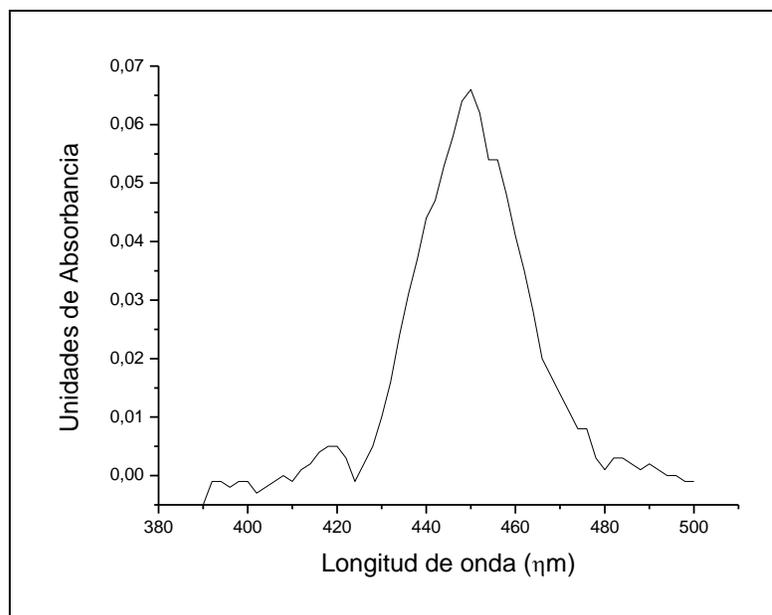


**Figura 5. Lipoperoxidación microsómica inducida por metabolismo de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) a través del sistema citocromo P450. Efecto de un extracto hidroalcohólico de matico.** La proteína microsómica (1,0 mg/ mL) fue preincubada con el extracto de matico durante 10 minutos a 37° C antes de inducir la lipoperoxidación con Nitrofurantoína (1,0 mM) y Nifurtimox (1,0 mM). La lipoperoxidación se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. El gráfico inserto representa la curva obtenida de los datos experimentales directos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar.

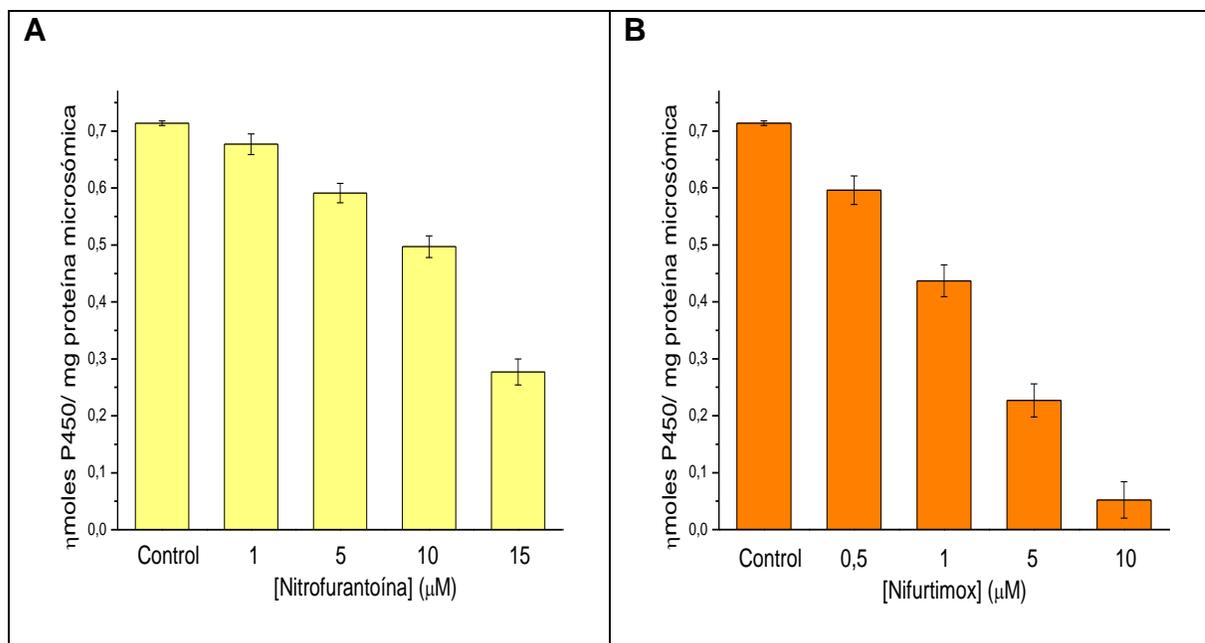
**Efecto de Nitrofurantoína y Nifurtimox sobre el contenido microsómico de la monooxigenasa citocromo P450.** La figura 6 muestra el espectro control de la monooxigenasa citocromo P450 determinado de acuerdo a lo descrito en Métodos. La absorbancia máxima de esta enzima disminuyó de una forma concentración respuesta al preincubar los microsomas con Nitrofurantoína y Nifurtimox, antes de adicionar el ditionito de sodio y formar el complejo monooxigenasa citocromo P450-CO. Los resultados se muestran en las figuras 7A y 7B, y están expresados como  $\eta$ moles de monooxigenasa citocromo P450/ mg de proteína microsómica vs la concentración de Nitrofurantoína (figura 7A) y Nifurtimox (figura 7B); los valores fueron calculados a partir de las absorbancia experimentales y el coeficiente de extinción molar descrito en Omura y Sato (1964); todos los valores fueron significativamente diferentes de sus controles respectivos ( $p < 0,05$ ). La mayor disminución fue provocada por Nifurtimox; así para obtener una disminución desde 0,7 a 0,4  $\eta$ moles de citocromo P450/ mg de proteína microsómica se necesitaron concentraciones de Nitrofurantoína y Nifurtimox de  $\sim 15 \mu\text{M}$  y  $\sim 4 \mu\text{M}$ , 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 estas interacciones, se repitió el experimento de la figura 7 en dos condiciones de ensayo: condición A: tanto Nitrofurantoína como Nifurtimox fueron incubados durante 5 min con la suspensión microsómica antes de adicionar el ditionito de sodio (reductor del hierro hemínico); condición B: la suspensión microsómica fue tratada previamente con ditionito de sodio, y luego incubada 5 min con cada uno de los fármacos en estudio. 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. Las concentraciones de Nitrofurantoína y Nifurtimox utilizadas en estos experimentos fueron  $15 \mu\text{M}$  y  $10 \mu\text{M}$ , respectivamente (concentraciones seleccionadas del experimento mostrado en la figura 7). Para ambos fármacos, la absorbancia máxima a  $450 \eta\text{m}$  de la monooxigenasa citocromo P450 fue menor en la condición A que en la condición B (figuras 8A y 8B). Como una forma de descartar la unión inespecífica de los fármacos a la membrana microsómica se repitió este experimento, pero ahora utilizando diversas concentraciones de Nitrofurantoína y Nifurtimox. A continuación se calcularon las

