



11261

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

5  
29.

**“EFECTO DE LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES) SOBRE SISTEMAS PRODUCTORES DE RADICALES LIBRES in vitro POR MEDIO DE ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA PARAMAGNETICA ELECTRONICA (EPR)”.**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
**BIOMEDICAS (BIOQUIMICA)**

**PRESENTA EL MEDICO CIRUJANO**  
**MIGUEL CASTREJON SOSA**

**MEXICO, D. F.**

**1998**

269362

**TESIS CON**  
**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE.

Comité Evaluador.....	
Dedicatoria.....	
Agradecimientos.....	
Resumen.....	i.
I. Antecedentes.....	1.
A. Las especies reactivas derivadas de oxígeno.....	1.
1. Características y naturaleza química.....	1.
2. Producción y efectos en los sistemas biológicos.....	3.
3. Especies reactivas derivadas de oxígeno y enfermedad.....	9.
B. Los Antiinflamatorios no esteroideos.....	11.
C. La Espectroscopía de Resonancia Parmagnética Electrónica..	16.
II. Justificación.....	22.
III. Hipótesis.....	23.
IV. Objetivos.....	24.
V. Materiales y métodos.....	26.
A. Efecto del Piroxicam.....	26.
1. Experimentos con PBN.....	26.
a) Autooxidación de la Fenilhidracina.....	26.
b) Reacción de Fenton.....	26.
2. Experimentos con DMPO.....	27.
a) Reacción de Fenton.....	27.
b) Efecto de los quelantes de metales divalentes.....	27.
B. Efecto de otros AINES.....	28.
C. Condiciones Espectrométricas.....	28.
D. Otras consideraciones.....	29.
VI. Resultados.....	30.
A. Efecto del Piroxicam.....	30.
1. Experimentos con PBN.....	30.
a) Autooxidación de la Fenilhidracina.....	30.
b) Reacción de Fenton.....	30.
2. Experimentos con DMPO.....	33.
a) Reacción de Fenton.....	33.
b) Efecto de los quelantes de metales divalentes.....	36.
B. Efecto de otros AINES.....	36.
VII. Discusión.....	44.
A. Efecto del Piroxicam.....	44.
1. Experimentos con PBN.....	44.
a) Autooxidación de la Fenilhidracina.....	44.
b) Reacción de Fenton.....	44.
2. Experimentos con DMPO.....	45.
a) Reacción de Fenton.....	45.
b) Efecto de los quelantes de metales divalentes.....	47.
B. Efecto de otros AINES.....	48.
VIII. Conclusiones.....	50.
IX. Bibliografía.....	51.
IX. Apéndice.....	59.

TESIS PARA LA MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(BIOQUIMICA).

COMITE EVALUADOR.

DR. ROLANDO HERNANDEZ MUÑOZ  
Presidente.

DR. WILHELM HANSBERG TORRES  
Secretario.

DR. ENRIQUE PIÑA GARZA  
Vocal.

DR. MARCO ANTONIO JUAREZ OROPEZA  
Suplente.

DR. LUIS LLORENTE PETERS  
Suplente.

A mis padres,  
Doña Guadalupe y Don Miguel,  
por empujarme siempre en el camino.

A mis abuelos,  
Doña Lila y Don Luis,  
por darme la luz para recorrerlo.

A mi esposa,  
Doña Lucía,  
por nunca dejarme solo al caminar.

A mi hermana,  
Ana Karina,  
por recordarme la razón para andar.

A mis maestros,

Don Enrique Piña Garza,  
Don Trifón de la Sierra Ramírez,  
Don Arturo Angeles Angeles,  
Don David Bialostozky Krichevsky,  
Don Francisco Javier Gómez Pérez,  
Don Roger Anaya Galindo,

nunca hubiera encontrado la mejor ruta sin ustedes.

A mis amigos,

Don Miguel Angel Torti Sánchez,  
Don Roberto Alfonso Suástegui Román,  
Doña Beatriz Reyes Chávez,  
Don José Gutiérrez Salinas,

por siempre ser el descanso al marchar.

A todos mis alumnos,  
por ser el destino al final.

No se puede ser maestro...sin alumnos.

"El que un ser humano ame a otro es la más difícil de nuestras tareas...la última y definitiva prueba; el trabajo para el cual todo el demás trabajo no es nada sino preparación".

Rainer María Rilke.  
"A life".

"El conocimiento es nuestro destino."

Carl Sagan.  
"Broca's Brain".

"I know there's a place you walk where love falls from the trees,  
my heart is like a broken cup, I only feel right on my knees;  
I spit out like a sewer hole, yet still receive your kiss...  
how can I measure up to anyone now after such a love as this?"

Peter Dennis Blanford Townshend.  
"Who are you".

"Licht, mehr licht!"

Johann Wolfgang Goethe.  
"Goethe".

## AGRADECIMIENTOS.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Enrique Piña Garza, del Dr. Eduardo Muñoz Picone y de la Dra. Martha Zentella de Piña, y se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y en el Departamento de Estado Sólido del Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Parte de este trabajo se realizó gracias al apoyo de un donativo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de esta Universidad. El sustentante de la Tesis fué objeto de una Beca-Crédito de manutención de apoyo al Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Estoy en deuda con el M. en C. Roberto Raúl Gleason Villagrán y con el Dr. José Luis Boldú Olaizola, del Departamento de Estado Sólido del Instituto de Física, quienes participaron sustancialmente en la realización de este trabajo, tanto en la parte experimental como en el trabajo académico; sin ellos, esta tesis nunca hubiera visto la luz.

Quiero agradecer también la participación de Orison Rodrigo Huerta Encinas, Jorge Alberto Velázquez Ortiz y María Teresa Ramírez Montagut, quienes en diferentes etapas del trabajo experimental colaboraron con lo mejor de su esfuerzo.



## RESUMEN.

Las especies de oxígeno reactivas son compuestos más reactivos que el oxígeno en su estado basal que cada vez adquieren más importancia en el área del conocimiento biomédico. Esta importancia radica no sólo en los beneficios derivados de su producción como elementos de defensa contra agresores del medio ambiente, sino debido a su participación en procesos patológicos. En este sentido, cabe destacar el daño hepático mediado por el etanol. Algunas de las enfermedades hepáticas relacionadas con el alcoholismo son irreversibles, progresivas y de graves consecuencias para el individuo. No obstante, su prevalencia es alta, dado el elevado consumo de etanol a nivel mundial.

Las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINEs) son compuestos utilizados ampliamente en el tratamiento inespecífico de diversas condiciones inflamatorias. Muchos de sus efectos terapéuticos se han explicado por su acción inhibitoria de la síntesis de las prostaglandinas y los tromboxanos. Sin embargo, también pueden tener otros mecanismos de acción, como la interacción con diversos mediadores intracelulares. La diversidad química de estos fármacos sugiere diferentes mecanismos de acción.

Recientemente, se reportó que el piroxicam, un AINE, puede prevenir los cambios mediados por los radicales libres derivados del metabolismo hepático del etanol durante la intoxicación alcohólica aguda experimental en ratas; otras drogas del mismo grupo mostraron efectos similares. El mecanismo preciso de tales efectos no se conoce. Otras drogas han mostrado una capacidad para quelar metales de transición o de recolectar radicales libres. El presente trabajo se realizó con el objetivo de conocer los posibles mecanismos de acción a nivel molecular por los que el piroxicam reduce la producción de radicales libres hidroxilo e hidroxietilo in vitro.

Se efectuaron experimentos con sustancias atrapadoras de radicales libres y se siguió el proceso de autooxidación de la fenilhidracina y la reacción de Fenton por Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica, en presencia del piroxicam.

El piroxicam incrementó la producción de radicales libres durante la autooxidación de la fenilhidracina y la disminuyó en el sistema de la reacción de Fenton a una concentración alta. Dado que el piroxicam fue capaz de iniciar la autooxidación de la fenilhidracina en ausencia de metales de transición se descartó la posibilidad de una interacción del AINE con los

mismos. Estos resultados sugieren que el piroxicam actúa como un recolector(scavenger) de los radicales libres hidroxilo e hidroxietilo.

También se evaluó la influencia del piroxicam y de otros AINES, representantes de las siete familias de estas drogas, sobre la producción de los radicales hidroxilo e hidroxietilo, en la reacción de Fenton. Las otras drogas utilizadas fueron: ácido acetilsalicílico, naproxeno, diclofenac, fenilbutazona, ácido mefenámico y nimesulide.

De entre estas drogas, sólo el piroxicam mostró la capacidad de reducir la concentración de radicales libres oxígeno y carbono centrados de manera dependiente de la dosis, así como de generar otros radicales libres. Nuevamente, se descartó un efecto de los metales de transición usando quelantes de cationes divalentes durante el ensayo. Los otros AINES no mostraron efectos significativos a las concentraciones utilizadas.

Se concluyó que el piroxicam es un atrapador de radicales hidroxilo y que forma especies de radicales menos reactivas. Esto puede explicar los efectos encontrados anteriormente a este trabajo en condiciones in vivo. Otros AINES no mostraron estos efectos.

En la actualidad se carece de una estrategia terapéutica efectiva para el tratamiento de las enfermedades hepáticas relacionadas con el alcoholismo. El piroxicam puede ser útil en el tratamiento de dichas enfermedades.

## I. ANTECEDENTES.

### A. LAS ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DE OXIGENO.

#### 1. Características y naturaleza química.

Las reacciones de los compuestos orgánicos con el oxígeno atmosférico son importantes de procesos químicos. La respiración y la combustión son probablemente los más conocidos. Existen también procesos menos espectaculares que estos, que no conducen a la degradación total de la materia orgánica hasta bióxido de carbono y agua. Muchos de estos procesos ocurren de manera espontánea y por ello se les conoce como autooxidaciones. A excepción de algunas oxidaciones fotoquímicas y las de ciertos compuestos organometálicos, las autooxidaciones de la mayoría de los compuestos orgánicos es producida por procesos en cadena en los que intervienen radicales libres (1).

Los radicales libres son átomos o moléculas que poseen uno o más electrones no apareados. Esto es un número impar de electrones. Los electrones de cada orbital tienen un sentido de rotación sobre su eje (giro) opuesto entre sí, esto es, anti-paralelo. El sentido de rotación puede ser siguiendo las manecillas del reloj (giro =  $+1/2$ ) o contrario a éste (giro =  $-1/2$ ). El giro electrónico induce un campo magnético que se representa con un vector. Los campos magnéticos generados por un par de electrones con giro opuesto se anulan recíprocamente (giro =

0). Un aporte de energía química, luminosa ó térmica puede romper el acoplamiento de un par electrónico, dando lugar a la formación de un radical con un momento magnético neto igual al de los electrones no apareados (1).

Los radicales son generalmente reactivos y tienden a completar un par electrónico. Esto lo logran reaccionando con otro radical o sustrayendo un electrón de otra molécula, la cual es convertida en un radical. Esto da lugar a reacciones en cadena entre diversas moléculas, proceso llamado de autopropagación (1).

El oxígeno es uno de los elementos capaz de dar origen a una variedad de radicales libres debido particularmente a su reactividad (Figura 1). Dentro del ambiente celular, las especies reactivas derivadas de oxígeno se pueden generar durante los procesos de óxido-reducción que se llevan a cabo en los diversos compartimentos intracelulares (2).

El dióxígeno ( $O_2$ ) es un birradical, ya que posee dos electrones no apareados en sus últimos orbitales, ambos con el mismo giro (paralelo). Esta situación impide que el dióxígeno capte dos electrones simultáneamente puesto que un donador de un par de electrones cede necesariamente un par antiparalelo. Por esta razón, el dióxígeno en su estado basal sólo puede intervenir en reacciones univalentes. Es por ello que muchas de las oxidasas y de las oxigenasas celulares contienen metales de transición

en su sitio activo (2).

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido en agua por la acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial. Durante esta reducción se generan intermediarios parcialmente reducidos. Estos quedan unidos al sitio activo de la enzima y no difunden al resto de la célula. Cuando una molécula de dioxígeno acepta un electrón, se convierte en un radical con carga negativa, el anión superóxido ( $O_2^{\bar{\cdot}}$ ). Cuando el superóxido capta un electrón se produce el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  no es un radical libre. Su importancia radica en que, por captación de un electrón puede dar lugar a la formación de un radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), que es sumamente reactivo. Por absorción de energía, el dioxígeno puede convertirse en otra molécula muy reactiva, el oxígeno en singulete ( $^1O_2^*$ ) (3).

## 2. Producción y efectos en los sistemas biológicos.

Una pequeña proporción del oxígeno que entra a la mitocondria forma el anión superóxido (1-2%). Sin embargo, la fuente más importante de producción del radical superóxido es muy probablemente la fagocitosis leucocitaria (4, 5, 6) (Figura 2). En la membrana citoplásmica de estas células se encuentra un complejo enzimático denominado NADPH-oxidasa, que cataliza la reacción siguiente (a):

ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXIGENO.

