



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

**EFFECTO DE UN EXTRACTO SECO DE MATICO (BG126) SOBRE
EL DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO POR BIORREDUCCIÓN
DE NITROFURANTOÍNA**

Patrocinante

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

Director de Memoria

Prof. María Eugenia Letelier M.

Co-Director de Memoria

Dra. Paula Aracena Stiven
Laboratorio de Farmacología y
Toxicología
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Memoria de Título para optar al Título de Químico Farmacéutico

CARLOS ENRIQUE LAZO HERNÁNDEZ

Santiago de Chile

2010

Esta investigación va dedicada con especial cariño a todas las personas que han estado a lo largo de toda mi formación tanto profesional como personal, en especial a mis padres, ya que sin ellos no hubiese tenido la fuerza para haber llegado hasta donde hoy en día me encuentro.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo quiero agradecerlo de de todo corazón a mis padres, mis familiares, la profesora María Eugenia Letelier, la profesora Paula Aracena Stiven y a todas las personas del laboratorio de Farmacología y Toxicología ya que con ellos aprendí que el trabajo en equipo es posible.

Por otra parte, quiero agradecer al proyecto FONDECYT N° 11090150 otorgado a la profesora Paula Aracena Stiven, que ayudó económicamente al desarrollo de esta memoria de Título, y a Laboratorios Ximena Polanco que donó el extracto seco estandarizado de BG126.

ABREVIATURAS

ITU	: Infección del tracto urinario bajo.
SOD	: Superóxido dismutasa.
GSH	: Glutación reducido.
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i> (Especies Reactivas del Oxígeno)
TBA	: <i>Thiobarbituric acid</i> (Ácido tiobarbitúrico)
MDA	: Malondialdehído.
VCM	: Volumen Corpuscular Medio.
HCM	: Hemoglobina Corpuscular Media.
CHCM	: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media.
VHS	: Velocidad de hemo-sedimentación,
GOT	: Transaminasa Glutámico-Oxaloacética.
FA	: Fosfatasa Alcalina.
LDH	: Lactato deshidrogenasa.
FRAP	: <i>Ferric Reducing Ability of Plasma</i> (Capacidad Plasmática Reductora de Hierro).
NUS	: Nitrógeno Ureico Sanguíneo.
NTF	: Nitrofurantoína.
NTF (1X)	: Nitrofurantoína en dosis oral, 200 mg diarios.
NTF (2X)	: Nitrofurantoína en dosis 2 veces mayor que la dosis 1X.
BG126 (1X)	: BG126 en la dosis oral 1 (Ver Materiales y Métodos).
BG126 (1XP)	: BG126 en dosis 1, administrado en profilaxis de 3 días.
BG126 (10X)	: BG126 en dosis 10 veces mayor que la dosis 1X.

CONTENIDO

Portada	Pág. i
Dedicatoria	Pág. ii
Agradecimientos	Pág. iii
Abreviaturas	Pág. iv
Contenido	Pág. v
Índice de Figuras	Pág. vii
Índice de Tablas	Pág. viii
Resumen	Pág. ix
Abstract	Pág. x
I. INTRODUCCIÓN	Pág. 1
Hipótesis	Pág. 5
Objetivos	Pág. 5
1. Objetivo General.....	Pág. 5
2. Objetivos Específicos.....	Pág. 5
II. MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 7
Reactivos	Pág. 6
Animales de experimentación	Pág. 7
Métodos	Pág. 7
A. <i>In vivo</i>	Pág. 7
Cálculo de dosis de nitrofurantoína y BG126.....	Pág. 8
Diseño Experimental.....	Pág. 8
Eutanasia y procesamiento de muestras.....	Pág. 9
Hemograma.....	Pág. 9
Perfil Bioquímico.....	Pág. 9
Capacidad Antioxidante Plasmática.....	Pág. 9

B. <i>In vitro</i>	Pág. 10
Preparación de microsomas hepáticos de rata.....	Pág. 10
Lipoperoxidación microsómica.....	Pág. 10
Determinación de tioles microsómicos totales.....	Pág. 10
Análisis Estadístico de los Resultados	Pág. 11
III. RESULTADOS	Pág. 12
Experimentos <i>in vivo</i>	Pág. 12
Perfil Bioquímico.....	Pág. 12
Hemograma.....	Pág. 21
Capacidad Plasmática Reductora de Hierro.....	Pág. 27
Experimentos <i>in vitro</i>	Pág. 30
Efecto de BG126 y GSH sobre la lipoperoxidación microsómica.....	Pág. 30
Protección de los tioles microsómicos por BG126 y GSH.....	Pág. 31
IV. DISCUSIÓN	Pág. 32
V. CONCLUSIONES	Pág. 37
VI. REFERENCIAS	Pág. 39

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Título de la Figura</i>	<i>Página</i>
1	Estructura Escutelarena	4
2	Actividad LDH sérica en ratas tratadas con nitrofurantoína en combinación con BG126	14
3	Actividad GOT sérica en ratas tratadas con nitrofurantoína en combinación con BG126	16
4	Glucosa sérica en ratas tratadas con nitrofurantoína en combinación con BG126	18
5	Colesterol sérico en ratas tratadas con nitrofurantoína en combinación con BG126	20
6	Número de Leucocitos en ratas tratadas con nitrofurantoína en combinación con BG126	23
7	Fórmula Leucocitaria en ratas tratadas con nitrofurantoína en combinación con BG126	26
8	FRAP en ratas tratadas con nitrofurantoína en combinación con BG126	29

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla</i>	<i>Título de la Tabla</i>	<i>Página</i>
1	Protocolo de tratamiento de los animales	8
2	Distribución Normal de Grupos Control para Perfil Bioquímico	12
3	Distribución Normal de Grupos Control para Hemograma	21
4	Diferencias en el número de leucocitos ($10^3/\text{mL}$) entre los distintos tratamientos	24
5	Distribución Normal de Grupos Control para Capacidad Plasmática Reductora de Hierro	27
6	Lipoperoxidación microsómica	30
7	Determinación de tioles microsómicos totales	31

RESUMEN

La nitrofurantoína es el antimicrobiano de elección para el tratamiento de infecciones del tracto urinario bajo en Chile, debido a su alta eficacia y bajo desarrollo de resistencia. Sin embargo, el tratamiento oral con este fármaco provoca efectos adversos, principalmente gastrointestinales, los que conllevan al abandono del tratamiento por un porcentaje significativo de los pacientes. Este fármaco es nitrorreducido en una reacción catalizada por reductasas, generando especies reactivas del oxígeno, lo que conduce a estrés oxidativo. Por lo tanto, se postula que los efectos adversos gastrointestinales provocados por nitrofurantoína, podrían ser la consecuencia de este estrés oxidativo. Asimismo, se postula que la coadministración de nitrofurantoína y el preparado herbal BG126, extracto seco estandarizado de hojas de *Buddleja globosa* Hope (matico), podría minimizar los efectos adversos producidos por nitrofurantoína.

Los resultados obtenidos indican que la administración oral de nitrofurantoína en ratas machos Sprague Dawley, produce daño gastrointestinal observado macroscópicamente y a través de cambios de los parámetros del perfil bioquímico y el hemograma. Estos parámetros fueron normalizados a los valores control por la coadministración de nitrofurantoína y BG126. Más aún, esta combinación también normalizó las alteraciones de la capacidad antioxidante plasmática (FRAP) producidas por el tratamiento oral con nitrofurantoína. Además, BG126 inhibió la lipoperoxidación y la oxidación de los tioles microsómicos hepáticos de estas ratas, producidas por nitrofurantoína en condiciones de nitrorreducción.

Los resultados obtenidos demuestran que los efectos adversos producidos por la administración oral de nitrofurantoína se deben, al menos en parte, a la generación de estrés oxidativo a través de su nitrorreducción. Dado que BG126 es un extracto de matico, planta de reconocida actividad antioxidante, la coadministración con nitrofurantoína podría ser una buena estrategia para disminuir los efectos adversos producidos por este fármaco y evitar así, el abandono de la terapia.

ABSTRACT

Nitrofurantoin is the antibacterial of choice for the treatment of lower urinary tract infections in Chile, due to its high efficacy and the low development of bacterial resistance. Oral treatment with this drug, however, leads to adverse effects, mainly gastrointestinal, which result in the abandonment of treatment by a significant percentage of patients. This drug is nitroreduced in a reaction catalyzed by reductases, generating reactive oxygen species and leading to oxidative stress. Therefore, we postulated that the gastrointestinal adverse effects produced by nitrofurantoin may be the consequence of this oxidative stress. Also, we hypothesized that co-administration of nitrofurantoin and the herbal preparation BG126, standardized dry extract from *Buddleja globosa* Hope leaves (*matico*), may minimize the adverse effects produced by nitrofurantoin.

Our results indicate that the oral administration of nitrofurantoin in male Sprague Dawley rats produces gastrointestinal damage, which was observed macroscopically and through changes in clinical chemistry and hemogram parameters. These parameters were normalized to control values by co-administration of nitrofurantoin and BG126. Moreover, this combination also normalized the changes in plasma antioxidant capacity (FRAP) produced by oral treatment with nitrofurantoin. In addition, BG126 inhibited rat liver microsomal lipid peroxidation and thiol oxidation elicited by nitrofurantoin under conditions leading to its nitroreduction.

Data presented show that the adverse effects produced by oral administration of nitrofurantoin are due, at least in part, to the generation of oxidative stress through its nitroreduction. Since BG126 is a *matico* extract, which has a widely acknowledged antioxidant activity, its co-administration with nitrofurantoin may be a good strategy to decrease the adverse effects elicited by this drug and, therefore, prevent therapy abandonment.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario bajo (ITU) son especialmente frecuentes en mujeres, con una incidencia anual del 15% y 21% en las edades de 15-39 y 40-79 años respectivamente¹. Estudios realizados en mujeres chilenas han determinado su presencia en 1% de las niñas escolares entre los 5 y 14 años de edad; después de iniciada la actividad sexual, la incidencia sube a 4% en la mujer adulta joven y, posteriormente, aumenta entre 1 y 2% por cada década de vida². En todo el mundo, los agentes patógenos más frecuentes de la ITU son similares: *Escherichia coli*, 80% a 90%; *Staphylococcus saprophyticus*, 5% a 10%; *Proteus* spp. y otros bacilos Gram negativos representan el porcentaje de patógenos restantes^{3,4}. La mayoría de los agentes patógenos son bacterias intestinales que colonizan primero el perineo y luego ascienden a través de la uretra para infectar la mucosa vesical. La infección provoca síntomas específicos, principalmente la triada de disuria (micción dolorosa), tenesmo (necesidad urgente de micción) y poliaquiuria (micción muy frecuente)³.

Uno de los antimicrobianos más utilizados en Chile en el tratamiento de la ITU es la nitrofurantoína. Esto se debe a su alta efectividad y bajo desarrollo de resistencia frente a *Escherichia coli*, a pesar de su utilización prolongada y a su uso profiláctico en esquemas de larga duración (varios meses)⁵. En general, los patógenos causantes de la ITU en Chile, en los últimos 10 años, no han experimentado una diferencia estadísticamente significativa en sus sensibilidades a nitrofurantoína, con una resistencia de sólo un 5,7%⁵. Más aún, la nitrofurantoína es un derivado del nitrofurano, que ha mostrado eficacia equivalente al ciprofloxacino (*Gold standard*) en ITU no complicada⁶. Estos antecedentes son los que han mantenido a la nitrofurantoína como una excelente alternativa terapéutica⁵.

La incidencia estimada de los efectos adversos de la nitrofurantoína es muy variada. (alrededor del 10%)⁴. Los efectos adversos más frecuentes observados tras la administración oral de nitrofurantoína están relacionados con el aparato digestivo e incluyen náuseas, vómitos y anorexia; con menor frecuencia, se produce dolor abdominal y diarrea. Estos efectos son dosis-dependientes y disminuyen al administrar nitrofurantoína en forma de macrocristales o junto con la comida^{4, 7-10}. Por otra parte, el

uso prolongado de nitrofurantoína se ha asociado con fibrosis pulmonar¹¹, daño hepático¹², polineuropatía periférica¹³ y desórdenes hematológicos¹⁴. Las reacciones pulmonares graves tienen una incidencia de aproximadamente 0,001%, y las reacciones neurológicas, 0,0007%⁴. Los efectos adversos neurológicos incluyen cefalea, somnolencia, vértigo, mareo, nistagmo (movimientos rítmicos involuntarios de los ojos) e hipertensión intracraneal⁴. Se ha descrito polineuritis periférica grave, y algunas veces irreversible, particularmente en pacientes con insuficiencia renal y en tratamientos prolongados⁴. Los efectos adversos hematológicos observados son: anemia megaloblástica, leucopenia, granulopenia o agranulocitosis, trombopenia, anemia aplásica y anemia hemolítica en personas con deficiencias genéticas de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa¹⁴. Se han descrito también casos de alopecia transitoria⁴.