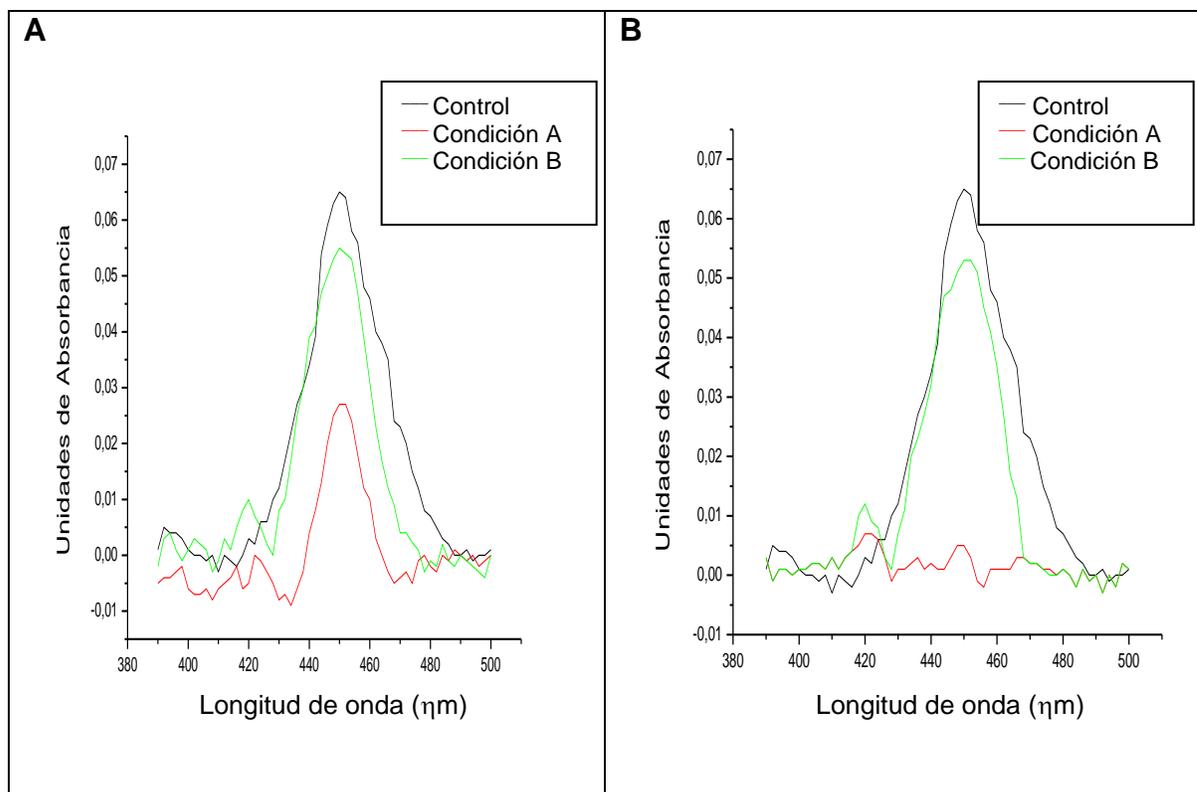
diferencias entre los  $\eta$ moles de enzima/ mg de proteína microsómica obtenidas en la condición B y la condición A. Los resultados aparecen en la Tabla 1. Ambos fármacos en la condición B disminuyeron significativamente los  $\eta$ moles de citocromo P450 en comparación a sus controles respectivos ( $p < 0,05$ ), a excepción de la concentración 1  $\mu$ M de Nitrofurantóina cuyo valor no varió significativamente respecto a su control ( $p > 0,05$ ).