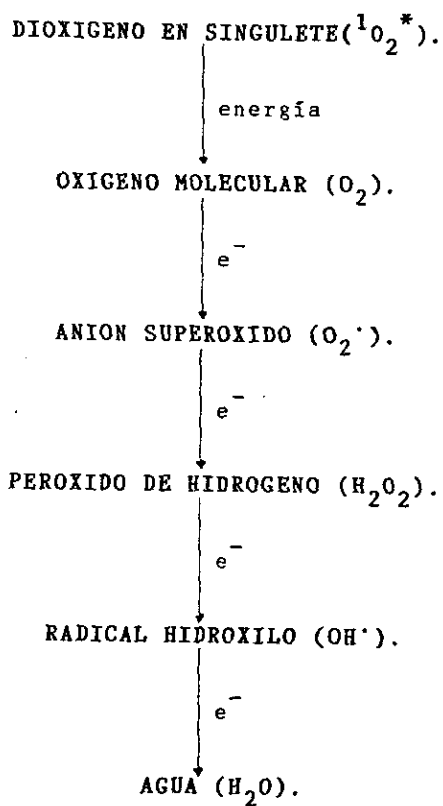
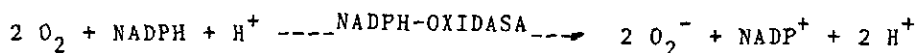
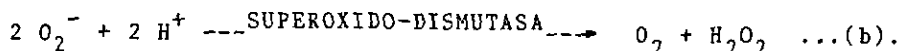


FIGURA 1.- Especies reactivas derivadas del oxígeno.

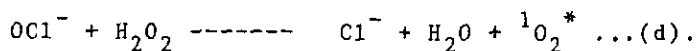


...(a).

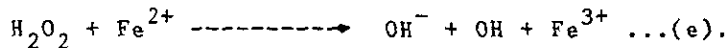
La presencia en el fagocito de la enzima superóxido dismutasa produce la siguiente reacción (b):



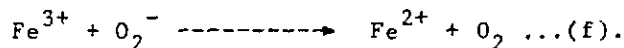
Los fagocitos contienen también la mieloperoxidasa, que utiliza el poder oxidativo del peróxido de hidrógeno para transformar los halogenuros en hipohalogenuros, según las siguientes reacciones (c,d):



El peróxido de hidrógeno formado en la reacción (b) en presencia de metales de transición ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ), da lugar a la Reacción de Fenton (e):



En esta reacción, conocida desde 1894, se produce el radical hidroxilo. Por otro lado, el radical superóxido reduce al hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (f) (7):



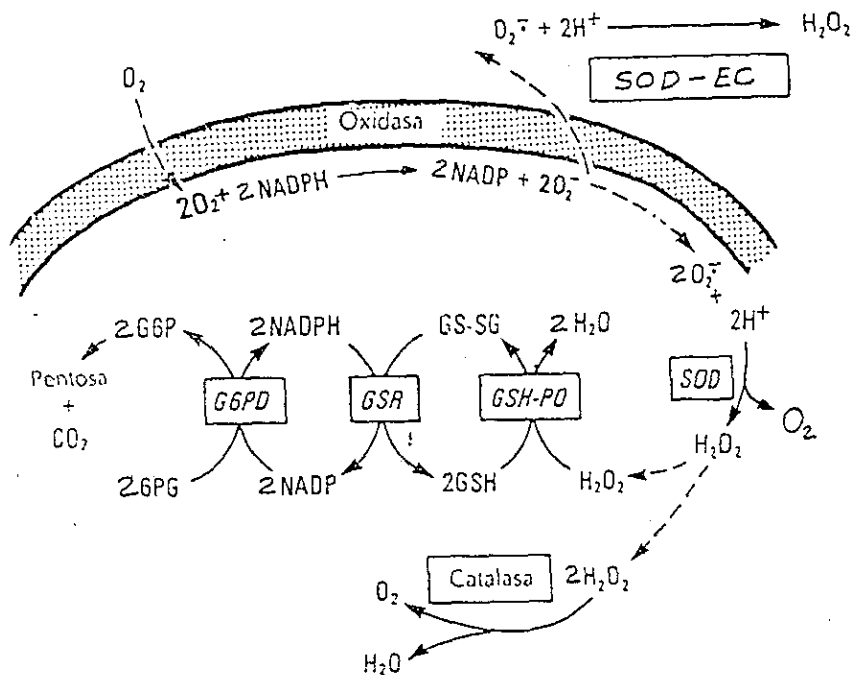


FIGURA 2.- Mecanismos de producción de las especies de oxígeno reactivas en los leucocitos.  $O_2$ , dióxigeno;  $O_2^{\cdot -}$ , anión superóxido;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno;  $H_2O$ , agua; NADP(H), forma oxidada del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida); GSSG (GSH), disulfuro de glutatión (forma reducida); 6PG, glucosa 6-fosfato; G6P, 6-fosfogluconato; SOD, superóxido dismutasa; GSH-PO, glutatión peroxidasa; GSR, glutatión reductasa; G6PD, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa/6-fosfogluconato deshidrogenasa;  $CO_2$ , bióxido de carbono.



La descomposición del peróxido de hidrógeno en el radical hidroxilo junto con con la regeneración del  $\text{Fe}^{2+}$  por medio del radical superóxido, constituye el Ciclo de Haber-Weiss (g) (8):

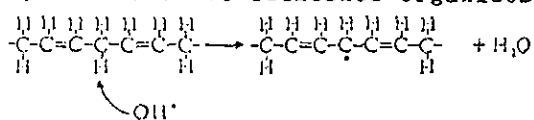


La coexistencia del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición es de suma importancia fisiopatológica. Esto es debido a que el radical hidroxilo que se forma es un oxidante extremadamente reactivo que interactúa con casi todas las moléculas intracelulares (4).

Como el oxígeno en singulete carece de electrones desapareados, no es un radical de oxígeno. Sin embargo, es muy reactivo y se forma cuando algunos pigmentos biológicos (como la clorofila, el retinal, las flavinas y las porfirinas) son iluminados en presencia de dióxígeno. El  $^1\text{O}_2^*$  es muy oxidante frente a muchas moléculas biológicas, sobre todo los lípidos de las membranas. Además se tiende a formar en los tejidos y órganos sometidos a radiaciones ionizantes (9).

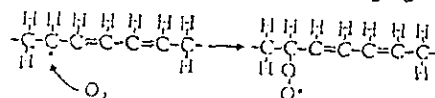
Las membranas celulares contienen ácidos grasos poliinsaturados que son muy vulnerables a la peroxidación, ya que los enlaces dobles carbono-carbono debilitan la unión carbono-hidrógeno del átomo de carbono vecino (Figura 3). El radical hidroxilo al atacar los ácidos grasos insaturados, sustrae un átomo de hidrógeno y crea un nuevo radical orgánico. Este es estabilizado

a) Formación de radicales orgánicos :



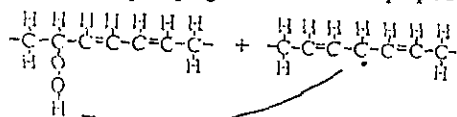
Lípido insaturado      Radical orgánico

b) Formación de dienos conjugados y peroxilos:



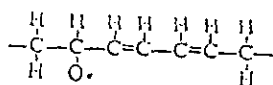
Dieno conjugado      Radical peroxilo

c) Autopropagación de lipoperóxidos:



Hidroperóxido      Nuevo radical orgánico

d) Descomposición de hidroperóxidos en alcoxilos:



Radical alcoxilo

FIGURA 3.- Mecanismos de lipoperoxidación membranar.

por un rearrreglo interno produciendo un dieno conjugado, el dieno conjugado, el cual reacciona rápidamente con el dióxígeno para dar un radical peroxilo (ó dioxilo).

El radical lipoperoxilo puede atacar a un lípido vecino, sustrayendo un átomo de hidrógeno, para producir un hidroperóxido y un nuevo radical. Los hidroperóxidos lipídicos son estables en estado puro, pero en presencia de metales de transición (como el hierro ó cobre) se descomponen, dando un radical alcoxilo. Tanto los radicales peroxilos como alcoxilos estimulan la reacción en cadena, al sustraer átomos de hidrógeno de otros lípidos (9).

Tanto los radicales peroxilos como los alcoxilos estimulan la reacción en cadena, al sustraer átomos de hidrógeno de otros lípidos. Es posible que también el oxígeno en singulete sea un iniciador de la reacción en presencia de pigmentos orgánicos (9).

### 3. Especies reactivas derivadas de oxígeno y enfermedad.

Los cambios que las especies reactivas derivadas de oxígeno producen en las membranas celulares han sido implicados en diversos estados fisiopatológicos. La producción de especies reactivas derivadas de oxígeno por los leucocitos está destinada a destruir microorganismos fagocitados. Sin embargo, esta defensa puede causar consecuencias deletéreas para los leucocitos y

otras células. De hecho, la infección está comúnmente asociada a la inflamación y este tipo de daño está relacionado, no sólo con el poder patógeno de los microorganismos, sino también con la actividad de las células de defensa. Como hay un ataque a las membranas celulares, se produce liberación al medio de las especies reactivas derivadas de oxígeno, que pueden despolimerizar el ácido hialurónico y la colágena de los espacios intercelulares. Por otro lado, existe evidencia experimental que indica que el superóxido es una parte importante del mecanismo inflamatorio en las enfermedades inmunológicas como la artritis reumatoide. También, las especies reactivas derivadas de oxígeno tienen un papel en la mutagénesis y carcinogénesis debido a su capacidad para producir alteraciones en el material genético (10). También, se ha encontrado que las especies reactivas derivadas de oxígeno se encuentran involucradas en el daño hepático inducido por tóxicos, como el tetracloruro de carbono y el etanol (11).

Resulta relevante mencionar que se conoce que la intoxicación aguda por etanol incrementa la lipoperoxidación de fosfolípidos de las membranas de los hepatocitos. Las células hepáticas poseen varios sistemas microsomales que metabolizan el etanol (sistema de la NADPH-citocromo C reductasa, sistema del citocromo P-450, sistema de la NADPH oxidasa) (12, 13), así como enzimas citosólicas involucradas en el metabolismo del acetaldehído, derivado metabólico del etanol (aldehído oxidasa, xantín oxidasa). Algunas de estas enzimas son capaces de producir especies reactivas derivadas del oxígeno y por lo tanto de causar la

lipoperoxidación (Figura 4). Se ha demostrado por métodos indirectos, que la intoxicación aguda por etanol se acompaña de un incremento en la producción de superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

## B. LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS.

Las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINES) son medicamentos ampliamente utilizados en el tratamiento inespecífico de diversos estados inflamatorios. La mayor parte de sus efectos terapéuticos han sido explicados por su capacidad para la producción de mediadores químicos de la respuesta inflamatoria (prostaglandinas, tromboxanos). Sin embargo, desde hace algún tiempo, se ha venido demostrando la existencia de otros mecanismos para explicar dichos efectos, como la interacción directa con metabolitos intracelulares producidos en respuesta a los mediadores antes mencionados (22, 23, 24).

Existen en la actualidad siete familias de AINES descritas en las que estos fármacos se clasifican de acuerdo a su naturaleza química (Figura 5). Estas son:

- 1) Salicilatos (Ej.- Acido acetilsalicílico).
- 2) Pirazolonas (Ej.- Fenilbutazona).
- 3) Derivados del ácido propiónico (Ej.- Naproxén).
- 4) Fenamatos (Ej.- Acido Mefenámico).

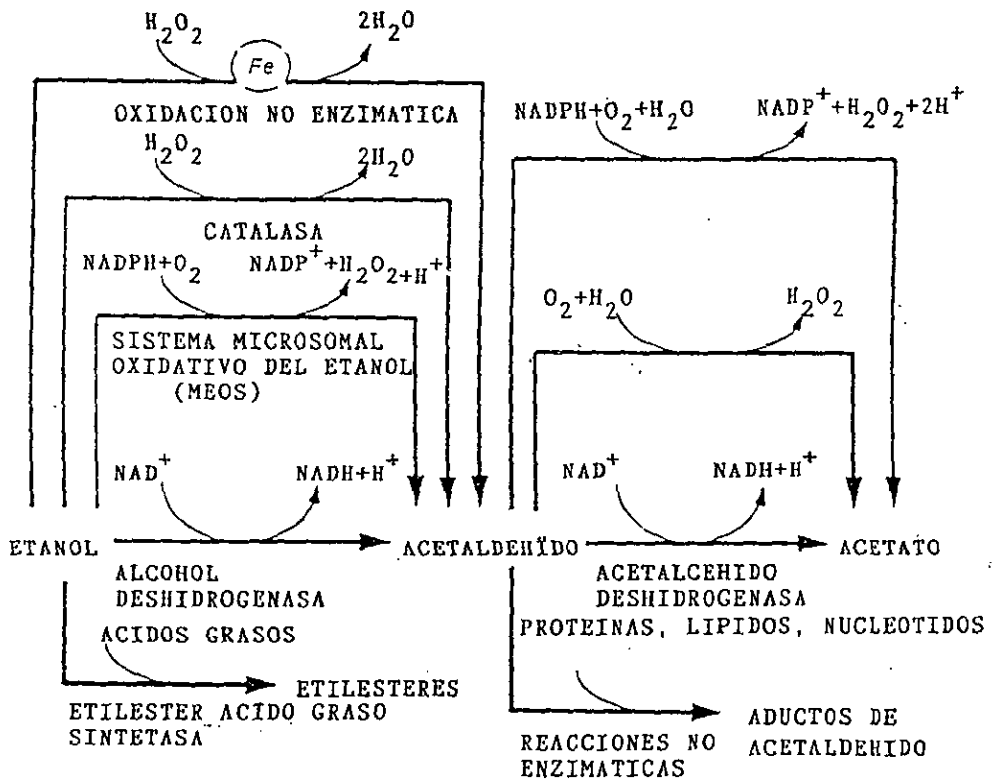


FIGURA 4.- Principales vías metabólicas relacionadas con el metabolismo del etanol y del acetaldehído.  $O_2$ ; oxígeno molecular;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno;  $H_2O$ , agua;  $NAD(H)$ , forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida);  $NADP(H)$ , forma oxidada del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida).