Los efectos adversos a nivel pulmonar y hepático han sido atribuidos a los intermediarios reactivos generados por la nitrorreducción de la nitrofurantoína¹⁵⁻¹⁶; sin embargo, es poco frecuente que se desarrolle hepatotoxicidad, incluida la ictericia colestásica y la hepatitis, sobre todo en mujeres.

El mecanismo de acción bactericida de la nitrofurantoína es poco conocido, pero se cree que este fármaco actuaría inhibiendo diversos mecanismos enzimáticos bacterianos, entre ellos, la síntesis de proteína por unión a los ribosomas de las bacterias¹⁷⁻¹⁸.

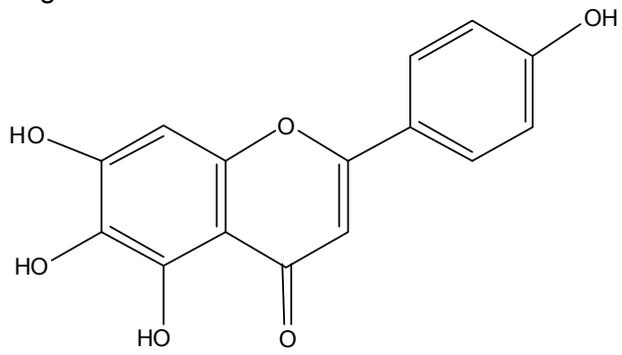
Estudios *in vitro* han demostrado que la nitrofurantoína se nitrorreduce enzimáticamente, reacción catalizada por diversas nitrorreductasas que incluyen aquellas presentes en el huésped y las bacterias. En células de mamífero, se ha descrito que la citocromo P450 (CYP450) reductasa, enzima que forma parte del sistema oxidativo CYP450, está involucrada en la nitrorreducción de la nitrofurantoína¹⁹⁻²¹. La nitrorreducción involucra la transferencia de un electrón desde dadores tales como el NADPH, generando un nitro-anión radical ($-\text{NO}_2^{\cdot-}$) el cual es capaz de reciclar con el oxígeno molecular. Este reciclaje redox produce anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y se regenera la nitrofurantoína. A su vez, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede dismutar espontáneamente o en una reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 , en presencia de metales redox activos tales

como el hierro y el cobre, produce radicales hidroxilos (HO[•])²². Todas estas especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden provocar la oxidación de biomoléculas, tales como lípidos de membrana, proteínas²³ y DNA²⁴. La oxidación de los lípidos celulares, especialmente de membranas, genera lipoperóxidos, lo cual puede provocar la muerte celular²⁵. Existen evidencias que involucran a la concentración de GSH, principal antioxidante no enzimático celular, en el control del estrés oxidativo²⁵⁻²⁶. Por otra parte, existe un amplio reconocimiento acerca de la capacidad antioxidante de diversos preparados naturales, especialmente de aquellos enriquecidos en polifenoles. Así, diversos preparados naturales se utilizan en patologías asociadas a estrés oxidativo, como son las enfermedades cardiovasculares²⁷⁻²⁸.

Los antecedentes presentados sugieren que el estrés oxidativo inducido por la nitrorreducción de nitrofurantoína podría ser una de las causas de las reacciones adversas o tóxicas generadas por el tratamiento prolongado con este fármaco. Es por ello que proponemos el uso de nitrofurantoína asociado a un extracto seco estandarizado de hojas de *Buddleja globosa* Hope (matico), BG126, como una alternativa para controlar los efectos adversos gastrointestinales provocados por la administración oral de nitrofurantoína.

El matico es una planta nativa chilena de reconocida actividad antioxidante, antiinflamatoria y cicatrizante de heridas superficiales²⁹⁻³¹. La parte de esta planta utilizada para el tratamiento de úlceras gástricas y heridas de la piel, generalmente son las hojas del matico³²⁻³³. La acción local de los preparados de matico permite postular que la administración oral de nitrofurantoína asociada a BG126, permitiría prevenir los efectos adversos derivados de la administración oral de nitrofurantoína, los cuales podrían estar asociados al estrés oxidativo generado por su nitrorreducción. En el matico se encuentran principios activos de tipo polifenólico, entre ellos, flavonoides los cuales tienen reconocida actividad antioxidante³⁴⁻³⁵. Uno de estos flavonoides es la escutelarena³³ cuya estructura se muestra en la figura 1.

Figura 1. Estructura esculatera.



HIPÓTESIS

“BG126 inhibe el daño oxidativo de biomoléculas causado por la nitrorreducción de nitrofurantoína in vivo e in vitro”.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de BG126 de prevenir el daño a microsomas hepáticos y el daño sobre el epitelio gastrointestinal, ambos derivados de la administración oral de nitrofurantoína, la cual genera estrés oxidativo por nitrorreducción enzimática.

2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

In vivo

- Determinar la concentración de polifenoles totales del preparado BG126.
- Evaluar la actividad antioxidante plasmática de ratas Sprague Dawley, machos adultos jóvenes, después de la administración oral de nitrofurantoína sola y coadministrada con BG126 durante 4 días. Para ello se determinarán la capacidad antioxidante plasmática de los animales mediante la técnica FRAP, la cual mide la capacidad plasmática reductora de hierro.
- Evaluar los cambios en los parámetros del Perfil bioquímico de los animales después de la administración oral de nitrofurantoína sola y coadministrada con BG126 durante 4 días.
- Evaluar los cambios en los parámetros del Hemograma de los animales después de la administración oral de nitrofurantoína sola y coadministrada con BG126 durante 4 días.

In vitro

- Determinar la lipoperoxidación inducida por el metabolismo reductivo de la nitrofurantoína en microsomas hepáticos de ratas Sprague Dawley, en presencia y ausencia de BG126.
- Determinar la oxidación de los tioles microsómicos inducido por el metabolismo reductivo de la nitrofurantoína en microsomas hepáticos de ratas Sprague Dawley en presencia y ausencia de. BG126.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. El extracto seco de matico estandarizado (BG126) fue donado por Laboratorios Ximena Polanco (Santiago, Chile). El ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), la albúmina sérica de bovino (Fracción IV), la glucosa-6-fosfato (G-6-P), la catequina, la G-6-P deshidrogenasa, el β -NADP y la nitrofurantoina, fueron obtenidos en Sigma Chemical Co (EE.UU.). El ácido tricloroacético (TCA), el ácido tiobarbitúrico (TBA), el CuSO_4 y el reactivo de Folin-Ciocalteu's fueron adquiridos en Merck (Chile). El resto de los reactivos fue del mejor grado disponible (*p.a.*).

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

Métodos

A. *In vivo*

Como una forma de estandarizar el preparado BG126 (serie 85299), se controló previamente su concentración de polifenoles totales de acuerdo el método descrito por Letelier *et al.* (2007)³⁶. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 mL: 50 μ L de BG126, 250 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu's, 750 μ L de carbonato de sodio 20% P/V y agua destilada suficiente para completar el volumen final de 2mL. El blanco contenía todos los reactivos a excepción del extracto herbal. Las mezclas, muestras y blancos, fueron incubadas por 2 horas, protegidas de la luz. Al final de este periodo se midió la absorbancia de las muestras a 760nm en un espectrofotómetro Unicam UV-VIS modelo UV3, usando sus respectivos blancos como referencia. La catequina, un compuesto polifenólico, fue usada como estándar de referencia. El extracto contenía 0,06 mg-eq de catequina/mg extracto. Esta serie de BG126 fue utilizada en todo el estudio.

Cálculo de dosis de nitrofurantoína y BG126. La dosis de nitrofurantoína fue calculada a partir de la dosis utilizada en humanos, 200mg diarios distribuidos 2 veces al día y considerando la capacidad metabólica de las ratas que es 4 veces superior a la de humanos. Así, la dosis diaria administrada a los animales fue 2,9mg (1X) suspendidos en 0,2mL de agua (11,43mg/kg/día). Para el cálculo de la dosis de BG126, se tomó como referencia la dosis utilizada en ratas Sprague Dawley en un estudio de cicatrización de heridas de la piel realizado en el Laboratorio (datos no publicados). Esta dosis (1X) correspondió a 3mg BG126/rata cada 12 horas, administrados por vía oral (*gavage*) y suspendido en 0,2mL de agua (24mg-ext/kg/día).

Diseño Experimental. Los animales fueron distribuidos en 8 grupos experimentales, de acuerdo a la tabla 1. **Grupo control:** los animales recibieron cantidades equivalentes de agua, vehículo en el cual se suspendieron la nitrofurantoína y el BG126. **Grupo BG126 1X:** los animales recibieron BG126 en dosis 1X. **Grupo BG126 10X:** los animales recibieron BG126 en dosis 10 veces superior a la 1X. **Grupo NTF 1X:** los animales recibieron NTF en dosis 1X. **Grupo NTF 2X:** los animales recibieron NTF en dosis 2 veces superior a la 1X. **Grupo NTF 1X + BG126 1X:** los animales recibieron NTF en dosis 1X coadministrada con BG126 en dosis 1X. **Grupo NTF 2X + BG126 10X:** los animales recibieron NTF en dosis 2X coadministrada con BG126 en dosis 10X. **Grupo NTF 1X + BG126 1XP:** los animales recibieron BG126 en dosis 1X durante 3 días antes de la administración conjunta de NTF en dosis 1X.

Tabla 1. Protocolo de tratamiento de los animales.

Grupo Tratamiento	Control	BG126 1X	BG126 10X	NTF 1X	NTF 2X	NTF 1X + BG126 1X	NTF 2X + BG126 10X	NTF 1X + BG126 1XP
Vehículo (agua)	✓							
BG126(24mg-ext/kg/día)		✓				✓		
BG126(240mg-ext/kg/día)			✓				✓	
NTF (11,4mg/kg/día)				✓		✓		✓
NTF (22,9mg/kg/día)					✓		✓	
Profilaxis 3 días BG126 (11,4mg/kg/día)								✓

Eutanasia y procesamiento de muestras. Los animales fueron previamente anestesiados con éter etílico y luego se realizaron sus eutanasias por desangramiento. Este proceso se realizó a las 0, 24, 48 y 96 horas de tratamiento. Posteriormente, se obtuvieron muestras de sangre, colectadas en *vacutainers* con EDTA para hemograma y capacidad antioxidante plasmática, y sin EDTA para perfil bioquímico.

Hemograma. Este examen fue realizado en el Laboratorio Clínico Centro Médico Baquedano (Santiago, Chile). Los parámetros determinados fueron: recuento de eritrocitos, hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), recuento de leucocitos, fórmula leucocitaria (basófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos y neutrófilos), velocidad de hemo-sedimentación (VHS) y recuento de plaquetas.

Perfil bioquímico: Fue realizado en el Laboratorio Clínico Centro Médico Baquedano (Santiago, Chile). Los parámetros analizados fueron: glucosa sérica, nitrógeno ureico sérico, calcio sérico, fósforo sérico, proteínas totales séricas, albúmina sérica, colesterol total sérico, bilirrubina total sérica, y las actividades séricas de la transaminasa glutámico-oxaloacética (GOT), fosfatasas alcalina (FA) y lactato deshidrogenasa total (LDH).

Capacidad antioxidante plasmática. Para estimar la capacidad antioxidante plasmática se determinó la capacidad plasmática reductora de hierro (FRAP). Esta determinación se realizó en el Laboratorio de Estrés Oxidativo y Nefrotoxicidad del Programa de Farmacología Molecular y Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, de acuerdo a la técnica descrita por Benzie y Strain (1996)³⁷. Esta técnica mide la capacidad del plasma de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} el cual, a un pH bajo, forma un complejo coloreado Fe^{2+} con la tripiridiltrazina el cual absorbe a 593nm. Los valores obtenidos se comparan con una solución acuosa que contiene iones ferrosos de concentración conocida.