**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 esta descrita en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar.



**Figura 7. Efecto de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) sobre el contenido de citocromo P450.** [Proteína microsómica]: 1,0 mg/ mL. Condiciones de ensayo: los microsomas fueron incubados ya sea con Nitrofurantoína o Nifurtimox durante 5 min antes de adicionar el ditionito de sodio y determinar el contenido de la monooxigenasa citocromo P450 de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar. Todos los valores de las muestras en presencia de los fármacos fueron significativamente diferentes respecto a su control ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8. Efecto de Nitrofurantoína (A) y Nifurtimox (B) sobre el espectro de absorbancia de la monooxigenasa citocromo P450 microsómica.** [Proteína microsómica]: 1,0 mg/ mL; [Nitrofurantoína]: 15  $\mu$ M; [Nifurtimox]: 10  $\mu$ M. Condiciones de ensayo: A) los microsomas fueron incubados ya sea con Nitrofurantoína o Nifurtimox durante 5 min antes de adicionar el ditionito de sodio y determinar la absorbancia máxima de la monooxigenasa citocromo P450 de acuerdo a lo descrito en Métodos; B) los microsomas tratados con ditionito de sodio fueron incubados ya sea con Nitrofurantoína o Nifurtimox durante 5 min y luego se determinó la absorbancia máxima de la monooxigenasa citocromo P450. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar.

	Condición A	Condición B	Disminución por unión a la monooxigenasa (B – A)
	Citocromo P450: nmoles/mg de proteína microsómica	Citocromo P450: nmoles/mg de proteína microsómica	
Control	0,714 ± 0,004	0,714 ± 0,004	-
<b>Nitrofurantoína</b>			
1 uM	0,677 ± 0,019	0,706 ± 0,016 *	0,029
5 uM	0,591 ± 0,020	0,670 ± 0,014	0,079
10 uM	0,497 ± 0,024	0,656 ± 0,014	0,159
15 uM	0,277 ± 0,021	0,607 ± 0,025	0,330
<b>Nifurtimox</b>			
0,5 uM	0,596 ± 0,020	0,647 ± 0,030	0,051
1 uM	0,437 ± 0,031	0,635 ± 0,025	0,198
5 uM	0,227 ± 0,032	0,608 ± 0,025	0,381
10 uM	0,052 ± 0,039	0,565 ± 0,024	0,513

**Tabla 1. Efecto de Nitrofurantoína y Nifurtimox sobre el contenido de la monooxigenasa citocromo P450.** Control: valor obtenido en ausencia de Nitrofurantoína y Nifurtimox. Condición A: microsomas incubados durante 5 min con los fármacos, antes de reducir la monooxigenasa citocromo P450 con ditionito de sodio. Condición B: microsomas reducidos con ditionito de sodio y luego incubados con los fármacos durante 5 min. La técnica utilizada está descrita en Métodos. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± su desviación estándar. \* Este valor no fue significativamente diferente respecto a su control ( $p > 0,05$ ).