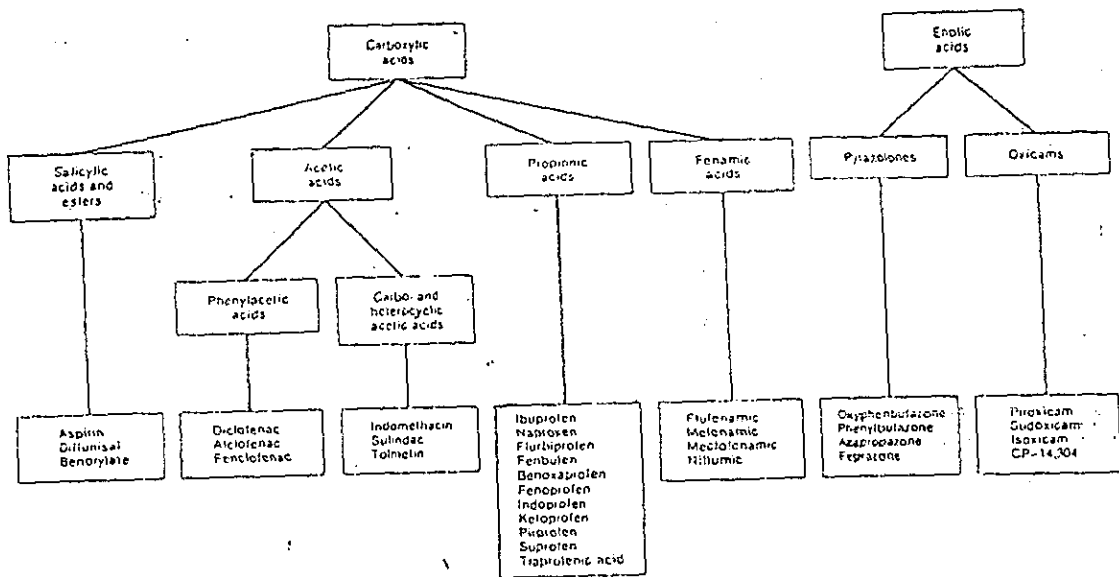


FIGURA 5.- Familias de los Antiinflamatorios No Esteroides (AINEs).

5) Derivados del ácido acético (Ej.- Diclofenac).

6) Oxicames (Ej.- Piroxicam).

7) Nimesulfídicos (Ej.- Nimesulide).

Todos ellos poseen diferentes propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas. La diversidad química de estos fármacos es sugiere diferentes mecanismos de acción (24).

Recientemente, se ha descubierto que el piroxicam (4-hidroxi-2-metil-N-2-piridil-2H-1,2-benzotiacina-3-carboxamida-1,1-dióxido)(Figura 6)(25), en concentraciones dentro del rango terapéutico(i.e. 100  $\mu$ M), inhibe el incremento en la formación de compuestos derivados de la lipoperoxidación inducida por la ingesta aguda de etanol en ratas (26). Aunque en la actualidad se ha visto que otros AINES (ácido acetilsalicílico, naproxen, nimesulide y dipirona) inducen efectos similares, el mecanismo molecular preciso a través del cual lo hacen no se conoce (27).

Mediante técnicas de radiólisis en soluciones acuosas diluídas, se demostró que algunos de estos AINES (ácido acetilsalicílico, D-penicilamina, indometacina, flubiprofeno, ácido metiacínico) son capaces de formar complejos moleculares estables con el radical hidroxilo y convertirse en una nueva especie de radical libre por autopropagación (28). Sin embargo, no se sabe si todas las drogas de este grupo muestran este efecto recolector (scavenger), ni si éste es reproducible en los sistemas in vivo.



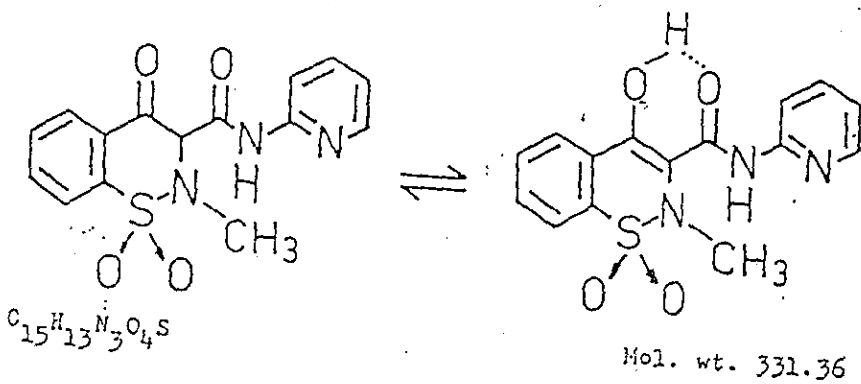


FIGURA 6.-Estructura química del Piroxicam (4-hidroxi-2-metil-N-(2-piridil)-2H-1,2-benzotiacil-3-carbamil-1,1-dióxido).

En algunos estudios realizados en sistemas generadores de radicales libres (autooxidación de la fenilhidracina, Reacción de Fenton) in vitro, se encontró que el captopril, una droga utilizada para el tratamiento de la hipertensión, considerado inicialmente como un atrapador de radicales libres, en realidad inhibía la la producción de los mismos quelando a los metales de transición utilizados como donadores de electrones en dichos sistemas. Este sería un mecanismo alternativo para las drogas capaces de inducir algunos efectos similares (29, 30).

### C. LA ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA PARAMAGNETICA ELECTRONICA.

Existen diversas técnicas para medir la producción de los radicales libres in vivo e in vitro. Algunas de ellas utilizan las propiedades reactivas de los radicales para generar derivados estables susceptibles de ser medidos fácilmente, mediante técnicas bioquímicas. Dado que en la mayoría de los casos las especies reactivas derivadas de oxígeno tienen una vida media sumamente corta, estas técnicas indirectas (como la espectrofotometría han ganado mucha aceptación (31).

La detección e identificación directa de los radicales libres de vida media corta ha sido posible utilizando técnicas de Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) La RPE permite determinar los compuestos capaces de emitir radiación electromagnética de baja energía, esto es, en el intervalo de las microondas ( $\lambda = 1-300\text{mm}$ ;  $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-5}$  eV) (Figura 7). La RPE permite determinar cualquier compuesto que tenga

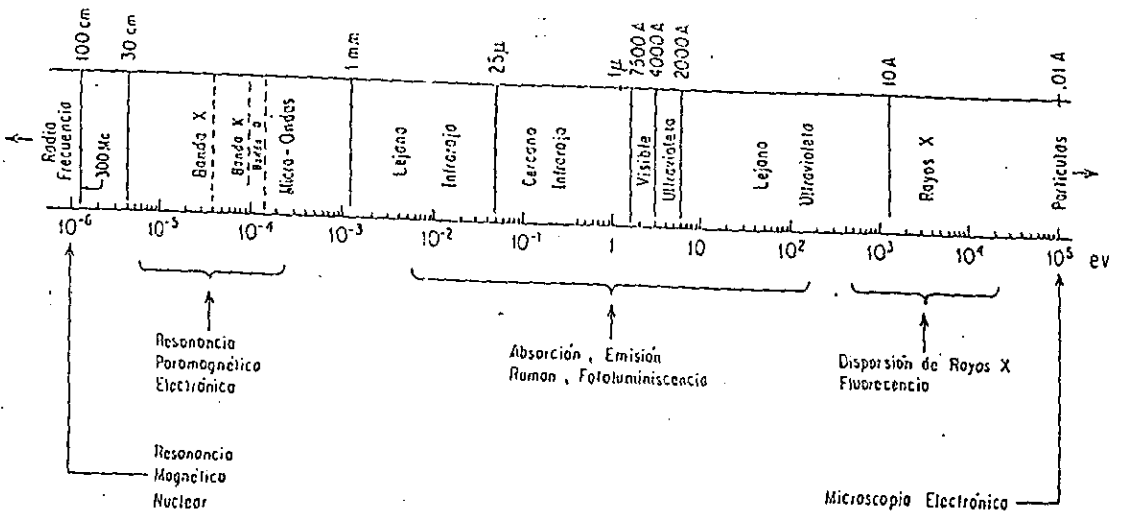


FIGURA 7.- Localización de la Espectroscopia por Resonancia Parmagnética Electrónica (EPR) en el espectro de la Radiación Electromagnética. La energía de onda se señala en electrón Volts (eV) y la longitud de onda en Armstrongs ( $\text{Å}$ ). Se señala también la relación que tiene con otras técnicas Espectroscópicas.

un spin diferente de 0, esto es, un número de electrones impar, registrando la emisión electromagnética producida por un electrón a muy alta resolución. La RPE constituye una herramienta sumamente sensible para la determinación de radicales libres. Dado que cada compuesto posee un espectro electromagnético particular, la técnica permite también identificar diferentes especies de radicales (32).

Desde hace más de veinte años, se han utilizado dos técnicas para la detección e identificación de concentraciones bajas de radicales libres de vida media corta: Resonancia Magnética Nuclear y Atrapamiento de Radicales. La primera depende de la polarización del giro nuclear por el electrón desapareado. En la segunda, interviene una sustancia conocida como atrapador de radicales que, al reaccionar con el radical de vida media corta forma un radical más estable (Figura 8). Este nuevo radical formado recibe el nombre de aducto y sus parámetros de descomposición hiperfina permiten su identificación (Figura 9). Para esta última técnica se puede utilizar el equipo de RPE convencional (33, 34).

En algunos estudios anteriores utilizando RPE y atrapadores de radicales (35), se demostró que el ibuprofén (ácido 2-(4-isobutil-fenil)propanoico), otro AINES perteneciente a la familia de los derivados del ácido propiónico, era capaz de recolectar radicales hidroxilos y formar un radical estable. Si este radical resulta ser menos reactivo que el producido inicialmente,

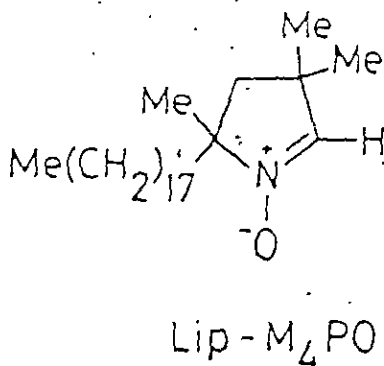
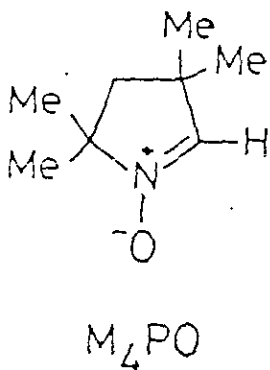
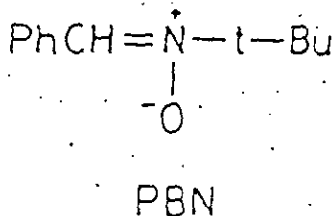
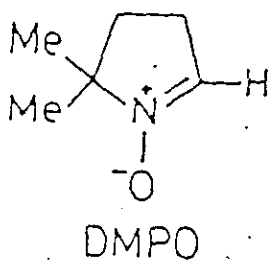
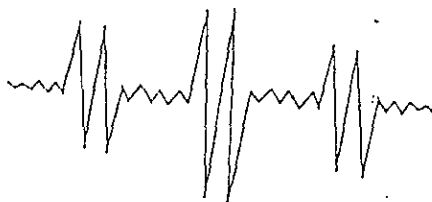


FIGURA 8.- Algunos Atrapadores de Radicales Libres. DMPO, 5,5-dimetil-pirrolin-N-óxido; PBN, fenil-tert-butilnitrona; M<sub>4</sub>PO, 3,3,5,5-tetrametil-pirrolin-N-óxido; Lip-M<sub>4</sub>PO, 3,3,5-trimetil-5-metil-lipoil-N-óxido.

esto pudiera ser un mecanismo alternativo para explicar los resultados obtenidos en los estudios previamente mencionados (26, 27).

9a.



9b.