B. In vitro

Preparación de microsomas hepáticos de rata. La fracción microsómica fue preparada de acuerdo a Letelier *et al.* (2005)³⁸. Las ratas fueron sometidas a ayuno por 15 horas con agua *ad libitum*, y sacrificadas por decapitación. Los hígados fueron perfundidos *in situ* con 0,9% P/V NaCl, removidos por incisión, y puestos en hielo. Todos los procedimientos de homogenización y fraccionamiento fueron realizados a 4°C, y todas las centrifugaciones fueron realizadas usando ya sea una centrifuga con refrigeración Hermle modelo Z326K ó una ultracentrifuga Beckman modelo XL-90. El tejido hepático (9-11g de peso húmedo), carente del tejido conectivo y vascular, fue homogenizado con 4 volúmenes de 0,154M de KCl, con ocho pasajes en un homogeneizador Dounce Wheaton B utilizando un motor Heidolph modelo RZR1 a 250rpm. El homogeneizado fue centrifugado a 9.000g por 15min y el sedimento fue descartado. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000g por 60min. El *pellet* (microsomas) fue almacenado a -80°C en un *freezer* il-Shin modelo DF8514 por hasta 3 meses. La cuantificación de la proteína microsómica se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951)³⁹, utilizando albúmina sérica de bovino (fracción IV) como estándar.

Lipoperoxidación microsómica. La lipoperoxidación microsómica inducida por el metabolismo reductivo de la nitrofurantoína se estimó determinando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método descrito por Letelier *et al.* (2005)³⁸. El malondialdehído, generado como producto de la descomposición de los lipoperoxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado, el cual posee una absorbancia máxima a 532nm ($\epsilon_{532} = 156.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Determinación de tioles microsómicos totales. La determinación de los tioles totales se realizó esencialmente de acuerdo a la técnica descrita por Letelier *et al.* (2005)³⁸. Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), liberado en la reacción entre el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) y los grupos tiólicos presentes en la muestra. El TNB posee una absorbancia máxima a 412nm ($\epsilon_{412} = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Análisis estadístico. Los resultados de los experimentos *in vivo* fueron analizados sobre la base de la distribución normal de los rangos del grupo control para cada parámetro, la cual se confirmó mediante la prueba de normalidad de D'Agostino & Pearson. Las diferencias entre el rango control para cada parámetro estudiado y los rangos obtenidos con cada tratamiento *in vivo*, fueron analizadas mediante el *test* de Wilcoxon. En los casos del recuento de leucocitos y los componentes de la fórmula leucocitaria, se realizó además, un ANOVA de dos vías con *post-test* de Bonferroni, para analizar las diferencias entre las medias control y las obtenidas para cada tratamiento *in vivo*. Las diferencias calculadas se consideraron significativas a un valor de $p < 0,05$.

Los resultados de los experimentos realizados *in vitro* se analizaron mediante un ANOVA de una vía. La comparación entre los datos experimentales se realizó mediante *post-test* de Dunnett's. Las diferencias calculadas se consideraron significativas a un valor de $p < 0,05$.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism, versión 5.0.

III. RESULTADOS

Experimentos *in vivo*

Perfil Bioquímico. Los resultados de los parámetros analizados en el perfil bioquímico, se muestran en la tabla 2 y las figuras 2, 3, 4 y 5. La tabla 2 muestra los intervalos de confianza del 95% (IC 95%) para cada parámetro analizado en los perfiles bioquímicos obtenidos del grupo control de ratas macho Sprague Dawley. Los IC 95% fueron calculados a partir de los datos obtenidos de a lo menos 8 ratas control para cada parámetro. Los valores de p , corresponden a la probabilidad de encontrar una distribución normal de los datos, según la prueba de D'Agostino & Pearson.

Tabla 2. Intervalos de confianza del 95% para los parámetros del Perfil Bioquímico del grupo Control

	IC 95%		Valor p
	mín	máx	
Calcio mg/dL	10,48	11,18	0,786
Fosforo mg/dL	9,53	10,69	0,224
Glicemia mg/dL	149,1	168,5	0,698
NUS mg/dL	18,6	22,4	0,993
Colesterol Tot mg/dL	57,1	63,6	0,912
Proteínas g/dL	5,47	5,75	0,602
Albumina g/dL	3,71	3,89	0,815
Bilirrubina Tot mg/dL	0,109	0,151	0,142
F.A U/L	525,8	713,8	0,124
LDH U/L	3544	4999	0,346
GOT U/L	145,7	184,8	0,517
Creatinina mg/dL	0,65	0,72	0,638

IC 95%: intervalos de confianza del 95%. Los valores de p corresponden a la probabilidad de una distribución normal de los datos según la prueba de normalidad de D'Agostino & Pearson.

Actividad LDH sérica. Los cambios en esta actividad se muestran en la figura 2. La figura 2A muestra el curso temporal de la actividad LDH sérica en animales tratados con BG126 1X y 10X. A las 24 horas, ambas dosis provocaron una disminución

significativa de esta actividad respecto del rango alcanzado por el grupo control ($p < 0,05$ según *test* de Wilcoxon). Sin embargo, a las 48 y 96 horas de tratamiento de los animales con las dosis 1X y 10X de BG126, esta actividad no mostró diferencias significativas respecto al grupo control, $p > 0,05$.

La figura 2B muestra el curso temporal de la actividad LDH sérica en los animales tratados con NTF 1X y 2X. A las 24 horas, ambas dosis provocaron un aumento significativo de esta actividad respecto del rango alcanzado por el grupo control, $p < 0,05$. A las 48 horas de tratamiento sin embargo, esta actividad LDH disminuyó significativamente, normalizándose al valor control a las 96 horas de tratamiento.

El efecto sobre la actividad LDH después del tratamiento con NTF y en combinación con BG126, se muestra en las figuras 2C, 2D y 2E. A las 24 horas de tratamiento, el aumento de la actividad LDH provocado por ambas dosis de NTF fue normalizado por la coadministración de BG126 1X y 10X y disminuido significativamente por la dosis 1XP (BG126 1X, administrado en profilaxis de 3 días) respecto del rango alcanzado por el grupo control (figura 2C). A las 48 horas de tratamiento, la disminución de la actividad LDH con ambas dosis de NTF fue normalizada por la coadministración de BG126 1XP y 10X, pero no con la dosis BG126 1X (figura 2D). A las 96 horas de tratamiento ya sea con NTF administrada sola o coadministrada con las distintas dosis de BG126 (1X, 1XP y 10X) no se observaron cambios estadísticamente significativos en la actividad LDH sérica respecto del rango alcanzado por el grupo control, $p > 0,05$ (figura 2E).

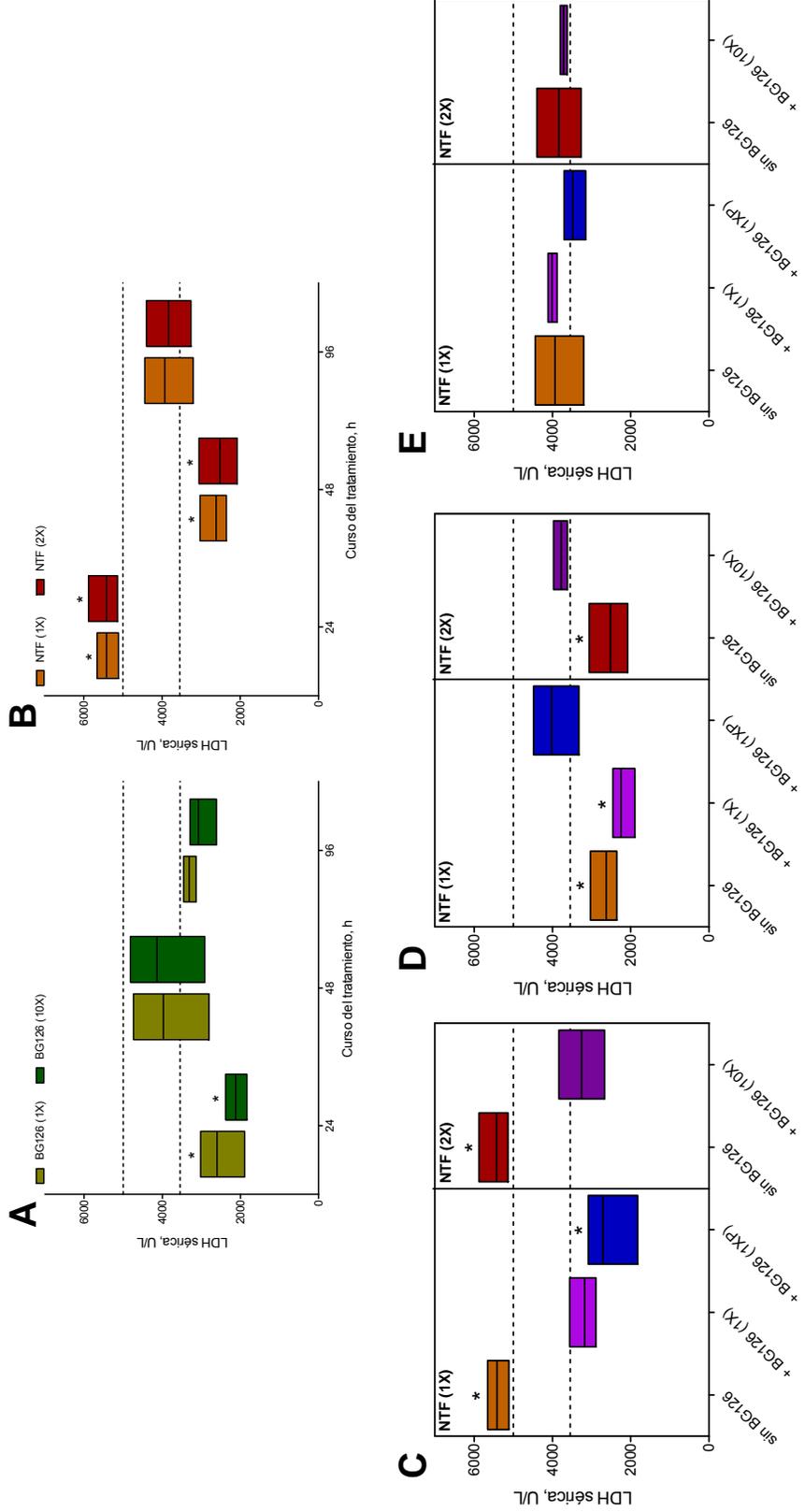


Figura 2. Actividad LDH sérica en ratas tratadas con nitrofurantoina en combinación con BG126. A y B: cursos temporales de la actividad LDH sérica en animales tratados con BG126 y nitrofurantoina (NTF), respectivamente. **C, D y E:** tratamiento combinado de nitrofurantoina y BG126 a las 24, 48 y 96h, respectivamente. Líneas discontinuas: Rango control. (*): Rango significativamente distinto al control ($p < 0,05$ según *test* de Wilcoxon).

Actividad GOT. Los cambios en esta actividad se muestran en la figura 3. La figura 3A muestra el curso temporal de la actividad GOT en los animales tratados con BG126 1X y 10X. A las 24 horas, sólo la dosis 10X provocó una disminución significativa de esta actividad respecto del rango alcanzado por el grupo control, $p < 0,05$; a las 48 y 96 horas de tratamiento sin embargo, esta actividad no fue significativamente diferente a la del grupo control. La dosis 1X no provocó cambios significativos de la actividad GOT en ninguno de los tiempos estudiados.

La figura 3B muestra el curso temporal de la actividad de la GOT en los animales tratados sólo con NTF 1X y 2X. A las 48 horas, ambas dosis provocaron un aumento significativo de la actividad GOT respecto del rango alcanzado por el grupo control, $p < 0,05$. Sin embargo, a las 24 y 96 horas de tratamiento, ambas dosis no mostraron cambios estadísticamente significativos con respecto al rango alcanzado por el grupo control, $p > 0,05$.