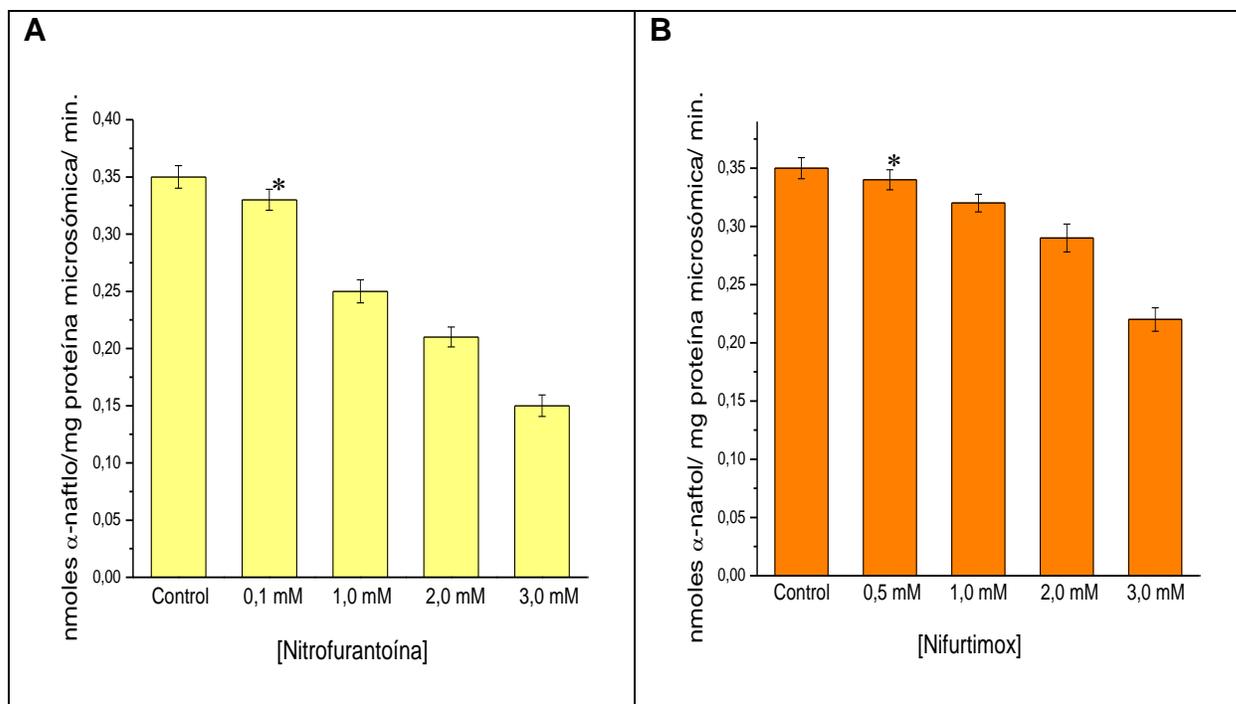
**Efecto de Nitrofurantoína y Nifurtimox sobre la Hidroxilación de Naftaleno.** Existe una enorme variedad de compuestos lipofílicos que son sustratos del sistema oxidativo del citocromo P450. Dada la amplia especificidad de sustratos que este sistema metaboliza, cuando dos o más sustratos se enfrentan al sistema, compiten entre sí por el mismo sitio activo de las isoformas de la monooxigenasa citocromo P450, que es la enzima que une a los xenobióticos en la primera etapa del mecanismo de reacción (Esquema 1). La hidroxilación de naftaleno es una reacción catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450 en la cual se forma como producto  $\alpha$ -naftol. Nitrofurantoína y Nifurtimox son fármacos lipofílicos, por lo tanto podrían ser metabolizados por este sistema e inhibir competitivamente la biotransformación de naftaleno cuando ellos son adicionados a la mezcla de reacción en conjunto.

Las Figuras 9A y 9B muestran el efecto de la concentración de Nitrofurantoína y Nifurtimox sobre la hidroxilación de naftaleno, respectivamente. Tanto Nitrofurantoína como Nifurtimox inhibieron esta reacción de una forma concentración-respuesta; sin embargo, las concentraciones 0,1 mM de Nitrofurantoína y 0,5 mM de Nifurtimox no afectaron en forma significativa sus valores controles ( $p > 0,05$ ). Los porcentajes máximos de inhibición observados para Nitrofurantoína y Nifurtimox fueron 57% y 35%, respectivamente; ellos se obtuvieron a la concentración 3 mM de cada uno de los fármacos que fue la máxima concentración ensayada.