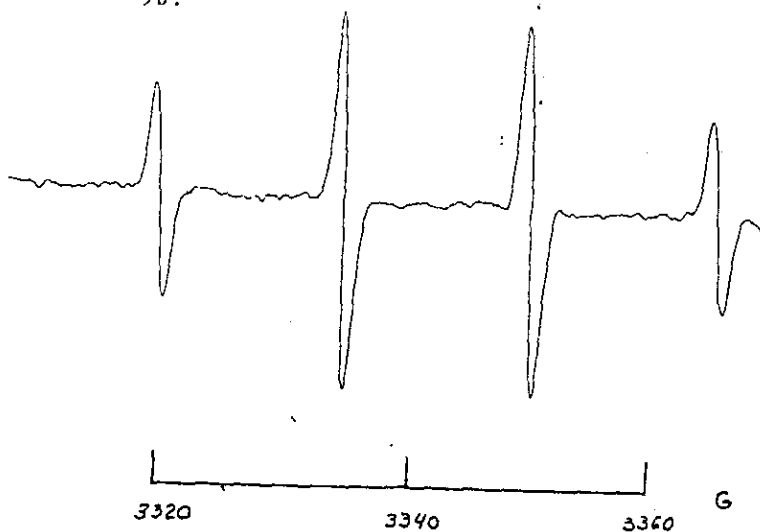


FIGURA 9.- Patrón de descomposición hiperfino de la señal del espectro característico de diferentes aductos y atrapadores de radicales. 9a) muestra dicho patrón para el aducto de radicales derivados de la autooxidación de la fenilhidracina con fenil-tert-butilnitrona (PHE'-PBN); 9b) muestra el patrón correspondiente al aducto de radicales hidroxilo derivados de un sistema de reacción de Fenton con 5,5-dimetil-pirrolin-N-óxido (HO'-DMPO).

## II. JUSTIFICACION.

Se conoce que el piroxicam, así como algunos medicamentos relacionados farmacológicamente con él, son capaces de prevenir los cambios inducidos por radicales libres derivados de oxígeno en la intoxicación aguda por etanol en la rata; este efecto podría deberse a un mecanismo recolector (scavenger) de radicales libres. Otras drogas, en cambio, previenen la producción de los mismos quelando metales de transición). Cualquiera de estos mecanismos induciría efectos similares a nivel celular.

Aunque los antiinflamatorios no esteroideos son medicamentos ampliamente utilizados en la terapéutica actual, muchos de sus efectos intracelulares aún no son conocidos. Por ello resulta de interés caracterizar sus mecanismos de acción a nivel molecular. Esto conduciría a un manejo más racional de estos fármacos y sus aplicaciones se podrían extender para el tratamiento de las enfermedades hepáticas relacionadas con el consumo del etanol y otros tóxicos cuyo metabolismo se encuentre relacionado con la producción de radicales libres.



### III. HIPOTESIS.

El piroxicam es un antiinflamatorio no esteroideo capaz de prevenir el incremento de la lipoperoxidación en hepatocitos de la rata durante la intoxicación aguda por etanol. Sin embargo no se conoce el mecanismo preciso a través del cual ejerce este efecto todavía. Resulta atractivo considerar que la prevención del incremento en la lipoperoxidación se deba a la interacción del piroxicam con las especies reactivas derivadas de oxígeno producidas por el etanol.

Alternativamente, el piroxicam podría quelar metales de transición; los efectos de este mecanismo serían similares a los del anterior.

Otros AINES podrían tener mecanismos similares.

#### IV. OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo consistió en dilucidar los posibles mecanismos de acción del piroxicam y de otros AINES sobre algunos sistemas generadores de radicales libres.

Con el objeto de lograr este objetivo general, se fijaron los siguientes objetivos específicos:

1. Valorar el efecto del medicamento sobre diferentes especies de radicales libres.
2. Realizar curvas dosis-respuesta para valorar la influencia de diversas concentraciones del fármaco, similares a las encontradas en condiciones in vivo, sobre estos sistemas.
3. Valorar si los efectos encontrados en el piroxicam son específicos de la droga ó un efecto común a las otras seis familias de los AINES.

Los sistemas generadores de radicales utilizados fueron el proceso de autooxidación de la fenilhidracina y la Reacción de Fenton.

En el primer sistema, la fenilhidracina, en presencia de algunos metales de transición fué usada para generar radicales fenilo; en el segundo sistema, se generó el radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno.

Para la determinación de los radicales libres, se utilizó la fenil-N-ter-butyl-nitrona (PBN) y al 5,5-dimetil-pirrolin-N-óxido (DMPO) como atrapadores de radicales libres y la RPE.

También, se realizaron estudios similares con drogas consideradas como representativas de las otras seis familias de estos fármacos. Estas fueron las siguientes:

- 1) Acido acetilsalicílico (Familia de los salicilatos).
- 2) Naproxeno (Familia de los derivados del ácido propiónico).
- 3) Fenilbutazona (Familia de las pirazolonas).
- 4) Acido mefenámico (Familia de los fenamatos).
- 5) Diclofenac (Familia de los derivados del ácido acético).
- 6) Nimesulide (Familia de los nimesulídicos).

## V. MATERIALES Y METODOS.

### A. EFECTO DEL PIROXICAM.

#### 1. Experimentos con PBN.

##### a) Autooxidación de la Fenilhidracina.

A una solución de fenilhidracina con una concentración final de 1 mM a un medio acuoso amortiguado con borato de sodio 25 mM a pH 10.2, se le añadió PBN (3 mM) y cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) 0.01 mM para iniciar la reacción, en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$ . Se añadió a esta mezcla aerobia piroxicam a una concentración de 12, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , conservando el mismo volumen (36, 37).

##### b) Reacción de Fenton.

Se utilizó también un amortiguador de fosfato de potasio 150 mM pH 7.4, el cual incluía etanol (100 mM), PBN (10mM), sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) (1 mM) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) para iniciar la reacción (38, 39, 40). En este caso, la incubación se llevó a cabo en una atmósfera anaerobia, lograda en una bolsa de guantes gaseada con nitrógeno. El volumen final de la muestra fue de 400  $\mu\text{l}$ . El piroxicam se añadió a una concentración de 12, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  en el mismo volumen de muestra. Las muestras se extrajeron con 750  $\mu\text{l}$  de tolueno y se tomó una muestra de 350  $\mu\text{l}$  para la determinación de los aductos. Se ha reportado que la extracción con tolueno prolonga la vida media de los

aductos formados con radicales etilo, haciendo más confiables las mediciones espectrométricas (41, 42).

## 2. Experimentos con DMPO.

### a) Reacción de Fenton.

El sistema de reacción contenía sulfato ferroso (1 mM) y DMPO (10 mM) disueltos en un amortiguador de fosfato de potasio (150 mM; pH 7.4), en un volumen final de reacción de 400  $\mu$ L. Se inició la formación de radicales con la adición del  $H_2O_2$  (1 mM). Se llevó a cabo una segunda serie de reacciones en presencia de etanol (100 mM). Los productos de la reacción se midieron después de 4 minutos de incubación a temperatura ambiente, en una atmósfera anaeróbica (43, 44).

### b) Efecto de los quelantes de metales divalentes.

Se evaluó el efecto del ácido dietilén-triamino-pentaacético (DETAPAC), un agente quelante para cationes divalentes, a una concentración 100  $\mu$ M, en la reacción de Fenton con DMPO, para descartar un posible efecto quelante del piroxicam como posible explicación a la disminución en la producción de radicales libres (45).

## B. EFECTO DE OTROS AINES.

Se realizaron experimentos similares utilizando el sistema de la Reacción de Fenton con DMPO, esta vez sin DETAPAC, para valorar el efecto de otros AINES sobre la producción del radical hidroxilo. Las concentraciones utilizadas de los seis fármacos (ASA, NAX, PHB, NMS, MFA y DCF) fueron 6, 12, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  en cada caso. Estas concentraciones se encontraban dentro del rango de uso farmacológico.

## C. CONDICIONES ESPECTROMETRICAS.

En ambos tipos de experimentos, se midieron los productos de reacción después de 4 minutos de incubación a temperatura ambiente. Las determinaciones se llevaron a cabo en un espectrómetro de RPE, Modelo Varian E-Line Century Series E 112, Banda X con una cavidad rectangular  $\text{TE}_{102}$ . Se usó una modulación de 1 Gauss p.p. a 100 kHz, Barrido de 100 Gauss, constante de tiempo de 5 seg., tiempo de barrido de 4 min. El campo central fue de 3339 Gauss. Se usó el espectrómetro y el equipo de RPE del Departamento de Estado Sólido del Instituto de Física de la UNAM, con el cual se colaboró para la realización de este trabajo (46).

#### D. OTRAS CONSIDERACIONES.

Las mediciones efectuadas fueron semicuantitativas dado que no se cuenta con un estándar adecuado. Se determinó el área bajo la curva del espectro registrado que es directamente proporcional a la concentración de los aductos formados durante la reacción. Se hicieron curvas dosis-respuesta, graficando las concentraciones de piroxicam versus la intensidad de la señal obtenida en la determinación (47).

Los reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

## VI. RESULTADOS.

### A. EFECTO DEL PIROXICAM.

#### 1. Experimentos con PBN.

##### a) Autooxidación de la Fenilhidracina.

En este sistema, el piroxicam no alteró la producción de radicales libres cuando se inició la autooxidación de la fenilhidracina con la adición de  $\text{CuCl}_2$ . Cuando se excluyó el  $\text{CuCl}_2$ , la autooxidación de la fenilhidracina se inició con la adición del piroxicam. Al aumentar la concentración de la droga se incrementó concomitantemente la intensidad relativa de la señal de RPE. Esta respuesta indica un incremento en la formación de los aductos y, por lo tanto, en la producción de radicales libres (Figura 10) (47, 50).

##### b) Reacción de Fenton.

Se estudió el efecto del piroxicam en la Reacción de Fenton (Figura 11). En este caso, no se encontró cambios apreciables en la formación de los aductos cuando se utilizaron las tres concentraciones más bajas de la droga (i.e. 12, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ). Al utilizar concentraciones mayores de piroxicam (100 y 200  $\mu\text{M}$ ), se observó una disminución en la producción de radicales libres de un 20 y un 80%, respectivamente (50).



## AUTOOXIDACIÓN DE LA FENILHIDRACINA (PBN)

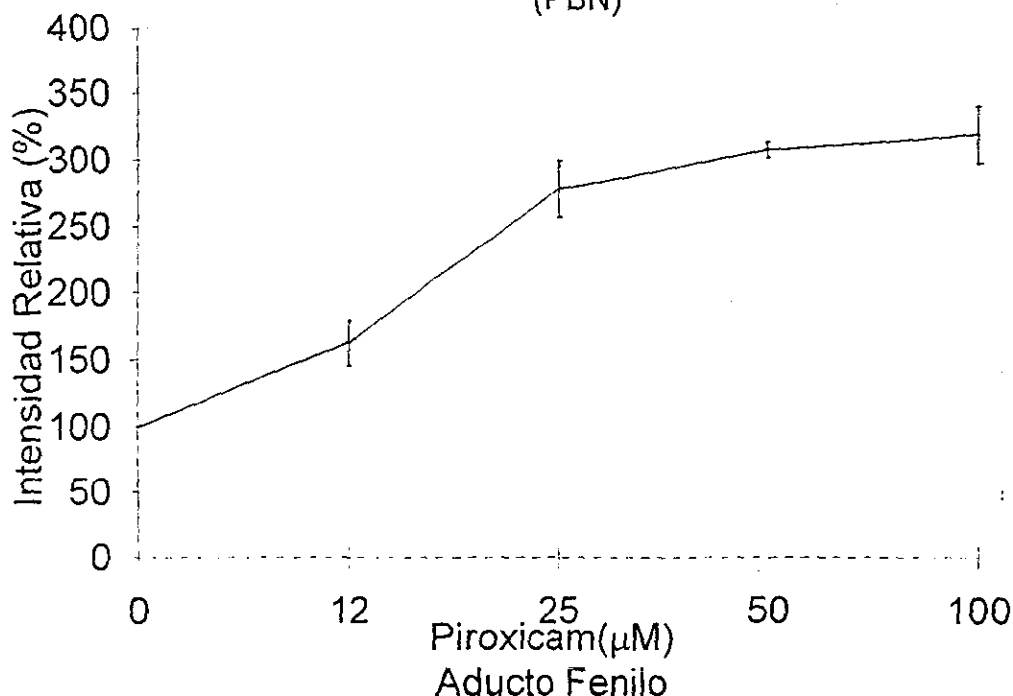


FIGURA 10.- Efecto del piroxicam en la producción de aductos de radicales fenilos con fenil-tert-butilnitrona (PHE'-PBN) durante la autooxidación de la fenilhidracina. La gráfica muestra el efecto de la adición de concentraciones 12, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  del antiinflamatorio al medio de reacción, el cual contenía fenilhidracina (PHE) 1mM, cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) 0.01 mM, fenil-tert-butilnitrona (PBN) 3mM, amortiguador de borato de sodio 25mM a pH 10.2). Nótese la elevación de la intensidad relativa de la señal del espectro de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) correspondiente a los aductos PHE'-PBN de manera dosis-dependiente. Las condiciones de registro fueron: campo central 3330 Gauss; barrido 100 Gauss; frecuencia de modulación 100 KHz; amplitud 1 Gauss p.p.; constante de tiempo 0.25 seg.; tiempo de barrido 4 min. ( $n=4$ ; todos los resultados están expresados como la media  $\pm$  D.S.).