El efecto sobre la actividad GOT después del tratamiento con NTF y en combinación con BG126, se muestra en las figuras 3C, 3D y 3E. A las 24 horas de tratamiento, no se observaron cambios estadísticamente significativos entre los distintos tratamientos y el rango de la actividad GOT alcanzado por el grupo control, $p > 0,05$ (figura 3C). A las 48 horas de tratamiento ambas dosis de NTF administrada sola, provocaron un aumento significativo de la actividad GOT con respecto al grupo control; sin embargo, la coadministración con BG126 normalizó la actividad de la GOT al rango alcanzado por el grupo control (figura 3D). A las 96 horas de tratamiento, sólo la dosis de NTF 1X coadministrada con BG126 1X provocó un aumento significativo de la actividad GOT, $p < 0,05$ (figura 3E).

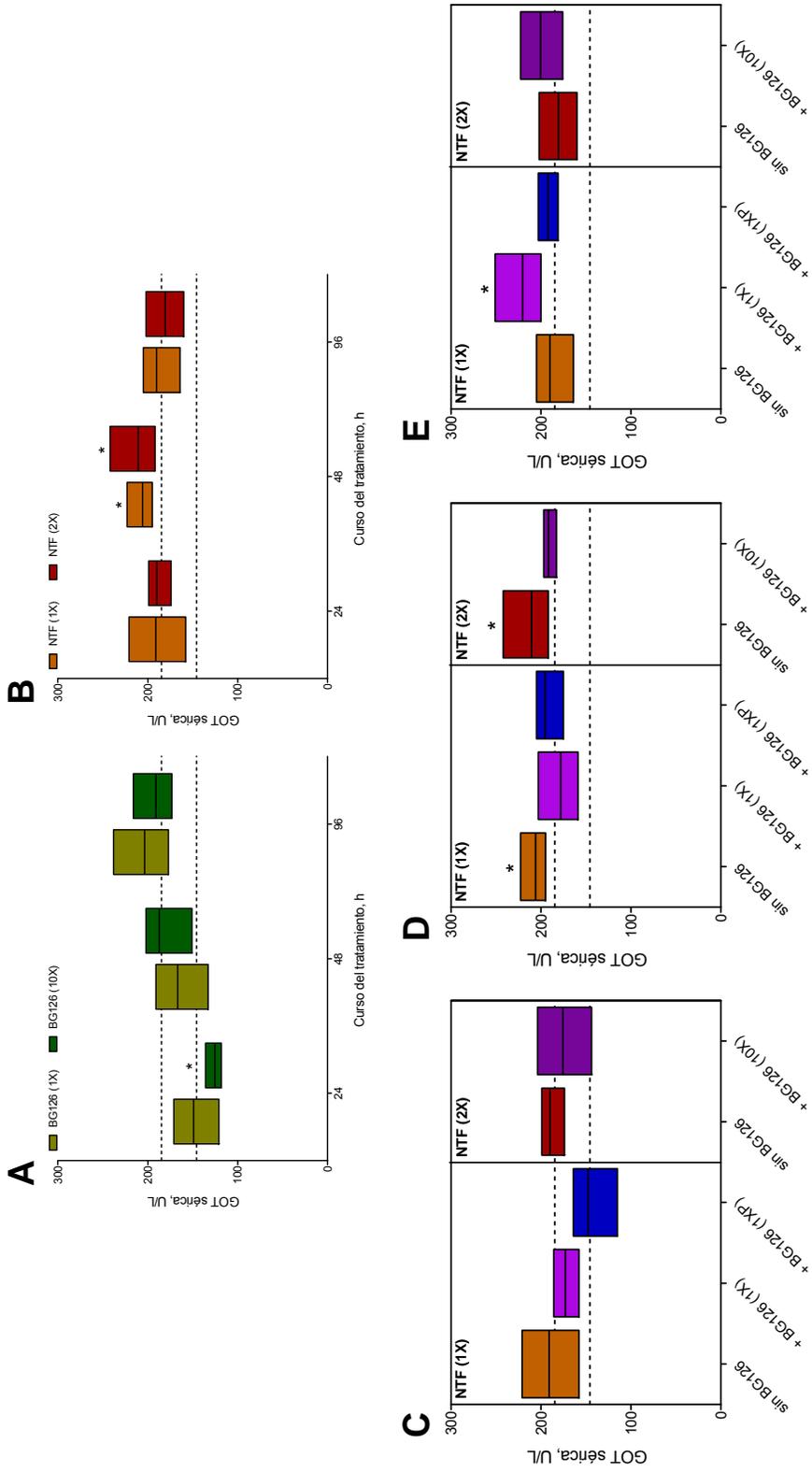


Figura 3. Actividad GOT sérica en ratas tratadas con nitrofurantoina en combinación con BG126. A y B: cursos temporales de la actividad GOT sérica en animales tratados con BG126 y nitrofurantoina (NTF), respectivamente. **C, D y E:** tratamiento combinado de nitrofurantoina y BG126 a las 24, 48 y 96h, respectivamente. Líneas discontinuas: Rango control. (*): Rango significativamente distinto al control ($p < 0,05$ según *test* de Wilcoxon).

Glucosa Sérica. Los cambios en la glicemia se muestran en la figura 4. La figura 4A muestra el curso temporal de los niveles de glucosa en los animales tratados sólo con BG126 1X y 10X. Ambas dosis de BG126 no provocaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de glucosa con respecto al rango alcanzado por el grupo control en ninguno de los tiempos estudiados (24, 48 y 96 horas), $p > 0,05$.

El efecto temporal del tratamiento con NTF 1X y 2X se muestra en la figura 4B. A las 24 horas, la dosis 1X provocó una disminución significativa de la glucosa con respecto al rango alcanzado por el grupo control, $p < 0,05$. Sin embargo, la dosis 2X de NTF disminuyó significativamente los niveles de glucosa con respecto al grupo control en todos los tiempos ensayados (24, 48 y 96 horas), $p < 0,05$.

El efecto sobre los niveles de glucosa sanguíneos después del tratamiento sólo con NTF y en combinación con BG126, se muestra en las figuras 4C, 4D y 4E. La coadministración de NTF 1X y BG126 1X y 1XP normalizó la disminución de los niveles de glucosa provocados a las 24 horas por la NTF 1X, que fue el único tiempo que NTF alteró los niveles de glucosa (figura 4C). Asimismo, la coadministración de NTF 2X y BG126 10X, normalizó la disminución de los niveles de glucosa provocados por NTF 2X a las 24, 48 y 96 horas (figuras 4C, 4D y 4E).

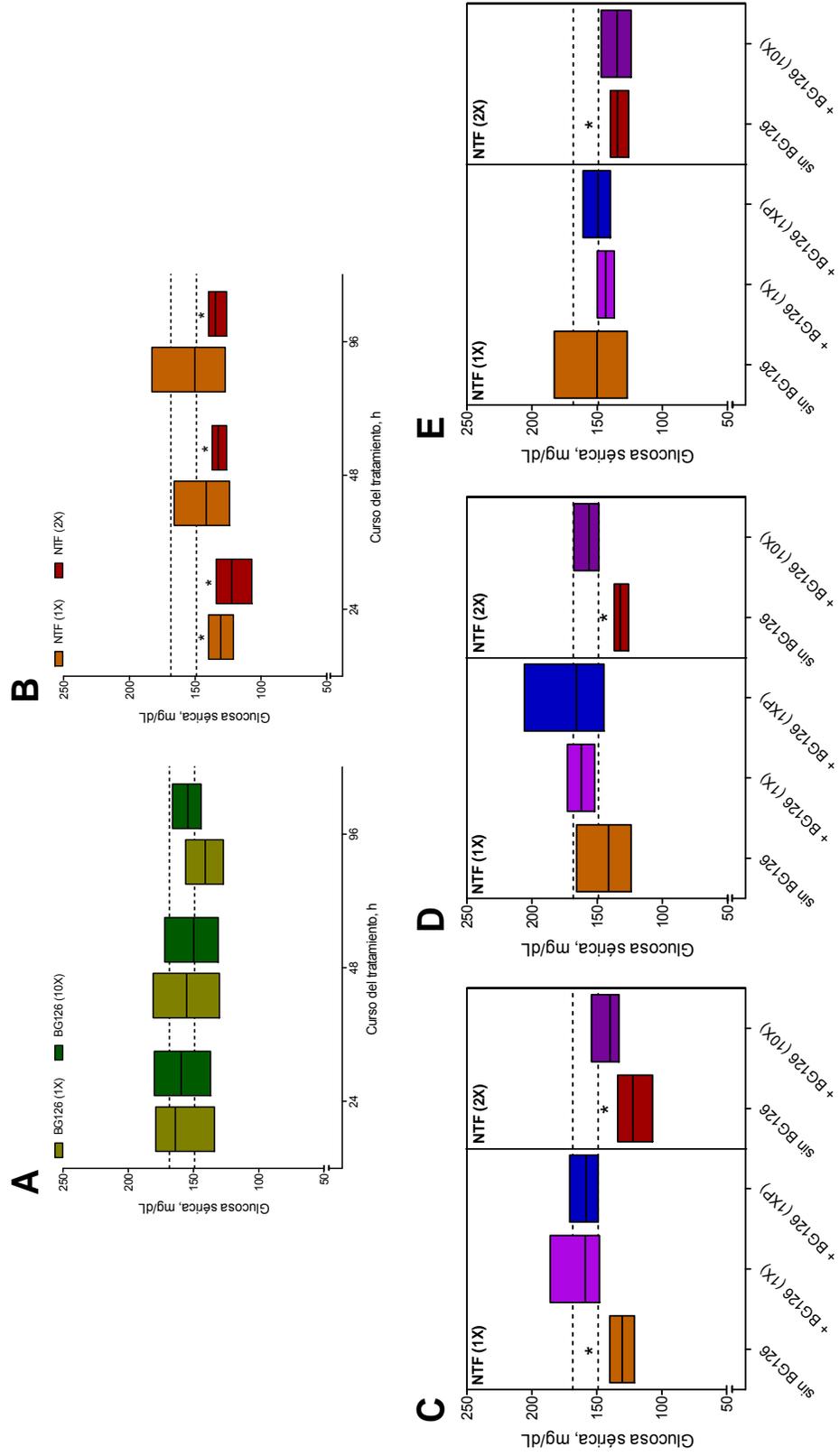


Figura 4. Glucosa sérica en ratas tratadas con nitrofurantoina en combinación con BG126. A y B: cursos temporales de glucosa sérica en animales tratados con BG126 y nitrofurantoina (NTF), respectivamente. **C, D y E:** tratamiento combinado de nitrofurantoina y BG126 a las 24, 48 y 96h, respectivamente. Líneas discontinuas: Rango control. (*): Rango significativamente distinto al control ($p < 0,05$ según *test* de Wilcoxon).

Colesterol Sérico. Los cambios en los niveles de colesterol se muestran en la figura 5. La figura 5A, muestra el curso temporal del colesterol sérico en animales tratados sólo con BG126 1X y 10X. Ambas dosis de BG126, no provocaron cambios estadísticamente significativos en el nivel de colesterol con respecto al rango alcanzado por el grupo control en todos los tiempos estudiados (24, 48 y 96 horas), $p > 0,05$. NTF 1X y 2X sin embargo, provocaron una disminución significativa de los niveles de colesterol sólo a las 24 y 96 horas de tratamiento, respectivamente, $p < 0,05$ (figura 5B).

El efecto sobre los niveles de colesterol después del tratamiento con NTF y en combinación con BG126, se muestra en las figuras 5C, 5D y 5E. La coadministración de NTF 1X y BG126 1X y 1XP normalizó la disminución de los niveles de colesterol provocados a las 24 horas por la NTF 1X (figura 5C). Asimismo, la coadministración de NTF 2X y BG126 10X, normalizó la disminución de los niveles de colesterol provocados por NTF 2X a las 96 horas (figura 5E).

Cabe agregar que las ratas tratadas sólo con NTF y el tratamiento en combinación con BG126, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros séricos siguientes: calcio, fósforo, NUS, proteínas totales, albúmina, bilirrubina total, FA y creatinina, respecto a los rangos alcanzados por el grupo control, $p > 0,05$ (datos no mostrados).