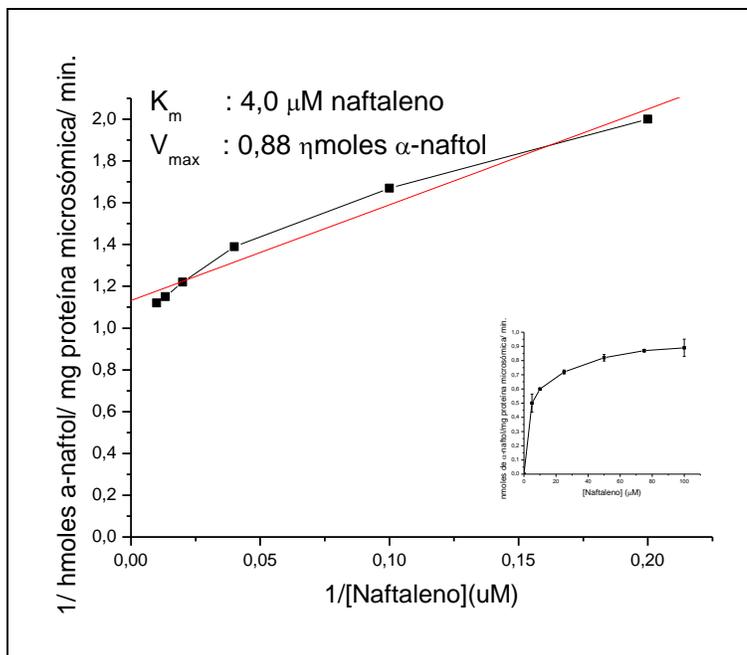
La Figura 10 muestra el gráfico de Lineweaver-Burk, correspondiente a la hidroxilación de naftaleno; en este tipo de gráficos (inversos de la velocidad vs los inversos de la concentración de sustrato), el intercepto del eje "Y" corresponde a  $1/V_{max}$  y el intercepto del eje "X", a  $-1/K_m$ . El gráfico inserto corresponde a la curva de progreso en la cual se encuentran graficados los valores de la velocidad expresada en  $\eta$ moles de  $\alpha$ -naftol formado/ min/ mg de proteína microsómica vs las concentraciones de naftaleno ensayadas. Las constantes cinéticas para la hidroxilación de naftaleno obtenidas del gráfico de Lineweaver-Burk fueron las siguientes:  $K_m$ , 4,0  $\mu$ M de naftaleno;  $V_{max}$ , 0,88  $\eta$ moles de  $\alpha$ -naftol/ min/ mg de proteína microsómica.

Como una forma de evaluar el tipo de inhibición sobre la hidroxilación de naftaleno, se determinaron las constantes  $K_m$  y  $V_{max}$  para esta reacción en presencia de Nitrofurantoína (Figura 11A) y Nifurtimox (Figura 11B). La presencia de Nitrofurantoína y Nifurtimox en la

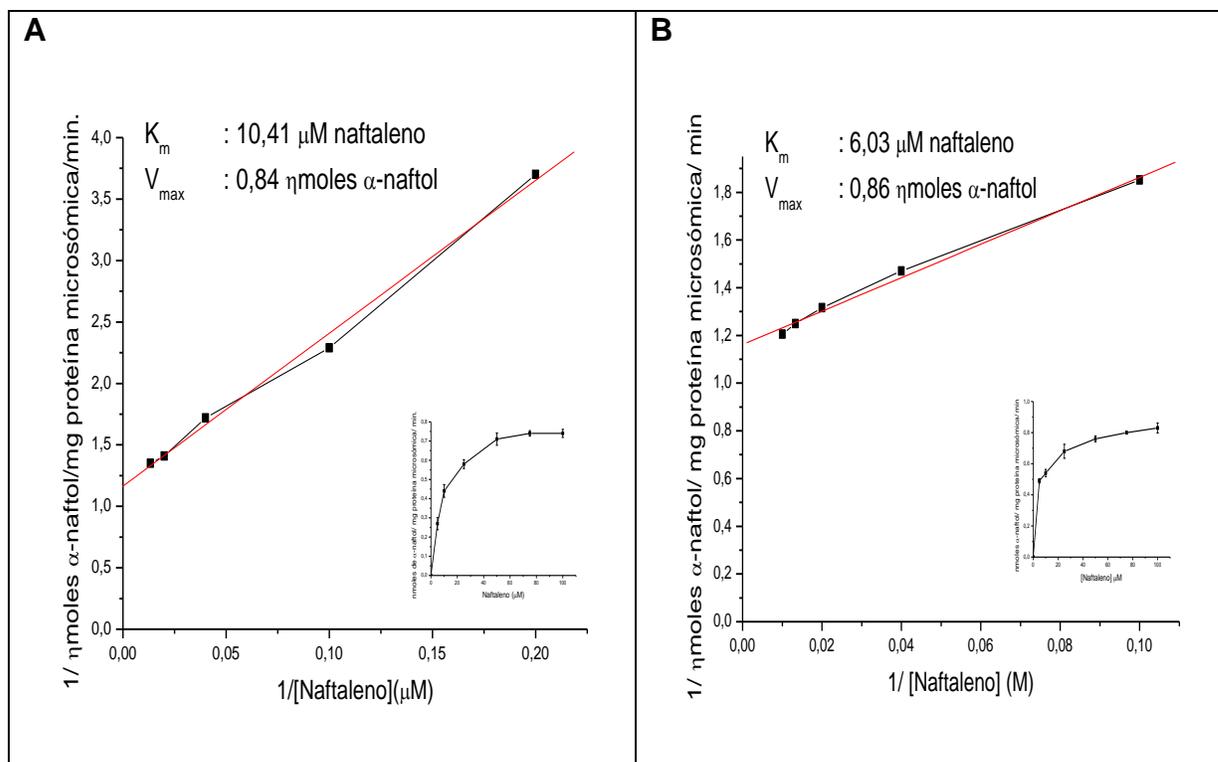
mezcla de reacción provocó un aumento estadísticamente significativo de la  $K_m$  ( $p < 0,05$ ) sin cambios significativos en la  $V_{max}$  ( $p > 0,05$ ). En estas condiciones los valores de  $K_m$  fueron  $10,41 \mu M$  y  $6,03 \mu M$  de naftaleno en presencia de Nitrofurantoína y Nifurtimox, respectivamente. Los valores de  $V_{max}$  en presencia de Nitrofurantoína y Nifurtimox fueron  $0,84$  y  $0,86 \eta moles$  de  $\alpha$ -naftol/ min/ mg de proteína microsómica de naftaleno, respectivamente, valores no significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).