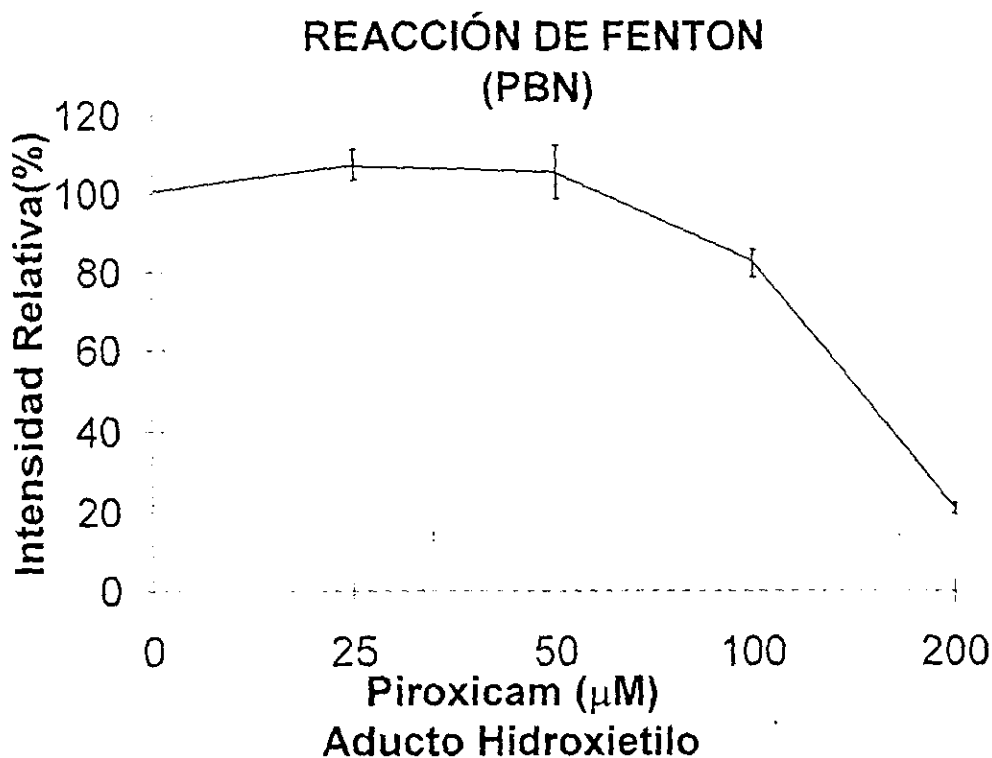


FIGURA 11.- Efecto del piroxicam en la producción de los aductos de radicales hidroxietilos con fenil-tert-butilnitrona (etHO<sup>-</sup>-PBN) en un sistema de reacción tipo Fenton. La gráfica muestra el efecto de la adición de concentraciones 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  del piroxicam al medio de reacción, el cual contenía sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) 1 mM; peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 1 mM; fenil-tert-butilnitrona (PBN) 10 mM; amortiguador de fosfato de potasio 150 mM a pH 7.4 con etanol 100 mM. Nótese la caída de la intensidad relativa de la señal de EPR con concentraciones 100 y 200  $\mu\text{M}$  del fármaco. Las condiciones de registro fueron las mismas que en la figura anterior.

## 2. Experimentos con DMPO.

### a) Reacción de Fenton.

Se obtuvieron los espectros de RPE característicos del aducto del radical hidroxilo con DMPO (DMPO-OH<sup>•</sup>) ( $a_N=14.8\pm 0.2$  Gauss;  $a_H=14.8\pm 0.2$  Gauss) (23) en condiciones basales. Cuando se añadió el piroxicam, la altura media de la señal decayó de manera dosis dependiente. Se observó una caída máxima de aproximadamente cinco veces con una concentración final de la droga de 200  $\mu$ M. Simultáneamente, se registró un patrón de señal diferente ( $a_N=16.0\pm 0.2$  Gauss;  $a_H=22.8\pm 0.2$  Gauss) (48) el cual alcanzó su altura máxima cuando se utilizó la mayor concentración de piroxicam (Figura 12) (49).

En los experimentos realizados en presencia de etanol, se registraron señales típicas de los aductos de radicales hidroxietilos con DMPO (DMPO-etHO<sup>•</sup>) ( $a_N=16.0\pm 0.2$  Gauss;  $a_H=23.4\pm 0.2$  Gauss) (48). Aunque hubo un ligero incremento al utilizar una concentración de 25  $\mu$ M de piroxicam, se observó un decremento similar en la intensidad de las señales con concentraciones de piroxicam de 50, 100 y 200  $\mu$ M; la máxima caída en la altura media de las señales (de un 60%) se alcanzó con una concentración de 200  $\mu$ M (Figura 13). No se observaron señales diferentes de aquellas correspondientes a DMPO-etHO<sup>•</sup> (49).

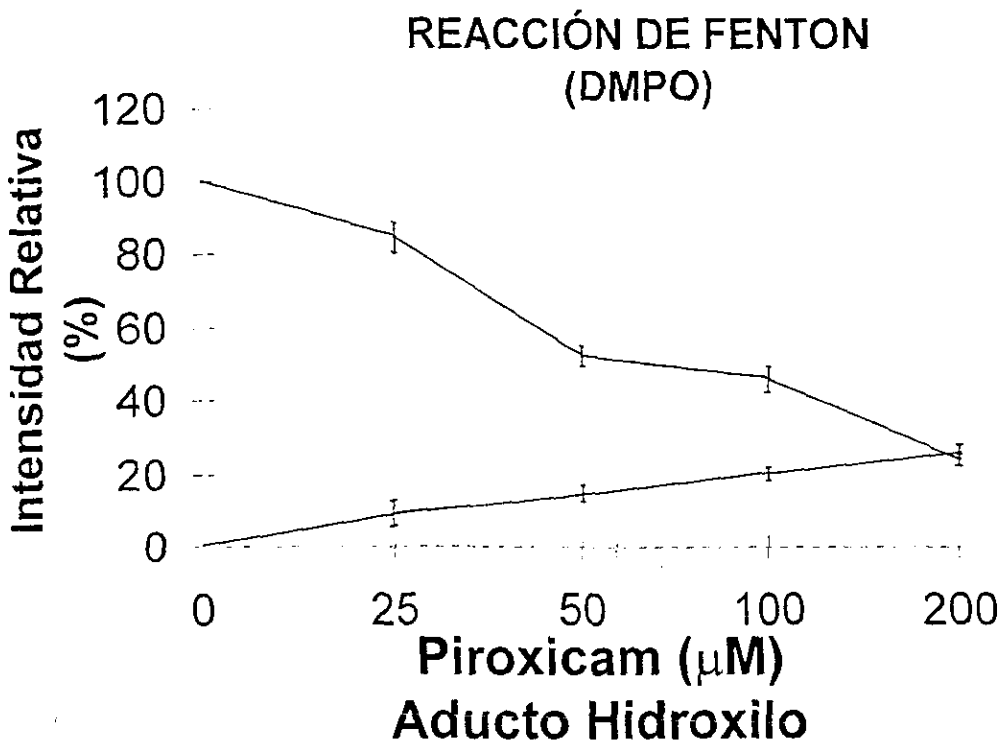


FIGURA 12.- Efecto del piroxicam en la producción de los aductos de radicales hidroxilos con 5,5-dimetil-pirrolin-N-óxido ( $\text{HO}^\bullet\text{-DMPO}$ ) en la reacción de Fenton. El medio de reacción incluía: sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) 1mM; peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 1mM; 5,5-dimeti-pirrolin-N-óxido (DMPO) 10 mM; amortiguador de fosfato de potasio 150 mM a pH 7.4. Nótese el efecto dependiente de la dosis del piroxicam sobre el sistema: la curva superior describe la caída de la altura media de las señales de los aductos  $\text{HO}^\bullet\text{-DMPO}$ , mientras que la curva inferior, muestra el ascenso de señales que no corresponden al aducto  $\text{HO}^\bullet\text{-DMPO}$ , en el intervalo de concentraciones de 25 a 200  $\mu\text{M}$ . Las condiciones de registro son las mismas que las señaladas en gráficas anteriores.

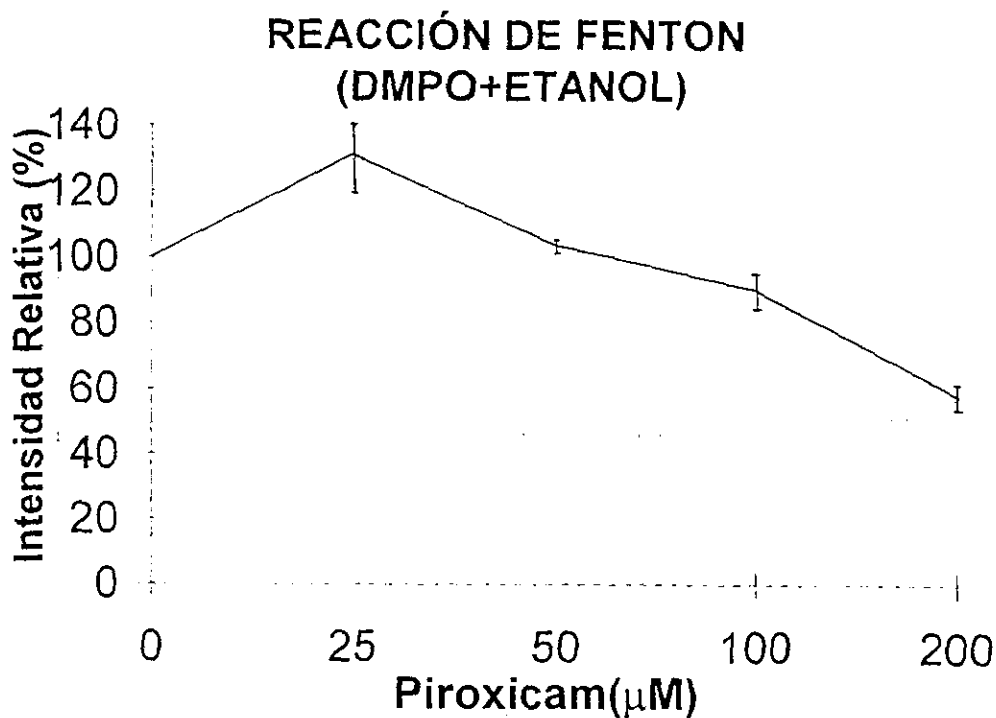


FIGURA 13.- Efecto del piroxicam en la producción de los aductos de radicales hidroxietilos (etHO') con DMPO (etHO'-DMPO) en la reacción de Fenton. El medio de reacción es el mismo que en las figuras previas, con la adición de etanol (et) 100 mM. Nótese que la intensidad de la señal de etHO'-DMPO disminuye con la concentración de piroxicam y la ausencia de señales diferentes a las de etHO'-DMPO. El intervalo de concentraciones del fármaco y las condiciones de registro son las mismas que antes.

## b) Efecto de los quelantes de metales divalentes.

Se obtuvon un resultado similar cuando se probó piroxicam en presencia de DETAPAC (Figura 14). No se obtuvo señal cuando se añadió 100  $\mu\text{M}$ ) de piroxicam un medio de reacción que contenía todos los reactivos mencionados excepto sulfato ferroso (49).

## B. EFECTO DE OTROS AINES.

El ASA mostró casi un 40% de reducción de la señal a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ , sin ningún cambio significativo con concentraciones más bajas (Figura 15). NAX mostró una reducción máxima de señal del 20% con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  pero fue incapaz de mejorar el efecto con una de 200  $\mu\text{M}$ , con la cual sólo alcanzó menos de un 10% de reducción (Figura 16). PHB y NMS no mostraron ningún efecto (Figuras 17 y 18). MFA y DCF ocasionaron una reducción máxima del 15 y 20%, respectivamente, pero ambas drogas no mostraron un efecto dependiente de concentración (Figuras 19 y 20). En ninguno de estos experimentos, se formó radicales, diferentes de los  $\text{OH}^{\cdot}$  (49).

Se llevaron a cabo experimentos conteniendo etanol en el medio de reacción junto con los AINES y los resultados fueron similares a los mostrados anteriormente. Se consideró poco útil repetir los ensayos con DETAPAC en presencia de los demás AINES (49).