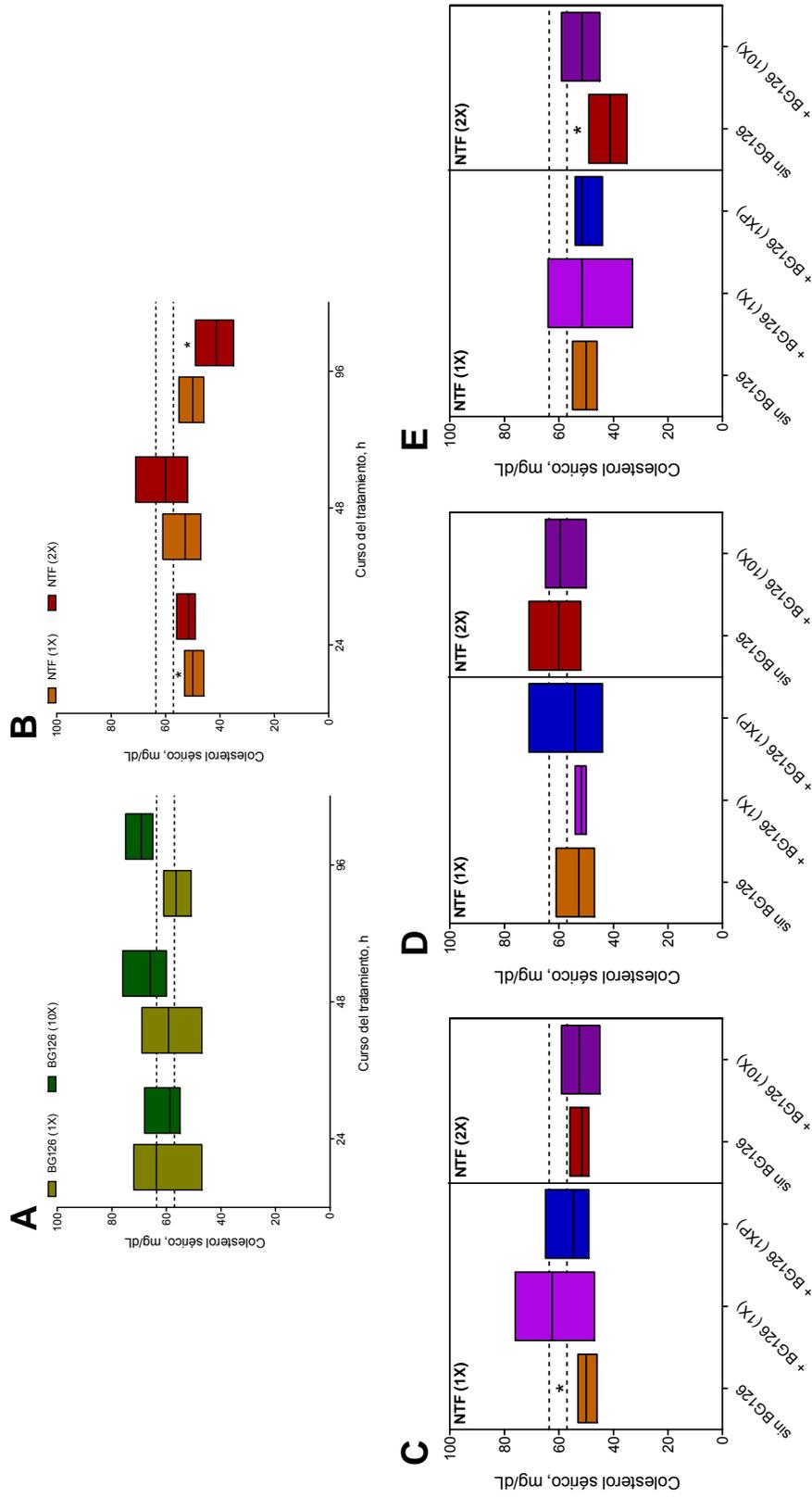


Figura 5. Colesterol sérico en ratas tratadas con nitrofurantoina en combinación con BG126. A y B: cursos temporales del colesterol sérico en animales tratados con BG126 y nitrofurantoina (NTF), respectivamente. **C, D y E:** tratamiento combinado de nitrofurantoina y BG126 a las 24, 48 y 96h, respectivamente. Líneas discontinuas: Rango control. (*): Rango significativamente distinto al control ($p < 0,05$ según *test* de Wilcoxon).

Hemograma: Los resultados de los parámetros analizados en el hemograma, se muestran en la tabla 3 y las figuras 6 y 7. La tabla 3 muestra los intervalos de confianza del 95% (IC 95%) para cada parámetro analizado en los hemogramas obtenidos del grupo control de ratas macho Sprague Dawley. Los IC 95% fueron calculados a partir de los datos obtenidos de al menos 8 ratas control. Los valores de p , corresponden a la probabilidad de encontrar una distribución normal de los datos, según la prueba de D'Agostino & Pearson. Estas probabilidades fueron superiores al 5% en todos los casos a excepción del número de basófilos, mielocitos, juveniles y baciliformes, los cuales presentaron recuentos nulos y por ende no se les pudo calcular la distribución de normalidad.

Tabla 3. Intervalos de confianza del 95% para los parámetros del Hemograma del grupo Control

	IC 95%		Valor p
	mín	máx	
Eritrocitos 10^9 /mL	6,25	6,63	0,453
Hematocrito %	43,9	45,8	0,699
Hemoglobina g/dL	14,1	14,6	0,889
V.C.M fL	68,71	71,86	0,854
H.C.M pg	21,95	22,94	0,350
C.H.C.M %	31,32	31,81	0,131
Leucocitos 10^3 /mL	6,80	9,28	0,434
Basófilos/mL	0	0	-
Eosinófilos/mL	83	112	0,615
Mielocito/mL	0	0	-
Juvenil/mL	0	0	-
Baciliformes/mL	0	0	-
Segmentado/mL	412	562	0,725
Linfocitos/mL	4493	5922	0,211
Monocitos/mL	1140	1567	0,434
Plaquetas 10^6 /mL	0,8417	0,9742	0,551
VHS mm/h	2,55	4,45	0,745

IC 95%: intervalos de confianza del 95%. Los valores de p corresponden a la probabilidad de una distribución normal de los datos según la prueba de normalidad de D'Agostino & Pearson.

Número de leucocitos. Los cambios en el número de leucocitos se muestran en la figura 6 y la tabla 4. La figura 6A, muestra el cambio en el tiempo del número de leucocitos en animales tratados sólo con BG126 1X y 10X. La figura 6B, muestra el curso temporal del número de leucocitos en animales tratados con NTF 1X y 2X. La figura 6C, 6D y 6E muestra el efecto en el número de leucocitos en el tratamiento con NTF administrada sola y coadministrada con BG126. El análisis estadístico mediante el *test* de Wilcoxon del número de leucocitos, no mostró diferencias significativas entre el rango de los animales controles y los rangos de los animales tratados con NTF, BG126 ó ambos en combinación, $p>0,05$ (figura 6). Sin embargo, se observó una tendencia al aumento de este parámetro con ambas dosis de NTF (figura 6B).

Dado que el *test* de Wilcoxon evalúa las diferencias entre rangos y medianas de poblaciones, sin asumir una distribución normal, los datos fueron también analizados por ANOVA de dos vías, con *post-test* de Bonferroni, el cual evalúa la diferencia entre las medias. Los resultados de este análisis mostraron que ambas dosis de NTF (1X y 2X) producen un aumento significativo en la media del número de leucocitos a las 24h con respecto al grupo control (tabla 4). Asimismo, la coadministración de BG126 1X y 1XP normalizó este parámetro comparado con NTF 1X, $p<0,05$ (tabla 4). Sin embargo, BG126 10X no fue capaz de normalizar el número de leucocitos comparado con NTF 2X, $p>0,05$ (tabla 4).

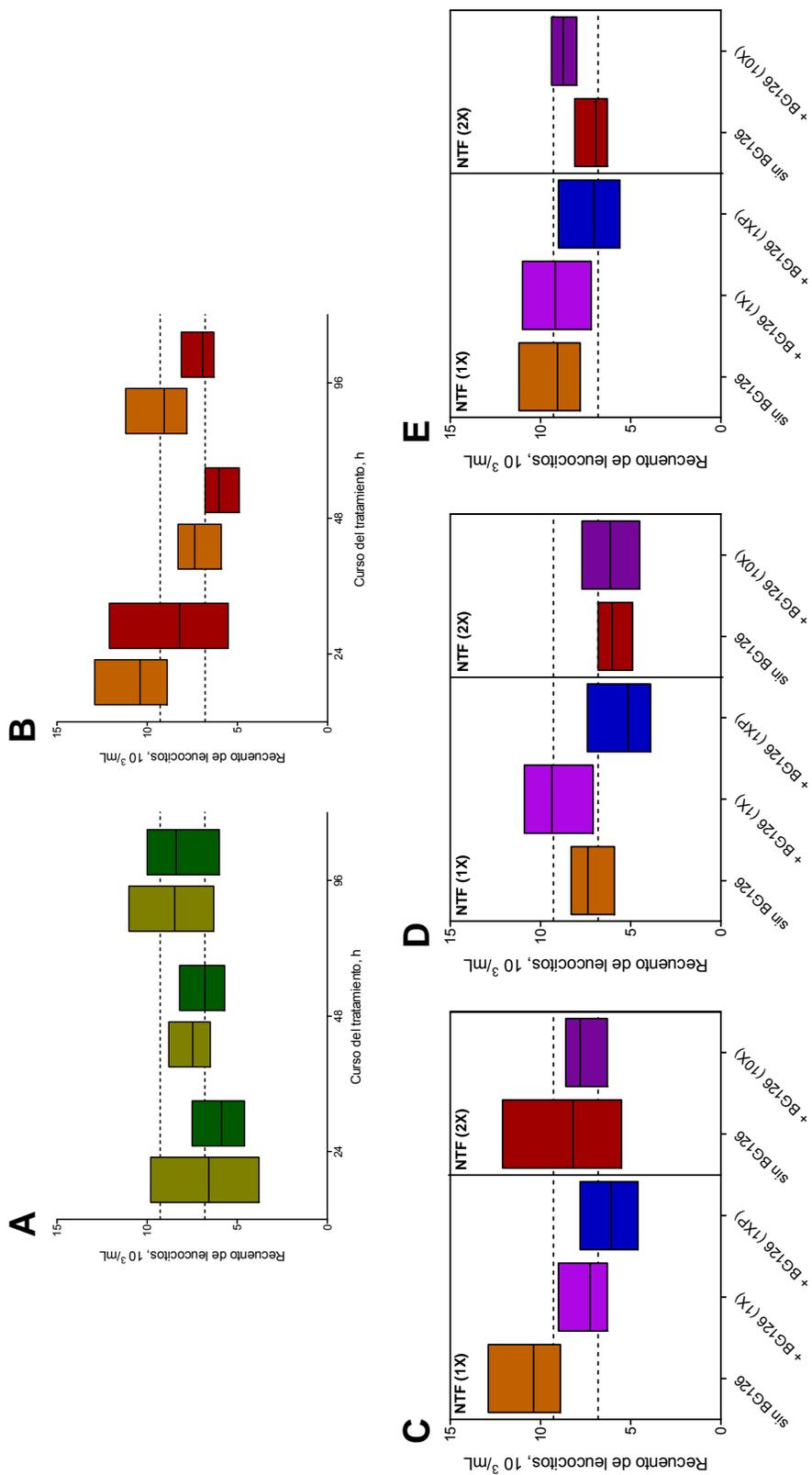


Figura 6. Número de Leucocitos en ratas tratadas con nitrofurantoina en combinación con BG126. A y B: cursos temporales del recuento de leucocitos en animales tratados con BG126 y nitrofurantoina (NTF), respectivamente. **C, D y E:** tratamiento combinado de nitrofurantoina y BG126 a las 24, 48 y 96h, respectivamente. Líneas discontinuas: Rango control. (*): Rango significativamente distinto al control ($p < 0,05$ según *test* de Wilcoxon).

Tabla 4. Diferencias en el número de leucocitos ($10^3/\text{mL}$) entre los distintos tratamientos a las 24 horas

Control	NTF (1X)	NTF (2X)	+BG126 (1X)	+BG126 (1XP)	+BG126 (10X)	Valor p
6,80 - 9,28	7,99 - 15,81					<0,05
6,80 - 9,28		6,55-12,85				>0,05
	7,99 - 15,81		5,26-9,24			<0,05
	7,99 - 15,81			3,91-8,29		<0,01
		6,55-12,85			6,17-9,43	>0,05

Los valores representan los intervalos de confianza del 95%. Los valores de p representan las probabilidades obtenidas a partir de un ANOVA de dos vías, con *post-test* de Bonferroni.