**Figura 9. Efecto de Nitrofurantoina (A) y Nifurtimox (B) sobre la hidroxilación de naftaleno.** [Proteína microsómica]: 5,0 mg/ mL; [naftaleno]: 2,5 mM. La hidroxilación de naftaleno se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar. \* Este valor no fue significativamente diferente respecto a su control ( $p > 0,05$ ).



**Figura 10. Hidroxilación de naftaleno.  $K_m$  y  $V_{\text{max}}$ .** [Proteína microsómica]: 2,0 mg/ mL. La hidroxilación de naftaleno se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar.  $r$ : 0,98467



**Figura 11. Hidroxilación de naftaleno.  $K_m$  y  $V_{max}$  en presencia de Nitrofurantoina (A) y Nifurtimox (B).** [Proteína microsómica]: 2,0 mg/ mL. [Nitrofurantoina]: 3,0 mM [Nifurtimox]: 3,0 mM. La hidroxilación de naftaleno se determinó 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  $V_{max}$  no fueron significativamente diferentes del control ( $p > 0,05$ ). rA: 0.99734; rB: 0.99659.

## V. 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 de Nitrofurantoína y Nifurtimox (Rossi *et al.*, 1988; Letelier *et al.*, 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 de los hepatocitos. Letelier *et al.* (2004) demostraron que microsomas hepáticos de rata en presencia de NADPH y de Nitrofurantoína o 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. 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 que une los sustratos lipofílicos a oxidar por el sistema del citocromo P450. 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 *et al.*, 1981).

Estos antecedentes nos llevaron a evaluar 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 vs la lipoperoxidación microsómica inducida en condiciones de biotransformación, mostraron un fenómeno bifásico dependiente de la concentración de estos fármacos. Así, a concentraciones  $\mu\text{M}$  de Nitrofurantoína y Nifurtimox la lipoperoxidación microsómica disminuyó a una velocidad 20 y 10 veces mayor respectivamente, que a concentraciones mM (figuras 3A y 3B).

Estos resultados muestran que probablemente Nitrofurantoína como Nifurtimox podrían estar siendo derivados a algún otro proceso de biotransformación microsómica, más allá de la nitrorreducción que ellos sufren. Uno de estos procesos podría ser su biotransformación oxidativa por el sistema del citocromo P450. Sin embargo, el cambio tan brusco de la pendiente desde concentraciones  $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$ , 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; Hayes *et al.*, 2005). Más aún, esta enzima se activa frente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Aniya y Naito, 1993). Así, probablemente, los lipoperóxidos acumulados por la oxidación de los lípidos podrían estar siendo reducidos por la GSH-transferasa; esto impediría la formación de malondialdehído que es el producto de la lipoperoxidación que medimos en nuestros experimentos y podría explicar el cambio brusco de pendiente observado en la lipoperoxidación al aumentar la concentración de los fármacos desde concentraciones  $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$  (figuras 3A y 3B).