## REACCION DE FENTON (DMPO+DETAPAC)

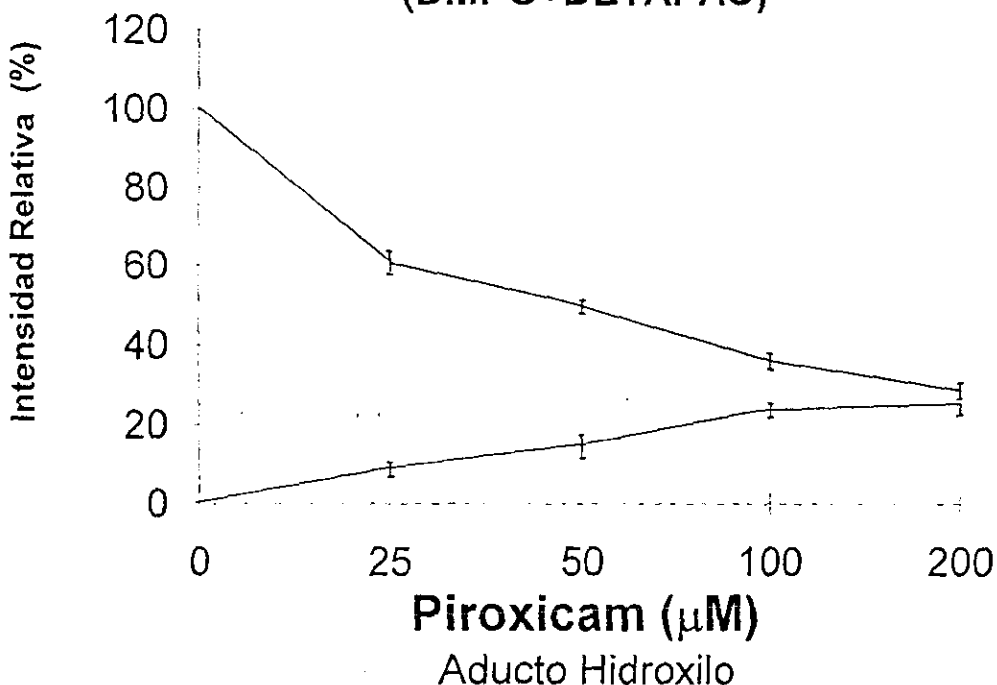


FIGURA 14.- Efecto del piroxicam en la producción de aductos de radicales hidroxilo con DMPO (HO<sup>•</sup>-DMPO) en la reacción de Fenton con dietil-tetraminopentaacetato (DETAPAC) 100 mM, un agente quelante de cationes divalentes. La composición del medio de reacción es la misma que en la figura 11, salvo por la presencia del quelante. Nótese la dependencia de la disminución de la intensidad de las señales de HO<sup>•</sup>-DMPO y del incremento de señales distintas a las de HO<sup>•</sup>-DMPO con respecto a la concentración del fármaco. El intervalo de concentraciones del piroxicam y las condiciones de registro son las mismas que las señaladas en la figura 12.

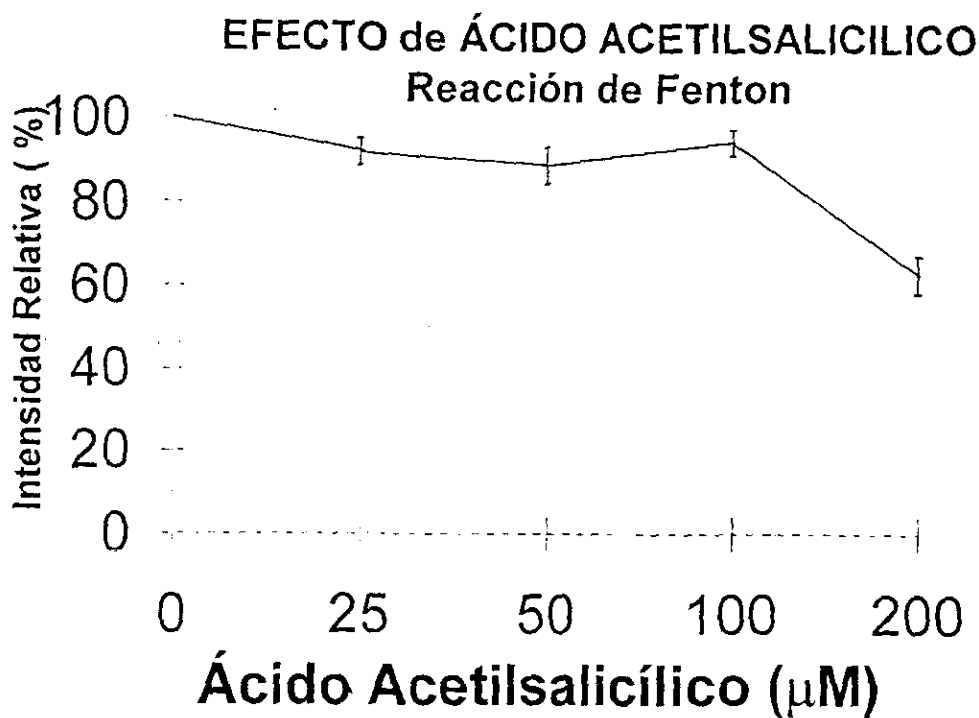


FIGURA 15.- Efecto de ácido acetilsalicílico en la producción de los aductos de radicales hidroxilo con DMPO ( $\text{HO}^{\bullet}$ -DMPO) en la reacción de Fenton. Nótese que solamente aparece una disminución en la intensidad de las señales con la concentración de 200  $\mu\text{M}$  del fármaco, así como la ausencia de señales distintas a las de  $\text{HO}^{\bullet}$ -DMPO. La composición del medio de reacción, el intervalo de concentraciones empleado y las condiciones de registro son las mismas que en las figuras anteriores.



### EFFECTO DE NAPROXEN Reacción de Fenton

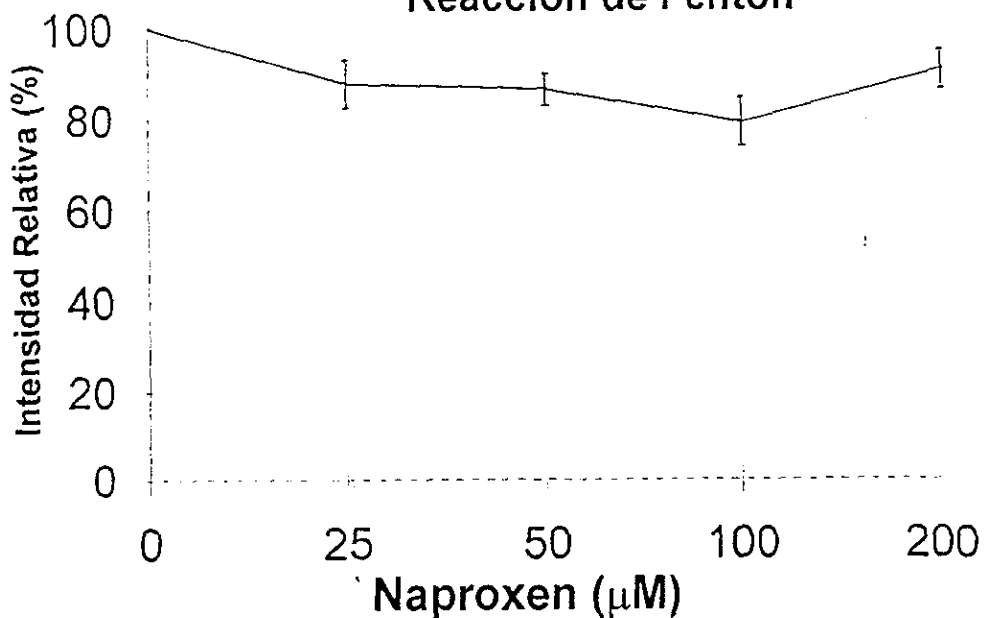


FIGURA 16.- Efecto de naproxen en la producción de los aductos de radicales hidroxilo con DMPO ( $\text{HO}^{\bullet}\text{-DMPO}$ ) en la reacción de Fenton. Nótese que no hay una franca disminución de la intensidad de las señales de  $\text{HO}^{\bullet}\text{-DMPO}$  a ninguna concentración del fármaco ni una aparición de señales diferentes a  $\text{HO}^{\bullet}\text{-DMPO}$ . La composición del medio de reacción, el intervalo de concentraciones empleado y las condiciones de registro son las mismas que en las figuras anteriores.

## EFFECTO de la FENILBUTAZONA Reacción de Fenton

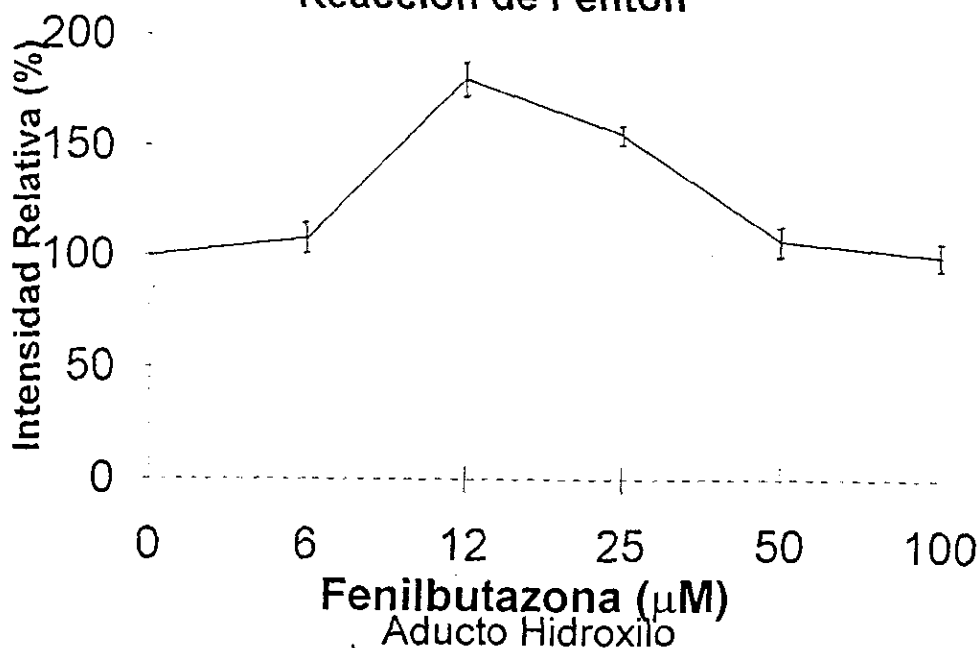


FIGURA 17.- Efecto de fenilbutazona en la producción de los aductos de radicales hidroxilo con DMPO (HO<sup>•</sup>-DMPO) en la reacción de Fenton. Nótese que no hay una franca disminución de la intensidad de las señales de HO<sup>•</sup>-DMPO a ninguna concentración del fármaco ni aparición de señales diferentes a HO<sup>•</sup>-DMPO. La composición del medio de reacción, el intervalo de concentraciones empleado y las condiciones de registro son las mismas que en las figuras anteriores.

### EFEECTO del NIMESULIDE Reacción de Fenton

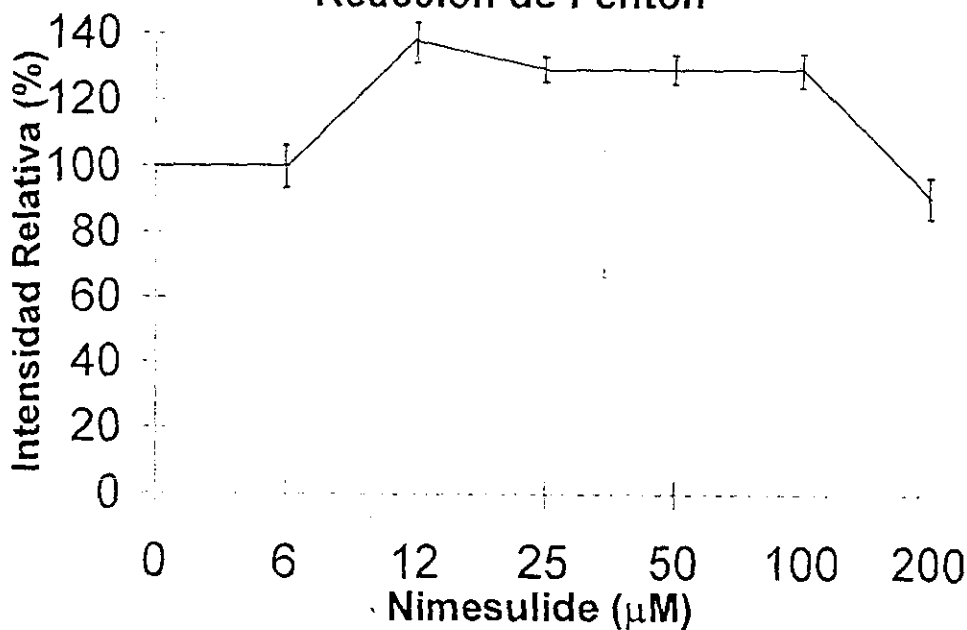


FIGURA 18.- Efecto de nimesulide en la producción de los aductos de radicales hidroxilo con DMPO ( $\text{HO}^\bullet\text{-DMPO}$ ) en la reacción de Fenton. Nótese que no hay una franca disminución de la intensidad de las señales de  $\text{HO}^\bullet\text{-DMPO}$  a ninguna concentración del fármaco ni aparición de señales diferentes a  $\text{HO}^\bullet\text{-DMPO}$ . La composición del medio de reacción, el intervalo de concentraciones empleado y las condiciones de registro son las mismas que en las figuras anteriores.