Fórmula leucocitaria. El recuento de basófilos, baciliformes, mielocitos y juveniles fue cero para todas las poblaciones analizadas, incluyendo las ratas control. Los cambios en la fórmula leucocitaria se muestran en la figura 7. El *test* de Wilcoxon aplicado al recuento de eosinófilos, neutrófilos, monocitos y linfocitos no mostró diferencias significativas entre los rangos controles y los obtenidos de los animales tratados, $p > 0,05$. Al realizar el estudio estadístico de estos resultados mediante ANOVA de dos vías, con *post-test* de Bonferroni, las dosis de BG126 1X y 10X, tampoco alteraron significativamente estos parámetros (figura 7A).

La figura 7B, muestra el curso temporal del número de linfocitos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos en ratas tratadas sólo con NTF 1X y 2X. Ambas dosis de NTF produjeron un aumento significativo de monocitos y neutrófilos a las 24, 48 y 96 horas de tratamiento, $p < 0,05$ según ANOVA de dos vías, con *post-test* de Bonferroni. Sin embargo, NTF 1X produjo un aumento de eosinófilos a las 48 y 96 horas y NTF 2X, un aumento de eosinófilos a las 24, 48 y 96 horas.

Las figuras 7C, 7D y 7E muestran el efecto de BG126 1X y 10X sobre los cambios observados en el número de linfocitos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos en las ratas tratadas sólo con NTF a las 24, 48 y 96 horas de tratamiento, respectivamente. La coadministración de BG126 1X, 1XP y 10X produjo la normalización de estos

parámetros en todos los tiempos estudiados, comparado al grupo control, $p > 0,05$ según ANOVA de dos vías, con *post-test* de Bonferroni.

Las ratas tratadas con NTF sola y coadministrada con BG126 no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros siguientes: los datos de eritrocitos, hematocrito, hemoglobina, VCM, HCM, CHCM, plaquetas y VHS (datos no mostrados).

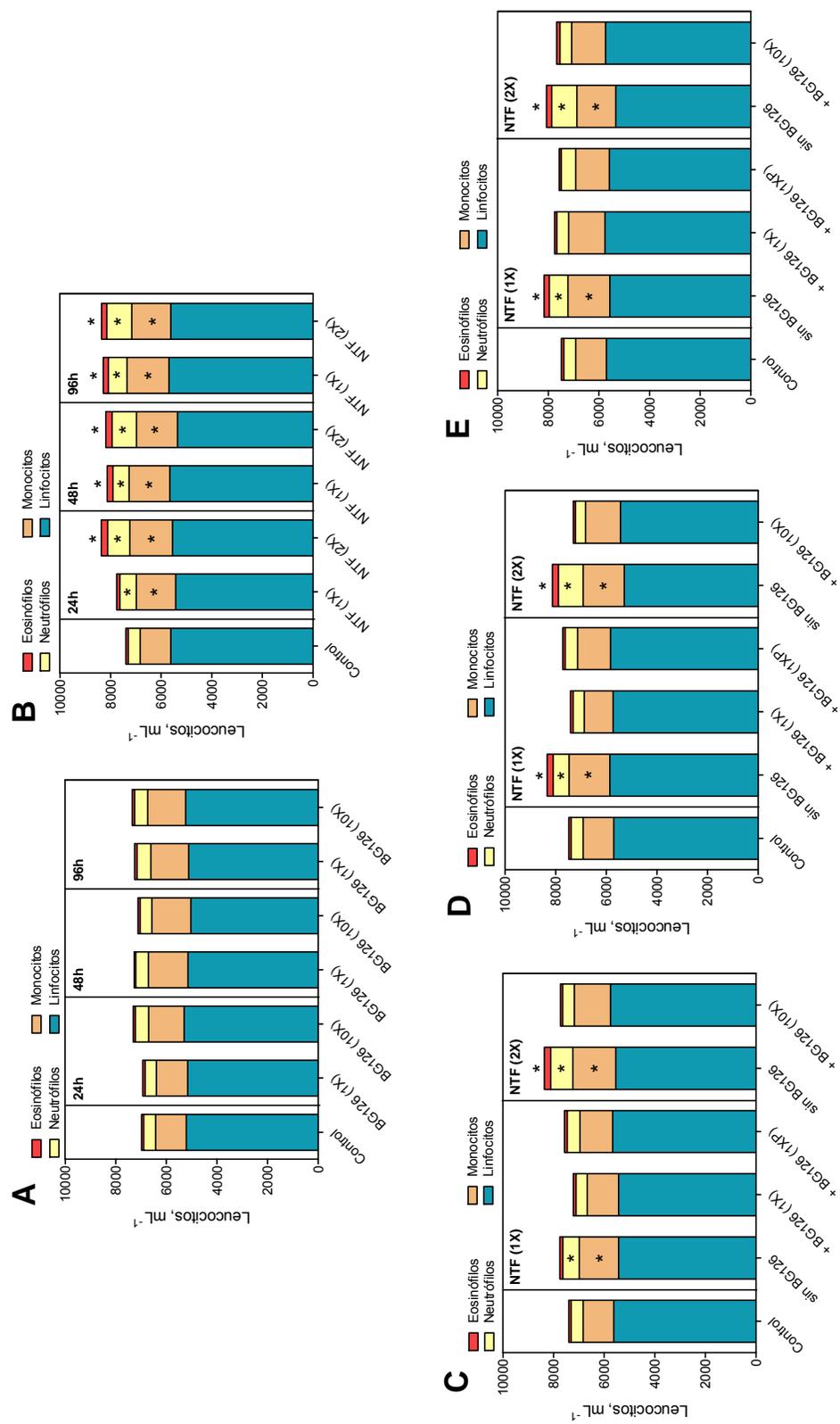


Figura 7. Fórmula Leucocitaria en ratas tratadas con nitrofurantoina en combinación con BG126. A y B: cursos temporales de los componentes de la fórmula leucocitaria en animales tratados con BG126 y nitrofurantoina (NTF), respectivamente. **C, D y E:** tratamiento combinado de nitrofurantoina y BG126 a las 24, 48 y 96h, respectivamente. El área de cada barra, corresponde al número absoluto de cada componente de la fórmula leucocitaria. (*): Media significativamente distinta al control ($p < 0,05$ según ANOVA de dos vías con *post-test* de Bonferroni).

Capacidad Plasmática Reductora de Hierro (FRAP): Los resultados de los niveles de FRAP, se muestran en la tabla 5 y la figura 8. La tabla 5 muestra el intervalo de confianza del 95% (IC 95%) para el FRAP presentado por el grupo control de ratas macho Sprague Dawley. El IC 95% fue calculado a partir de los datos obtenidos de al menos 8 ratas control. El valor de p corresponde a la probabilidad de que los datos presenten una distribución normal, según la prueba de D'Agostino & Pearson.

Tabla 5. Intervalo de confianza del 95% para la Capacidad Plasmática Reductora de Hierro del grupo Control

	IC 95%		Valor p
	mín	máx	
FRAP	155,8	179,8	0,938

IC 95%: intervalo de confianza del 95%. El valor de p corresponde a la probabilidad de una distribución normal de los datos según la prueba de normalidad de D'Agostino & Pearson.

La figura 8, muestra el efecto de BG126 y NTF administrados solos y en combinación sobre los niveles de FRAP. La figura 8A, muestra el curso temporal de los niveles de FRAP en ratas tratadas sólo con BG126 1X y 10X. A las 48 y 96 horas de tratamiento, la dosis 1X provocó un aumento significativo del nivel de FRAP con respecto del rango alcanzado por el grupo control ($p < 0,05$ según *test* de Wilcoxon); sin embargo, BG126 10X no produjo cambios significativos en este parámetro.

La figura 8B, muestra el curso temporal del nivel de FRAP en ratas tratadas sólo con NTF 1X y 2X. A las 48 y 96 horas de tratamiento, la dosis 1X provocó un aumento significativo del nivel de FRAP con respecto del rango alcanzado por el grupo control, $p < 0,05$. Sin embargo, la NTF 2X provocó un aumento significativo de los niveles de FRAP sólo a las 48 horas de tratamiento. Cabe señalar que este aumento fue mayor al obtenido al mismo tiempo de tratamiento con BG126 1X ($p < 0,05$ según ANOVA de dos vías con *post-test* de Bonferroni).

Las figuras 8C, 8D y 8E muestran el efecto de BG126 1X y 10X sobre los cambios observados en los niveles de FRAP en las ratas tratadas sólo con NTF a las 24, 48 y 96 horas de tratamiento, respectivamente. Aunque a las 24 horas NTF 1X y 2X no produjo un aumento significativo en los niveles de FRAP con respecto al grupo control, la coadministración de BG126 1XP y 10X aumentó el FRAP comparado con el rango del grupo control, $p < 0,05$ según *test* de Wilcoxon (figura 8C). A las 48 horas, la coadministración de BG126 1X, 1XP y 10X normalizó el aumento de FRAP producido por NTF 1X y 2X al valor alcanzado por el grupo control, $p > 0,05$ según *test* de Wilcoxon (figura 8D). La coadministración de BG126 1X y 1XP normalizó el aumento de este parámetro producido por NTF 1X a las 96 horas, $p > 0,05$.

Cabe señalar que a las 96 horas, NTF 2X y la coadministración de BG126 10X no alteraron el nivel de FRAP (figura 8E).

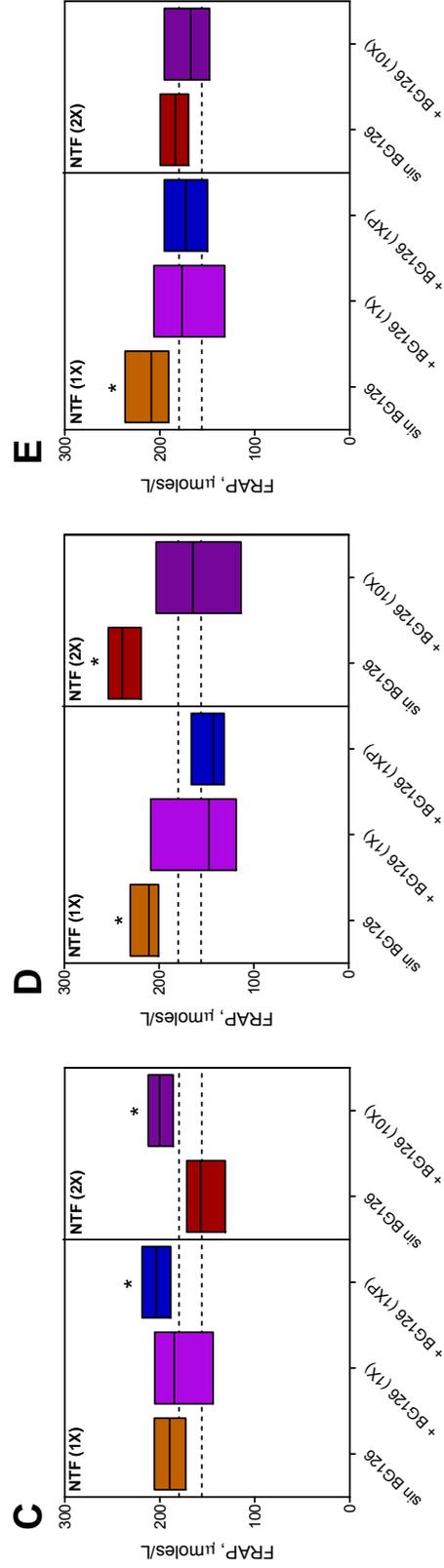
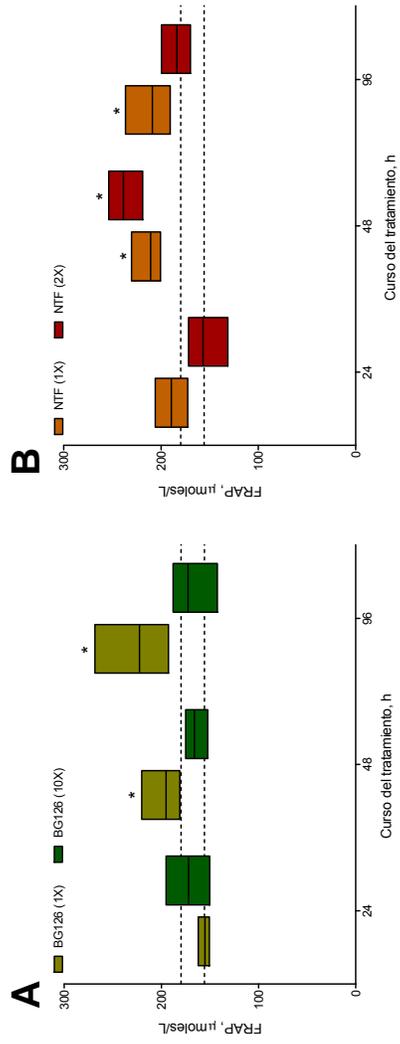


Figura 8. FRAP en ratas tratadas con nitrofurantoina en combinación con BG126. A y B: cursos temporales del FRAP en animales tratados con BG126 y nitrofurantoina (NTF), respectivamente. **C, D y E:** tratamiento combinado de nitrofurantoina y BG126 a las 24, 48 y 96h, respectivamente. Líneas discontinuas: Rango control. (*): Rango significativamente distinto al control ($p < 0,05$ según test de Wilcoxon).