Cabe señalar que el estrés oxidativo inducido por la biotransformación de Nitrofurantoína y Nifurtimox es provocado por la nitrorreducción de estos compuestos, reacción que es catalizada por la 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. Dado que tanto Nitrofurantoína como Nifurtimox son sustratos altamente lipofílicos, en estas condiciones su interacción con la monooxigenasa es probable. Nuestros resultados mostraron que ambos fármacos se unen a la monooxigenasa citocromo P450 de una forma concentración-respuesta (figuras 7A y 7B; Tabla 1), ensayo determinado evaluando los cambios en la absorbancia máxima de la monooxigenasa citocromo P450 por interacción con sus sustratos (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 *et al.*, 1987). Cabe recordar que 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  $\text{Fe}^{3+}$ ; por lo tanto, la presencia de dos o más sustratos provoca la competencia por la unión a la monooxigenasa citocromo P450 para formar el complejo binario e iniciar así su

biotransformación oxidativa. Al respecto, la hidroxilación de naftaleno, reconocida reacción catalizada por el sistema oxidativo citocromo P450 fue inhibida por Nitrofurantoína y Nifurtimox (figuras 9A y 9B). Sin embargo, la biotransformación reductiva de Nitrofurantoína y Nifurtimox indujo lipoperoxidación microsómica (figuras 1, 2 y 3), fenómeno que puede inhibir la actividad del sistema oxidativo del citocromo P450. Este último proceso requiere ser confirmado y para ello estamos realizando: a) experimentos que demuestren 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.

Resumiendo nuestros resultados podemos decir que Nitrofurantoína y Nifurtimox se metabolizarían no sólo por nitrorreducción sino también, por oxidación a través del sistema oxidativo del citocromo P450; ambos fenómenos sucederían en forma competitiva y simultánea. Por otra parte, la lipoperoxidación fue inhibida por la presencia de GSH y un extracto hidroalcohólico de *Buddleja globosa* o matico 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.

## VI. CONCLUSIONES

- Tanto Nitrofurantoína como Nifurtimox indujeron lipoperoxidación microsómica por nitrorreducción en las mismas condiciones que el sistema citocromo P450 induce oxidación de xenobióticos. Este proceso fue inhibido por GSH y un extracto hidroalcohólico de matico enriquecido en polifenoles, compuestos de reconocida actividad antioxidante.
- Nitrofurantoína y Nifurtimox se unieron a la monooxigenasa citocromo P450 e inhibieron competitivamente la hidroxilación de naftaleno, reacción catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450; estos resultados indican que estos fármacos podrían ser oxidados por este sistema biotransformante, generando metabolitos excretables.
- Ambos procesos, la nitrorreducción y la oxidación de Nitrofurantoína como Nifurtimox ocurrirían en forma simultánea y competitiva.

## VII. PROYECCIONES DEL TRABAJO

La evaluación de una terapia asociada que involucre a estos fármacos nitrofuranos y antioxidantes especialmente polifenólicos sería aconsejable; ello permitiría disminuir los efectos adversos descritos para Nitrofurantoína y Nifurtimox. Este estudio se podría extender a otros fármacos que inducen estrés oxidativo por biotransformación y que poseen un alto riesgo de generar efectos tóxicos muchas veces irreversibles (Ej.: quimioterapia anticancerígena).

## VIII. REFERENCIAS

1. **AL'TERMAN, M.J.; MAREKUSHEV, S.A.; LEVCHENKO, L.A.; RAEVSKKI, A.V.; DEVICHENSKII, V.M.** 1981. Cytochrome P450 distribution in endoplasmic reticulum membranes of rat liver. *Biokhimiia*. **46(2)**: 222-229
2. **ALBERT, K.S.; SEDMAN, A.J.; WILKINSON, P.; STOLL, R.G.; MURRAY, W.J.; WAGNER, J.G.** 1974. Bioavailability studies of acetaminophen and nitrofurantoin. *J. Clin. Pharmacol.* **14(5-6)**: 264-270.
3. **ANIYA, Y.; NAITO, A.** 1993. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **45(1)**: 37-42.
4. **AZANZA, J.R.; SÁDABA, D.; MEDIAVILLA, A.** 1997. Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. Nitrofurantoína. **In:** Flórez J. (Editor). *Farmacología Humana*. 3ª Edición. Masson S.A. Barcelona, España. pp. 1145-1157.
5. **BOOTH, J.; BOYLAND, E.** 1964. The biochemistry of aromatic amines. Enzymic N-hydroxylation of arylamines and conversion of arylhydroxylamines into O-aminophenols. *Biochem. J.* **91(2)**: 362-369.
6. **COON, M.J.; PERSON, A.V.; FRENCH, J.S.** 1980. 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.
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. L.; O'REILLY, M.** 2002. Recurrent urinary tract infection in the female. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **14(5)**: 537-543.