### EFECTO de DICLOFENAC Reacción de Fenton

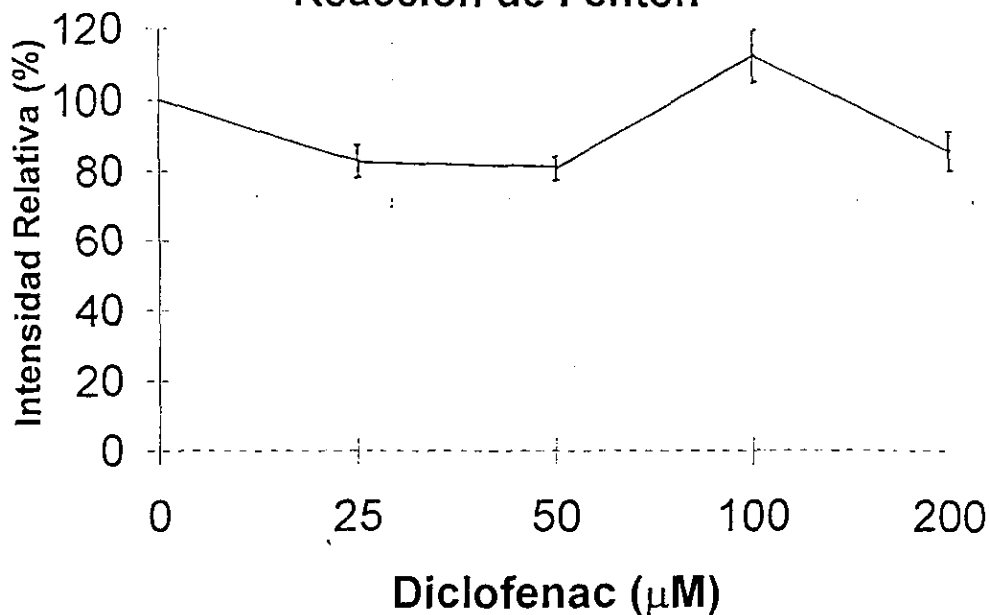


FIGURA 19.- Efecto de diclofenac en la producción de aductos de radicales hidroxilo con DMPO ( $\text{HO}^{\bullet}\text{-DMPO}$ ) en la reacción de Fenton. Nótese que no hay una franca disminución de la intensidad de las señales de  $\text{HO}^{\bullet}\text{-DMPO}$  a ninguna concentración del fármaco ni aparición de las señales diferentes a  $\text{HO}^{\bullet}\text{-DMPO}$ . La composición del medio de reacción, el intervalo de concentraciones empleado y las condiciones de registro son las mismas que en las figuras anteriores.

## EFFECTO del ÁCIDO MEFENAMICO Reacción de Fenton

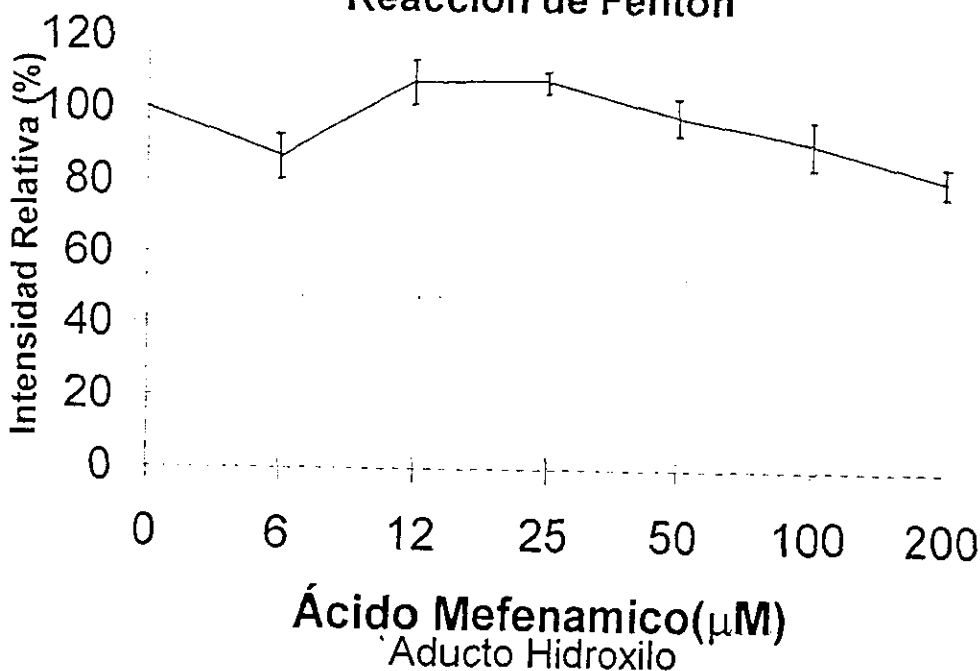


FIGURA 20.- Efecto de ácido mefenámico en la producción de aductos de radicales hidroxilo con DMPO (HO<sup>•</sup>-DMPO) en la reacción de Fenton. Nótese que no hay una franca disminución de la intensidad de las señales de HO<sup>•</sup>-DMPO a ninguna concentración del fármaco ni aparición de señales diferentes a HO<sup>•</sup>-DMPO. La composición del medio de reacción, el intervalo de concentraciones empleado y las condiciones de registro son las mismas que en las figuras anteriores.

## VI. DISCUSION.

### A. EFECTO DEL PIROXICAM.

#### 1. Experimentos con PBN.

##### a) Autooxidación de la Fenilhidracina.

Durante la autooxidación de la fenilhidracina, el piroxicam incrementó la formación de los radicales libres en ausencia de metales de transición en el medio de reacción. Ya que en la presencia de estos metales, el piroxicam no altera la producción de los radicales libres, era posible descartar un efecto quelante. Sin embargo, dado que el PBN no es un atrapador de radicales altamente selectivo (37), no es posible asegurar que las especies de radicales producidas por el piroxicam en la autooxidación de la fenilhidracina sean las mismas que aquellas generadas durante el proceso en ausencia del AINE (50).

##### b) Reacción de Fenton.

En los experimentos en presencia de etanol, no se detectó una disminución en la producción de los radicales hidroxietilos en presencia del piroxicam, más que a muy altas concentraciones. Tales cambios pueden no tener efectos biológicos significativos.

Aunque estos datos contradicen a los resultados obtenidos

en condiciones in vivo, no es posible descartar la posibilidad que el piroxicam pueda inducir la producción de radicales libres menos reactivos y, por tanto, menos dañinos, que aquellos habitualmente producidos en las células hepáticas. Ambos sistemas de radicales generaron radicales centrados en un carbono, por lo que se consideró importante realizar algunos experimentos utilizando un sistema productor de radicales diferentes a los localizados en un carbono (i.e. localizados en el oxígeno, como los radicales hidroxilo). Asimismo, se consideró utilizar atrapadores de radicales más selectivos (50).

## 2. Experimentos con DMPO.

### a) Reacción de Fenton.

En trabajos anteriores se había señalado que para poder considerar a una sustancia como un posible atrapador de radicales libres, ésta debe ser capaz de reducir la altura media de los aductos derivados del radical a ser atrapado (35). Como el piroxicam reprodujo tal efecto, concluimos que la droga era capaz de reaccionar con los radicales HO<sup>•</sup> formados durante la reacción de Fenton y de generar otros radicales libres (49).

Resulta también evidente, por los estudios realizados en presencia de etanol, que el piroxicam puede atrapar radicales localizados en un carbono, como et-HO<sup>•</sup>. Este hallazgo puede explicar los efectos del piroxicam observados en nuestro labora-

torio, cuando se probó la droga durante la autooxidación de la fenilhidracina. En tales experimentos, se utilizó la fenilhidracina como una fuente de  $\text{phe}^{\cdot}$ , un radical localizado en un carbono y PBN como el atrapador. El piroxicam incrementó la altura media de los aductos de PBN- $\text{phe}^{\cdot}$  de manera dependiente de la dosis, induciendo la formación de radicales localizados en un carbono (48) diferentes (i.e. radicales derivados del piroxicam), que también podían ser atrapados, bajo esas condiciones. Parece que el piroxicam posee un amplio espectro en su acción atrapadora (49).

Los resultados descritos son de particular interés al tratar de explicar a los efectos encontrados en condiciones in vivo. El piroxicam previene el incremento en la lipoperoxidación en el hígado de rata inducidos durante la intoxicación aguda por etanol (26, 27) aparentemente por atrapar radicales libres o por interactuar con algunos metales de transición. Dado que el piroxicam, simultáneamente indujo la producción de radicales libres diferentes a los formados originalmente, es posible que este AINE forme radicales menos reactivos, y por tanto, menos lesivos bajo estas condiciones. Ambas acciones harían al piroxicam un agente muy útil en prevenir tales cambios en situaciones tanto experimentales como clínicas (49).

Se sabe que el  $\text{HO}^{\cdot}$  se forma durante las etapas tempranas de la transformación hepática del etanol y que es un amplificador primario (por mecanismos de autopropagación) de los cambios inducidos por el alcohol(12,15,16,17). Si el piroxicam es capaz



de atrapar diferentes especies de radicales libres (i.e. localizados en el oxígeno y en el carbono), entonces podría actuar desde el principio en el metabolismo del etanol hasta en las etapas tardías, cuando los radicales localizados en un carbono se forman a partir de los lípidos de la membrana y de otras moléculas orgánicas (49).

**b) Efecto de los quelantes de metales divalentes.**

Sin embargo, otra posibilidad para explicar estos hallazgos es a través de una interacción del piroxicam con los metales divalentes en el sistema. Si los metales fuesen atrapados por el AINE, no se podrían formar radicales HO<sup>•</sup> en ausencia de un agente reductor adecuado (30). Tal posibilidad sería descartada al probar el piroxicam en la presencia de DETAPAC, un agente quelante que incrementa la formación de radicales libres cuando es usado como parte de la reacción de Fenton (45). El DETAPAC prevendría la formación de complejos entre el piroxicam y los metales de transición, si es que estos se forman, sin interferir en la producción de radicales. El piroxicam mostró el mismo efecto aún en la presencia del DETAPAC, excluyendo una posible interacción con el hierro. Por otra parte, la formación de radicales no se redujo en ausencia del sulfato ferroso aún cuando el piroxicam se encontraba presente. Esto demuestra que ningún otro reactivo (incluyendo al piroxicam) más que los metales podía servir como un donador de electrones en el medio de reacción (49).

En ambos casos (con y sin DETAPAC), se registró una señal diferente de la que corresponde a DMPO-HO'. Ya que las señales de RPE son específicas para un radical, concluimos que se estaba formando un radical diferente conforme los radicales hidroxilo eran atrapados. Los datos sugieren que el piroxicam puede estar formando radicales localizados en un carbono al atrapar HO', como se puede deducir del análisis del patrón de descomposición hiperfina del espectro de RPE obtenido (48). Se requieren otros estudios para la identificación del aducto de DMPO derivado del piroxicam que se forma bajo estas condiciones (49).

#### B. EFECTO DE OTROS AINES.

Los otros AINES probados (ASA, NAX, PHB, NMS, MFA y DCF) no mostraron un efecto claro. Resulta de interés particular el hecho de que ninguno de estos compuestos generó señales diferentes de aquellas obtenidas en ausencia del AINE. Sólo se obtuvo una reducción de la señal de RPE del 40% con el ASA, comparado con una reducción del 80% alcanzada con piroxicam. Estos dos resultados nos llevan a concluir que los otros AINES probados no tienen un efecto atrapador de radicales hidroxilo. Este hallazgo aparentemente contradice algunos de los resultados de los estudios in vivo, donde algunas de estas drogas redujeron la lipoperoxidación inducida por el etanol (27). Sin embargo, estos efectos se pueden explicar fácilmente si se considera una acción atrapadora para los radicales diferentes al HO'.

Como los radicales libres se autopropagan, transformando a otras moléculas en radicales (19), es difícil caracterizar la naturaleza de estos. El piroxicam y los otros AINES pueden tener una acción atrapadora en algunos de estos radicales (50).

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## VIII. CONCLUSIONES.

El piroxicam, a diferencia de otros AINES, mostró capacidad para atrapar al radical hidroxilo, así como algunos radicales localizados en un carbono, como los hidroxietilo. Este efecto puede explicar la atenuación de los efectos debidos a la producción de radicales libres como consecuencia del metabolismo hepático del etanol, por unaintoxicación alcohólica aguda en la la rata. Así mismo, el piroxicam posiblemente induce la formación de radicales menos reactivos y, por lo tanto, menos tóxicos.

Las enfermedades relacionadas con el alcoholismo se asocian frecuentemente con la producción de especies de oxígeno reactivas. Algunas de estas enfermedades son progresivas e irreversibles, como en el caso de la cirrosis. La prevención de estas enfermedades es de interés en la medicina moderna, porque se carece de estrategias terapéuticas efectivas contra ellas. Los AINES podrían convertirse en una opción atractiva.