Experimentos *in vitro*

Efecto de BG126 y glutatión reducido (GSH) sobre la lipoperoxidación microsómica. La incubación de microsomas hepáticos de rata con nitrofurantóina en presencia de NADPH (condiciones de metabolismo a través del sistema CYP450) produjo una lipoperoxidación equivalente a $0,138 \pm 0,002$ nmol TBARS/min/mg de proteína microsómica. Este efecto fue inhibido por BG126 y GSH de una forma dependiente de sus concentraciones. Los IC_{50} , que representan las concentraciones de estos antioxidantes que produjeron el 50% de la inhibición de la lipoperoxidación se muestran en la tabla 6. Cabe señalar que el IC_{50} de BG126 fue 27 veces menor al de GSH.

Tabla 6. Lipoperoxidación microsómica provocada por NTF en condiciones de metabolización por el sistema CYP450

IC_{50}	BG126 $7,36 \pm 1,04$ nmol eq-cat/mg proteína microsómica
	GSH $203,4 \pm 1,18$ nmol/mg proteína microsómica

NTF: 0,2mM; BG126: 0 - 20,7nmol-eq catequina; GSH: 0 - 2mM; proteína microsómica: 1mg/mL. Los microsomas se pre-incubaron con GSH o BG126 por 5min. Luego se agregó NTF y el sistema generador de NADPH, y se incubaron por 30min a 37°C. La lipoperoxidación se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm SEM y están expresados como IC_{50} .

Protección de los tioles microsómicos por BG126 y GSH. La incubación de microsomas hepáticos de rata con nitrofurantoína en presencia de NADPH (condiciones de metabolismo a través del sistema CYP450) produjo un 33% de disminución de los tioles microsómicos (tabla 7). En presencia de BG126 y GSH la disminución de los tioles microsómicos fue de 5% y 13%, respectivamente (tabla 7).

Tabla 7. Efecto de BG126 y GSH sobre la disminución de tioles microsómicos provocada por NTF en condiciones de metabolización por el sistema CYP450

Control	NTF	NTF + BG126	NTF + GSH
8,2 ± 0,19	5,5 ± 0,21	7,8 ± 0,34	7,1 ± 0,39

NTF: 0,2 mM; GSH: 0,3 mM; BG126: 7,6 nmol-eq catequina; proteína microsómica: 0,2 mg/mL. Los microsomas se pre-incubaron con GSH o BG126 por 5min. Luego se agregó NTF y el sistema generador de NADPH, y se incubaron por 30 min a 37°C. La determinación del contenido total de tioles microsómicos se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± SEM y están expresados como nmoles de -SH/0,2mg de proteína microsómica.

IV. DISCUSIÓN

La administración oral de nitrofurantoína sola a ratas Sprague-Dawley produjo cambios en las actividades LDH y GOT séricas, las concentraciones séricas de glucosa y colesterol, la fórmula leucocitaria y la capacidad antioxidante plasmática (FRAP). La administración conjunta de BG126 y nitrofurantoína provocó que estos parámetros no fueran alterados con respecto a los rangos del grupo control (ratas tratadas con el vehículo).

La LDH es una enzima citosólica involucrada en la inter-conversión de piruvato a lactato y, además, es una enzima ampliamente distribuida entre los diferentes tejidos de los mamíferos. Por su parte, la GOT es un transaminasa mitocondrial y citosólica, que está involucrada en la inter-conversión de aminoácidos y cetoácidos en el sistema portador malato-aspartato entre el citosol y la membrana interna de la mitocondria, y por lo tanto es requerida para el metabolismo hepático de carbohidratos y del nitrógeno. Esta enzima además, presenta una vida media de 18 horas⁴⁰, lo cual la hace un excelente marcador de toxicidad aguda del hepatocito. Por lo tanto, la disminución de ambas actividades enzimáticas tras la administración de BG126 por 24 horas (figuras 2A y 3A) sugiere que este extracto, ejercería un efecto protector de tejidos. Más aún, la dosis menor de BG126 produjo un aumento de la capacidad antioxidante plasmática, medida como FRAP (figura 8A), confirmando el efecto protector postulado para este extracto.

El tratamiento oral de ratas con nitrofurantoína produjo un aumento en las actividades séricas de LDH y GOT (figuras 2B y 3B), y disminución de los niveles de glucosa y colesterol (figuras 4B y 5B). Estos cambios fueron normalizados por la coadministración de nitrofurantoína y BG126, lo cual confirma la acción protectora de BG126 postulada.

La disminución significativa de los niveles séricos de glucosa y colesterol producidos por la administración oral de nitrofurantoína sugiere un daño en la integridad del epitelio gastrointestinal que afectaría el transporte de nutrientes, entre ellos, la glucosa y ácidos grasos; esto es consistente con el cuadro diarreico que presentan los pacientes tratados con nitrofurantoína. Sin perjuicio de lo anterior, la disminución de los

niveles de glucosa sérica podría ser una consecuencia de un daño a los órganos encargados del control de la glicemia, como lo son el hígado y el páncreas⁴¹; alternativamente el tratamiento con nitrofurantoína podría alterar la liberación de insulina desde los islotes β -pancreáticos⁴². No podemos descartar que el daño hepático que parece producir la administración de nitrofurantoína pueda alterar la biosíntesis hepática de colesterol. En su conjunto, los resultados del perfil bioquímico indican que la administración oral de nitrofurantoína no sólo provocó un efecto dañino a nivel local gastrointestinal, sino además, un cuadro inflamatorio al menos en el hígado⁴⁰. El aumento del recuento de leucocitos, la neutrofilia, la eosinofilia y la monocitosis, efectos observados en las ratas tratadas con nitrofurantoína (tabla 4 y figura 7B) han sido descritas en patologías gastrointestinales, tales como la gastroenteritis eosinofílica, la colitis ulcerativa crónica y la enteritis regional (enfermedad de Crohn)⁴⁰. Todos estos antecedentes confirman nuestro postulado referente al daño gastrointestinal y hepático generado por la administración oral de nitrofurantoína.

Interesantemente, la coadministración de nitrofurantoína y BG126 produjo la normalización de todos los parámetros no sólo del perfil bioquímico sino también aquellos del hemograma alterados por la administración oral de nitrofurantoína (secciones C, D y E de las figuras 3, 4, 5 y 7), a excepción de la actividad LDH sérica. La disminución de esta última por debajo del rango control es consistente con un efecto protector del BG126 sobre las membranas del epitelio gastrointestinal que supera en magnitud al daño producido por la nitrofurantoína. Cabe señalar que el efecto protector de BG126 observado es consistente con la acción antiinflamatoria descrita para extractos de matico^{33, 43}.

Por otra parte, tanto la administración de nitrofurantoína como BG126 produjo un aumento de la capacidad antioxidante plasmática, aunque en distinta extensión y tiempo de tratamiento (figura 8). El aumento de la capacidad antioxidante plasmática, producido por el tratamiento con nitrofurantoína coincide con la disminución de los niveles séricos de la actividad LDH. Más aún, el estudio de correlación entre FRAP y actividad de LDH sérica en ratas tratadas con nitrofurantoína dan cuenta de una relación inversamente proporcional significativa (datos no mostrados). Estos resultados parecen reflejar una respuesta compensatoria de la rata frente a un posible daño

oxidativo producido por la administración oral de nitrofurantoína, lo cual desencadenaría una inducción de las defensas antioxidantes. Por otra parte, el aumento de la capacidad antioxidante plasmática por BG126 podría deberse no sólo al aumento de principios activos circulantes provenientes del extracto herbal, sino además, de la inducción de enzimas antioxidantes como la Glutación Transferasa⁴⁴. Estos resultados son consistentes con la idea de que el daño producido por la administración oral de nitrofurantoína tendría al menos un componente oxidativo, el cual sería provocado por el metabolismo reductivo de este fármaco que conduce a la generación de ROS. Dado que el exceso de ROS provoca daño sobre biomoléculas, el metabolismo reductivo de nitrofurantoína también puede explicar el cuadro inflamatorio observado en este trabajo.

Un aspecto que debe destacarse, es que en este trabajo se determinó el contenido total de polifenoles, principios activos que pueden relacionarse con los efectos antioxidantes observados (tabla 6 y 7). No obstante, en el futuro y ante un uso de este extracto como un fitofármaco que pueda ser aprobado por una entidad gubernamental sanitaria como el Instituto de Salud Pública de Chile, sería necesario tipificar los polifenoles existentes en el extracto de BG126. Esto toma una especial importancia ya que el contenido de estos compuestos puede tener influencia directa en la farmacocinética y farmacodinamia de BG126. Más aún, el conocimiento del tipo de polifenoles presentes en BG126, eventualmente podría permitir determinar toxicidad de preparados polifenólicos.

Notablemente, la coadministración de nitrofurantoína y BG126 provocó que la capacidad antioxidante plasmática no fuera significativamente distinta al rango alcanzado por el grupo control en todos los tiempos estudiados, efecto que podría estar relacionado con las actividades antiinflamatoria y antioxidante descritas de los preparados de matico³³. Como una forma de evaluar la actividad antioxidante de BG126, se estudió la capacidad de este extracto herbal de inhibir la oxidación de biomoléculas presentes en los microsomas hepáticos de rata. Para ello, se incubaron microsomas hepáticos de rata con nitrofurantoína y el sistema generador de NADPH (ver Métodos) en presencia y ausencia de BG126. El extracto herbal inhibió la lipoperoxidación y la disminución de los tioles microsómicos, fenómenos provocados

por nitrofurantoína (tablas 6 y 7). Más aún, el IC₅₀ obtenido para BG126 fue 27 veces menor que para GSH, principal antioxidante endógeno polar y mayoritariamente presente en el hígado⁴⁵. Esta diferencia puede deberse a las diferentes propiedades fisicoquímicas y de reactividad de estos compuestos. Por una parte, el GSH es una molécula muy polar comparada con la gran mayoría de los polifenoles, lo que explicaría el menor efecto anti-lipoperoxidante del GSH comparado al BG126. Por otra parte, la capacidad reductora de GSH le permite proteger y restablecer grupos tiólicos, propiedad que no comparte con el polifenol catequina⁴⁶. Esto es consistente con la mayor protección de los tioles microsómicos por parte del GSH comparado con BG126.

Cabe resaltar que si bien la oxidación de los lípidos de membrana afecta la homeostasis celular, la oxidación de los grupos tioles, especialmente presentes en los residuos de cisteína de las proteínas pueden producir cambios funcionales de las mismas. Un ejemplo de ello es la activación oxidativa de la Glutación S-Transferasa (GST) microsómica por la formación, vía puentes disulfuro, de los dímeros catalíticamente activos de esta enzima⁴⁷.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo indican que BG126 se comportaría como un protector del daño oxidativo e inflamatorio gastrointestinal y hepático producido por la administración oral de nitrofurantoína en ratas. Nuestro laboratorio se encuentra actualmente realizando un análisis histomorfológico e inmunohistoquímico de biopsias gástricas, intestinales y hepáticas de ratas tratadas con nitrofurantoína, BG126 o su combinación para poder confirmar este postulado.