9. **FLÓREZ, J.** 1997. Fármacos Antiparasitarios I. Protozoos. **In:** Flórez J. (Editor). Farmacología Humana. 3ª Edición. Masson S.A. Barcelona, España. pp. 1221-1237.
10. **GUENGERICH, F.P.; SHIMADA, T.; IWASAKI, M.; MARTIN, M.V.** 1990. Activation of mutagens by human cytochrome P-450 enzymes. Prog. Clin. Biol. Res. **340B**: 87-96.
11. **HALPERT, J.R.; BALFOUR, C.; MILLER, N.E.; KAMINSKY, L.S.** 1986. Dichloromethyl compounds as mechanism-based inactivators of rat liver cytochromes P-450 in vitro. Mol. Pharmacol. **30(1)**: 19-24.
12. **HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R.** 2005. Glutathione transferases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **45**: 51-88.
13. **JAESCHKE H.** 1995. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **209(2)**: 104-11.
14. **KARUZINA, I.I.; ARCHAKOV, A.I.** 1994. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P450 during monooxygenasa reactions. Free Radical Biol. Med. **17(6)**: 557-567.
15. **KASPER, C.B.; HENTON, D.** 1980. Glucuronidation. **In:** Jacoby W.B. (Ed.). Enzymatic Basis of Detoxication. Academic Press. New York, USA. pp. 4-36.
16. **LETELIER, M.E.; IZQUIERDO, P.; GODOY, L.; LEPE, A.M.; FAÚNDEZ, M.** 2004. Liver microsomal biotransformation of nitro-aryl drugs: A mechanism for potencial oxidative stress induction. J. Appl. Toxicol. **24(6)**: 519-525.
17. **LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193(1)**: 265-275.

- 18. MORENO, S.N.; MASON, R.P.; DOCAMPO, R.** 1984. Reduction of nifurtimox and nitrofurantoin to free radical metabolites by rat liver mitochondria. Evidence of an outer membrane-located nitroreductase. *J. Biol. Chem.* **259(10)**: 6298-305.
- 19. MOSIALOU, E.; 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.
- 20. NEBERT, D.W.; NELSON, D.R.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; FEYEREISEN, R.; FUJII-KURIYAMA, Y.; GONZÁLEZ, F.J.; GUENGERICH, F.P.; GUNSALUS, I.C.; JOHNSON, E.F.** 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* **10(1)**: 1-14.
- 21. NEUZIL, J.; GEBICKI, J.M.; STOCKER, R.** 1993. Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochem. J.* **293**: 601-606.
- 22. OMURA, T.; SATO, R.** 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**: 2370-2378.
- 23. RIDDICK, D.S.** 1997. General principles of pharmacology. **In:** Kallant H.; Roschlau W. (Eds.). *Principles of Medical Pharmacology*. 6<sup>a</sup> ed. Oxford University Press. New York, USA. pp. 38-54.
- 24. ROSSI, L.; SILVA, J.M.; Mc GIRR, L.G.; O'BRIEN, P.J.** 1988. Nitrofurantoin-mediated oxidative stress cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **37(16)**: 3109-3117.

- 25. SUNTRES, Z.E.; SHEK, P.N.** 1992. Nitrofurantoin-induced pulmonary toxicity. In vivo evidence for oxidative stress-mediated mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* **43(5)**:1127-1135.
- 26. TINEL, M.; BELGHITI, J.; DESCATOIRE, V.; AMOUYAL, G.; LETTERON, P.; GENEVE, J.; LARREY, D.; PESSAYRE, D.** 1987. Inactivation of human liver cytochrome P450 by the drug methoxsalen and other psoralen derivatives. *Biochem. Pharmacol.* **36(6)**: 951-955.
- 27. VILLAR DEL FRESNO, A.; BERMEJO, P.; MARTÍN-ARAGÓN, S.** 2004. Aspectos farmacológicos del citocromo P450. In: Cascales M., Gómez M.J. (Eds.). Monografías N° XV: Citocromo P450. Real Academia Nacional de Farmacia. España. pp. 361-386.
- 28. WALLACE, S.S.** 1988. AP Endonucleases and DNA glycosylases that recognize oxidative DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* **12**: 431-477.
- 29. WOLFF, S.P.; GARNER, A.; DEAN, R. T.** 1986. Free radicals, lipids and protein degradation. *T.I.B.S.* **11**: 27-31.