La nitrofurantoína sigue siendo uno de los antimicrobianos más efectivos y económicos para el tratamiento de infecciones del tracto urinario bajo. Sin embargo, un porcentaje significativo de los pacientes tratados con nitrofurantoína abandonan el tratamiento como resultado de estos efectos adversos asociados a este fármaco. El desarrollo de una terapia combinada con BG126 podría reducir los efectos adversos asociados a la administración oral de este fármaco y mejorar el cumplimiento terapéutico de los pacientes.

Debido a los efectos adversos asociados al tratamiento oral con nitrofurantoína, este fármaco ha sido retirado del mercado en Estados Unidos y algunos países europeos.

De aquí, entonces, que este trabajo tiene una relevancia en el desarrollo de una estrategia que utilice extractos herbales en conjunto con fármacos descartados debido a sus efectos adversos. El preparado BG126 proviene de matico, el cual es una planta nativa chilena, parece ser una buena estrategia para cumplir este fin. Sin embargo, se requieren estudios clínicos que permitan determinar la eficacia y seguridad de BG126 en humanos. Estos estudios ya están programados y aprobados por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universidad de Chile.

V. CONCLUSIONES

- La administración oral de BG126 a ratas Sprague-Dawley produjo cambios en las actividades LDH y GOT y capacidad antioxidante plasmática. Estos cambios fueron consistentes con la actividad protectora propuesta para este extracto.

Las ratas control están sometidas a un estrés (ambiental, dieta, etc) y los antioxidantes presentes en BG126 podrían estar protegiéndolas, aumentando la capacidad antioxidante plasmática y a su vez reduciendo los posibles efectos inflamatorios producidos por la dieta. No obstante estos resultados deben ser estudiados en mayor profundidad en el futuro.

- La administración oral de nitrofurantoína produjo cambios en las actividades LDH y GOT séricas, las concentraciones séricas de glucosa y colesterol, la fórmula leucocitaria y la capacidad antioxidante plasmática. Dichos cambios fueron compatibles con un posible daño oxidativo provocado por el metabolismo reductivo de este fármaco.
- La administración conjunta de BG126 y nitrofurantoína provocó que los parámetros alterados por nitrofurantoína sola, no fueran significativamente distintos a los rangos alcanzados por el grupo control. Estos resultados fortalecen la idea que BG126 protegería del daño producido por la administración oral de nitrofurantoína.
- BG126 fue capaz de prevenir la lipoperoxidación microsómica y la pérdida de tioles microsómicos provocadas por la nitrofurantoína en condiciones de metabolización por el sistema CYP450. Esta evidencia sugiere que la actividad antioxidante de BG126 podría representar uno de los mecanismos que subyacen al efecto protector *in vivo* de dicho extracto observado en este trabajo.
- Como BG126 proviene de un extracto hidroalcohólico y dada la existencia de varios polifenoles con distintas propiedades fisicoquímicas en este extracto es

probable que el mecanismo de protección de BG126 esté mediado por la capacidad de estos compuestos de atrapar radicales libres.

Cabe señalar que la tipificación de los polifenoles existentes en el extracto BG126 podría en el futuro ayudar a la aprobación de este extracto como fitofármaco por una entidad gubernamental sanitaria como el Instituto de Salud Pública de Chile.

VI. REFERENCIAS

1. Guay, D.R. Contemporary management of uncomplicated urinary tract infections. *Drugs* 68(9): p. 1169-205, 2008.
2. Valdevenito, J.P. Infección urinaria recurrente en la mujer. *Rev Chilena Infectol* 25(4): p. 268-276, 2008.
3. Milo, G., E.A. Katchman, M. Paul, T. Christiaens, A. Baerheim, and L. Leibovici. Duration of antibacterial treatment for uncomplicated urinary tract infection in women. *Cochrane Database Syst Rev* (2): p. CD004682, 2005.
4. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. *Martindale : The Complete Drug Reference*. Thirty-sixth ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 308-309.
5. Cortés, M., A. Salazar, J. Acuña, G. Armijo, J. López de Santa María, R. Berner, A. Estrugo, C. Riffo, and V. Moraga. Cambios en la sensibilidad antibiótica de *E. coli* en mujeres con infección urinaria baja ambulatoria en un período de 10 años. *Revista Chilena de Urología* 72(3): p. 289-291, 2007.
6. Gupta, K., D. Scholes, and W.E. Stamm. Increasing Prevalence of Antimicrobial Resistance Among Uropathogens Causing Acute Uncomplicated Cystitis in Women. *JAMA* 281(8): p. 736-738, 1999.
7. Koch-Weser, J., V.W. Sidel, M. Dexter, C. Parish, D.C. Finer, and P. Kanarek. Adverse reactions to sulfisoxazole, sulfamethoxazole, and nitrofurantoin. Manifestations and specific reaction rates during 2,118 courses of therapy. *Arch Intern Med* 128(3): p. 399-404, 1971.
8. Holmberg, L., G. Boman, L.E. Bottiger, B. Eriksson, R. Spross, and A. Wessling. Adverse reactions to nitrofurantoin. Analysis of 921 reports. *Am J Med* 69(5): p. 733-8, 1980.
9. Penn, R.G. and J.P. Griffin. Adverse reactions to nitrofurantoin in the United Kingdom, Sweden, and Holland. *Br Med J (Clin Res Ed)* 284(6327): p. 1440-2, 1982.
10. D'Arcy, P.F. Nitrofurantoin. *Drug Intell Clin Pharm* 19(7-8): p. 540-7, 1985.

11. Witten, C.M. Pulmonary toxicity of nitrofurantoin. *Arch Phys Med Rehabil* 70(1): p. 55-7, 1989.
12. Amit, G., P. Cohen, and Z. Ackerman. Nitrofurantoin-induced chronic active hepatitis. *Isr Med Assoc J* 4(3): p. 184-6, 2002.
13. Jackowitz, A.I., J.L. Le Frock, and R.A. Prince. Nitrofurantoin polyneuropathy: report of two cases. *Am J Hosp Pharm* 34(7): p. 759-62, 1977.
14. Gait, J.E. Hemolytic reactions to nitrofurantoin in patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: theory and practice. *DICP* 24(12): p. 1210-3, 1990.
15. Martin, W.J., 2nd. Nitrofurantoin: evidence for the oxidant injury of lung parenchymal cells. *Am Rev Respir Dis* 127(4): p. 482-6, 1983.
16. Rossi, L., J.M. Silva, L.G. McGirr, and P.J. O'Brien. Nitrofurantoin-mediated oxidative stress cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 37(16): p. 3109-17, 1988.
17. Flores, J. *Farmacología Humana. Tercera Edición ed.* Barcelona: MASSON, S.A., 1997. p.
18. McOsker, C.C. and P.M. Fitzpatrick. Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J Antimicrob Chemother* 33 Suppl A: p. 23-30, 1994.
19. Pourahmad, J., S. Khan, and P.J. O'Brien. Lysosomal oxidative stress cytotoxicity induced by nitrofurantoin redox cycling in hepatocytes. *Adv Exp Med Biol* 500: p. 261-5, 2001.
20. Lemaire, P. and D.R. Livingstone. Inhibition studies on the involvement of flavoprotein reductases in menadione- and nitrofurantoin-stimulated oxyradical production by hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*). *J Biochem Toxicol* 9(2): p. 87-95, 1994.

21. Sreider, C.M., L. Grinblat, and A.O. Stoppani. Catalysis of nitrofurantoin redox-cycling and superoxide anion production by heart lipoamide dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* 40(8): p. 1849-57, 1990.
22. Minchin, R.F., P.C. Ho, and M.R. Boyd. Reductive metabolism of nitrofurantoin by rat lung and liver in vitro. *Biochem Pharmacol* 35(4): p. 575-80, 1986.
23. Neuzil, J., J.M. Gebicki, and R. Stocker. Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochem J* 293 (Pt 3): p. 601-6, 1993.
24. Barzilai, A. and K.-I. Yamamoto. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 3(8-9): p. 1109-1115,
25. Ozdemirler, G., H. Pabuccuoglu, T. Bulut, D. Bugra, M. Uysal, and G. Toker. Increased lipoperoxide levels and antioxidant system in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 124(10): p. 555-9, 1998.
26. Aw, T.Y. Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol Appl Pharmacol* 204(3): p. 320-8, 2005.
27. Ruel, G., S. Pomerleau, P. Couture, B. Lamarche, and C. Couillard. Changes in plasma antioxidant capacity and oxidized low-density lipoprotein levels in men after short-term cranberry juice consumption. *Metabolism* 54(7): p. 856-61, 2005.
28. Stoclet, J.-C., T. Chataigneau, M. Ndiaye, M.-H. Oak, J. El Bedoui, M. Chataigneau, and V.B. Schini-Kerth. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology* 500(1-3): p. 299-313, 2004.
29. Doll, U., H. Vogel, P. Jeldres, and M. Muñoz. Estudios de Propagación Vegetativa en Matico (*Buddleja globosa*). *Ciencia e Investigación Agraria: Revista Latinoamericana de Ciencias de la agricultura*. 30(3): p. 211-216, 2003.
30. Hoffmann, A., C. Farga, J. Lastra, and E. Veghazi, *Plantas Medicinales de uso común en Chile*. Second edition ed, ed. A. Hoffman. 1992, Santiago, Chile: Ediciones Fundación Claudio Gay.

31. Houghton, P.J., P.J. Hylands, A.Y. Mensah, A. Hensel, and A.M. Deters. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *J Ethnopharmacol* 100(1-2): p. 100-7, 2005.
32. Montes, M., Wilkomirsky, T. *Medicina Tradicional Chilena*. Concepción: Ed. Universidad de Concepción, 1987. p. 58-59.
33. Muñoz, O., Montes, M. Wilkomirsky, T. *Plantas medicinales de uso en Chile – Química y Farmacología*. Santiago de Chile: Ed. Universitaria, 2001. p. 69-72.
34. Bitis, L., S. Kultur, G. Melikoglu, N. Ozsoy, and A. Can. Flavonoids and antioxidant activity of *Rosa agrestis* leaves. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 24(6): p. 580 - 589, 2010.
35. Galleano, M., S.V. Verstraeten, P.I. Oteiza, and C.G. Fraga. Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* In Press, Corrected Proof, 2010.
36. Letelier, M.E., P. Entrala, C. Lopez-Alarcon, V. Gonzalez-Lira, A. Molina-Berrios, J. Cortes-Troncoso, J. Jara-Sandoval, P. Santander, and L. Nunez-Vergara. Nitroaryl-1,4-dihydropyridines as antioxidants against rat liver microsomes oxidation induced by iron/ascorbate, nitrofurantoin and naphthalene. *Toxicol In Vitro* 21(8): p. 1610-8, 2007.
37. Benzie, I.F. and J.J. Strain. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239(1): p. 70-6, 1996.
38. Letelier, M.E., A.M. Lepe, M. Faundez, J. Salazar, R. Marin, P. Aracena, and H. Speisky. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem Biol Interact* 151(2): p. 71-82, 2005.
39. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): p. 265-75, 1951.

40. Wallach, J.B., Interpretation of diagnostic tests. 8th ed. 2007, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. xiii, 1181 p.
41. Baynes, J. and M. Dominiczak, Medical Biochemistry. Second Edition ed. 2004, Philadelphia: Elsevier.
42. Zitzmann, S., I.R. Reimann, and H. Schmechel. Severe hypoglycemia in an elderly patient treated with metformin. *Int J Clin Pharmacol Ther* 40(3): p. 108-10, 2002.
43. Backhouse, N., L. Rosales, C. Apablaza, L. Goity, S. Erazo, R. Negrete, C. Theodoluz, J. Rodriguez, and C. Delporte. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, *Buddlejaceae*. *J Ethnopharmacol* 116(2): p. 263-9, 2008.
44. Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, and T.C. Theoharides. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52(4): p. 673-751, 2000.
45. Schafer, F.Q. and G.R. Buettner. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30(11): p. 1191-212, 2001.
46. Letelier, M.E., S. Sánchez-Jofré, L. Peredo-Silva, J. Cortés-Troncoso, and P. Aracena-Parks. Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chem Biol Interact* (en prensa), 2010.
47. Letelier, M.E., A. Molina-Berrios, J. Cortes-Troncoso, J. Jara-Sandoval, A. Müller, and P. Aracena-Parks. Comparative effects of superoxide anion and hydrogen peroxide on microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities of rat liver. *Biol Trace Elem Res* 134(2): p. 203-211, 2010.