## IX. BIBLIOGRAFIA.

- 1) Basaga, H.S. (1990) Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell Biol.* 68: 989-98.
- 2) Singh, A. (1982) Chemical and biochemical aspects of superoxide radicals and related species of activated oxygen. *Can.J. Physiol. Pharmacol.* 60, 1982: 1330-45.
- 3) Ingold, K.U. (1969) Peroxy radicals. *Acc. Chem. Res.* 2 (1): 1-8.
- 4) Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246 (1): 501-7.
- 5) Babior, B.M. (1978) Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes I. *New Engl. J. Med.* 298: 659-64.
- 6) Babior, B.M. (1978) Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes II. *New Engl. J. Med.* 298: 721-25.
- 7) Fenton, H.J.H. & Jackson, H. (1899) The oxidation of polyhydric alcohols in the presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 75: 1-11.

- 8) Haber, F. & Weiss, J. (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc. R. Soc. London A 147: 332-51.
- 9) Slater, T.F. (1984) Free-radical mechanisms in tissue injury. Biochem J. 222: 1-15.
- 10) Halliwell, B. & Aruoma, O. (1991) DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Lett. 281: 1 (2): 9-19.
- 11) Lieber, C.S. (1984) Alcohol and the liver: 1984 update. Hepatology 4 (6): 1243-60.
- 12) Thurman, R.G., Ley, H.G. & Scholz, R. (1972) Hepatic microsomal ethanol oxidation: hydrogen peroxide formation and the role of catalase. Eur. J. Biochem. 25: 420-30.
- 13) Teschke, R., Hasumura, Y., & Lieber, C.S. (1974) Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): solubilizations, isolation and characterization. Arch. Biochem. Biophys. 163: 404-15.
- 14) Videla, L. & Valenzuela, A. (1982) Alcohol ingestion, liver glutathione and lipo-peroxidation: metabolic interrelationships and pathological implications. Life. Sci. 31(22): 2395-2407.

- 15) Valenzuela, A., Fernández, N., Fernández, V., Ugarte, G., Videla, L.A., Guerra, R. & Villanueva, A. (1980) Effect of acute ethanol ingestion on lipoperoxidation and the activity of the enzymes related to peroxide metabolism in rat liver. FEBS Lett. 111: 11-13.
- 16) Fink, R., Marjot, D.H., Cawood, P., Iversen, S.A., Clemens, M.R., Patsalos, P., Norden, A.G. & Dormandy, T.L. (1985) Increased free-radical activity in alcoholics. The Lancet, 10: 291-4.
- 17) Di Luzio N.R. & Kalish, G.H. (1966) Enhanced peroxidation of lipid in the pathogenesis of acute ethanol-induced liver injury. Gastroenterology. 50: 392-6.
- 18) Shaw, S., Javatileke, E., Ross, A., Gordon, E.R. & Lieber, C.S. (1981) Ethanol-induced lipid peroxidation: potentiation by long-term alcohol feeding and attenuation by methionine. J. Lab. Clin. Med. 98 (3): 417-24.
- 19) Reinke, L.A., Rau J.M. & Mc Cay, P.B. (1990) Possible roles of free radicals in alcoholic tissue damage. Free Rad. Res. Comm. 9 (3): 205-11.
- 20) Mishin, V. (1976) Mechanisms of free radical induced changes in alcoholic liver. Biochem. J. 154: 307-10.

- 21) Lai, C.S. & Piette, L.H. (1978) Spin-trapping studies of hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 190: 27-38.
  
- 22) Ellenhorn, M.J. & Barceloux, D.G. (1988) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. (En: Medical Toxicology-Diagnosis and treatment of human poisoning. Ellenhorn, M.J. & Barceloux, D.G., eds. Elsevier, N.Y.) 21: 492-7.
  
- 23) Wolf, R.E. (1984) Non-steroidal anti-inflammatory drugs. Arch. Int. Med. 144: 1658-60.
  
- 24) Abramson, S., Korchak H., Ludewig, R., Edelson, H., Haines, K., Levin, R.I., Herman, R., Rider, L., Kimmel, S. & Weissmann, G. (1985) Modes of action of aspirin-like drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 7227-31.
  
- 25) Mihalic, M., Hofman, H., Kuftinec, J., Krile, B., Caplar, V., Kajfez, F. & Blazevic, N. (1986) Piroxicam. (En: Analytical Profiles of Drug Substances Am. Pharm. Assoc., N.Y.) 15: 511-31.
  
- 26) Zentella de Piña, M., Hernández-Tobías, A., Saldaña-Balmori, Y., Díaz-Belmont, A. & Piña, E. (1992) Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. FEBS Lett. 298: 123-5.



- 27) Zentella de Piña, M., Saldaña-Balmori, Y., Hernández-Tobías, A. & Piña, E. (1993) Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17 (6): 1228-32.
- 28) Hiller, K.O. & Wilson, R.L. (1983) Hydroxyl-free radicals and antiinflammatory drugs: biological inactivation studies and reaction rate constants. *Biochem. Pharmacol.* 32 (13): 2109-11.
- 29) Blasig, I.E., Ebert, B., Hanke, T. & Lowe, H. (1988) Hydroxyl radical scavenging action of cardioactive drugs compared to standard antioxidants: an ESR-spin trap study. *Pharmazie* 43: 139-40.
- 30) Jay, D., Cuéllar, A., Zamorano, R., Muñoz, E. & Gleason, R. (1991) Captopril does not scavenge superoxide: captopril prevents  $O_2^{\cdot -}$  production by chelating copper. *Arch. Biochem. Biophys.* 290 (2): 1-5.
- 31) Wilbur, K.M., Bernheim, F. & Shapiro, O.W. (1949) The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 25 (7): 305-13.

- 32) Janzen, E.G. (1971) Spin Trapping. J. Amer. Chem. 4: 31-40.
- 33) Green, M.J., Hill, A.O. & Tew, D.G. (1985) Applications of spin trapping to biological systems. Biochem. Soc. Trans. 13: 600-3.
- 34) Rosen, G.M., Cohen, M.S., Britigan, B.E. & Pou, S. (1990) Application of spin traps to biological systems. Free Rad. Res. Comms. 9 (3): 187-95.
- 35) Hamburger, S.A. & McCay, P.B. (1990) Spin trapping of ibuprofen radicals: evidence that ibuprofen is a hydroxyl radical scavenger. Free Rad. Res. Comm. 9 (3): 337-42.
- 36) Buettner, G.R. & Mason, R.P. (1987) Spin-trapping methods for detecting superoxide and hydroxyl free radicals in vitro and in vivo. Free Radical Biol. Med. 3: 259-67.
- 37) Lagercrantz, C. (1991) Spin trapping by use of N-tert-butyl hydroxylamine. Involvement of Fenton reactions. Free Rad. Res. Comms. 14 (5): 395-407.
- 38) Janzen, E.G. & I-Ping, L.J. (1973) Radical addition reactions of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide. ESR spin trapping with a cyclic nitron. 9:510-12.

- 39) Buettner, G.R. & Oberley, L.W. (1978) Considerations in the spin trapping of superoxide and hydroxyl radical in aqueous systems using 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 83 (1): 69-74.
- 40) Yamazaki, I. & Piette, L.H. (1990) ESR spin-trapping studies on the reaction of  $Fe^{2+}$  ions with  $H_2O_2$ -reactive species in oxygen toxicity in biology. *J. Biol. Chem.* 265 (23): 13589-94.
- 41) Finkelstein, E., Rosen, G.M. & Rauckman, E. (1980) Spin trapping. Kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones. *J. Am. Chem. Soc.* 102: 4994-9.
- 42) Finkelstein, E., Rosen, G.M. & Rauckman, E.J. (1980) Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: practical aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* 200 (1): 1-16.
- 43) Makino, K., Hagiwara, T., Imaishi, H., Nishi, M., Fujii, S., Ohya, H. & Murakami, A. (1990) DMPO spin trapping in the presence of Fe ion. *Free Rad. Res. Comms.* 9,3-6: 233-40.
- 44) Britigan, B.E., Cohen, M.S. & Rosen, G.M. (1987) Detection of the production of oxygen-centered free radicals by human neutrophils using spin trapping techniques: a critical perspective. *Jour. Leuk. Biol.* 41: 349-62.

- 45) Jay, D. Cuéllar, A. Jay, E. G., García, C., Gleason, R. & Muñoz, E. (1992) Study of a Fenton Type Reaction: effect of captopril and chelating reagents. Arch. Biochem. Biophys. 298 (2): 740-6.
- 46) Reszka, K., Bilski, P. & Chignell, C.F. (1992) EPR spectra of DMPO spin adducts of superoxide and hydroxyl radicals in pyridine. Free Rad. Res. Comms. 17 (6): 377-85.
- 47) Janzen, E.G., Anderson-Evans, C. & I-Ping, L.J. (1973) Factors influencing hyperfine splitting in the ESR spectra of five-membered ring nitroxides. J. Magnet. Res. 9: 513-16.
- 48) Buettner, G.R. (1987) Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. Free Rad. Biol. Med. 3: 259-303.
- 49) Castrejón S., M., Boldú O., J.L., Muñoz P., E., Zentella de P., M., Piña G., E. & Gleason V., R. (1996) Spin trapping studies on the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID'S) on hydroxyl and hydroxyethyl free-radicals in vitro. Res. Comm. Pharmacol. Toxicol. 1,4: 289-99.
- 50) Castrejón S., M., Boldú O., J.L., Muñoz P., E., Zentella de P., M., Piña G., E. & Gleason V., R. (1997) Effect of piroxicam on two in vitro free radical production systems (phenylhydrazine autooxidation and Fenton reaction). Res. Comm. Pharmacol. Toxicol. 2,4: 261-7.

## X. APENDICE.

Los resultados de los experimentos realizados como parte de este trabajo han sido publicados en la revista: Research Communications in Pharmacology and Toxicology.

La referencia de autores y títulos de éstos son como sigue:

MIGUEL CASTREJON S., José Luis Boldú O., Eduardo Muñoz P., Martha Zentella de P., Enrique Piña G. and Roberto Gleason V. (1996): "Spin-trapping studies on the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID'S) on hydroxyl and hydroxyethyl free radicals in vitro" Res. Comm. Pharmacol. Toxicol. Vol.1, No.4; p.p. 289-299.

MIGUEL CASTREJON S., José Luis Boldú O., Eduardo Muñoz P., Martha Zentella de P., Enrique Piña G. and Roberto Gleason V. (1997): "Effect of piroxicam on two in vitro free radical production systems (phenylhydrazine autooxidation and Fenton reaction)" Res. Comm. Pharmacol. Toxicol. Vol.2, No. 4; p.p. 261-267.

En las páginas siguientes, se reproducen los artículos impresos.

SPIN-TRAPPING STUDIES ON THE EFFECTS OF NON-STEROIDAL  
ANTIINFLAMMATORY DRUGS (NSAID'S) ON HYDROXYL AND  
HYDROXYETHYL FREE RADICALS *IN VITRO*.

Miguel Castrejón S.\* (1), José Luis Boldú O. \*\*, Eduardo Muñoz P. \*\*,  
Martha Zentella de P. \*, Enrique Piña G. \* and Roberto Gleason V. \*\* (2).

\* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina.

\*\* Departamento de Estado Sólido, Instituto de Física.

Universidad Nacional Autónoma de México, C. P. 04510, México, D. F.

(1) Inscrito en el Programa de Maestría en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina;  
Becario, CONACYT.

(2) Inscrito en el Programa de Doctorado en Física de Materiales, CICESE.

*Abstract*

Recent work has shown that several non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) prevent free-radical mediated biochemical changes in rat liver after acute intoxication with ethanol. The precise mechanism by which these agents induce such effects is not known. Thus, the influence of NSAIDs on hydroxyl and hydroxyethyl free radical production in a Fenton type reaction system was tested *in vitro* using spin-trapping techniques. The drugs chosen were considered as representatives of each of the NSAIDs families and included acetylsalicylic acid, naproxen, diclofenac, phenylbutazone, mefenamic acid, piroxicam (PIR) and nimesulide. Among these drugs, only piroxicam showed the ability to reduce the EPR (Electron Paramagnetic Resonance) signal intensity of oxygen- and carbon-centered radical adducts in a dose dependent fashion and also to induce the formation of different adduct species. Possible interaction with reaction media metals was ruled out using divalent cation chelators during the assay. Other NSAIDs showed no meaningful effect in the range of concentrations tested. It is proposed that piroxicam is a hydroxyl free-radical scavenger that may form less-reactive radical species in order to explain those effects found under *in vivo* conditions. Other NSAIDs failed to reproduce such effects *in vitro* at least with the radical species tested. Thus, these drugs may have a different mechanism of action than piroxicam or a different spectrum for scavenging free-radical species other than hydroxyl radicals.

---

Please send correspondence and reprint requests to: Miguel Castrejón Sosa, M. D., Depto. De Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. A. Postal 70159, México, D. F. 04510, México. Fax: (525)5483603.

*Introduction.*

Non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are widely used compounds in the treatment of nonspecific inflammatory disorders. Many of their therapeutic effects have been explained to date in terms of the well documented inhibitory action of these drugs on the synthesis of such intercellular mediators as prostaglandins and thromboxanes (Wolf, 1984). However, the existence of other possible mechanisms of action, such as direct interaction with intracellular mediators, has become evident. Chemical diversity of these drugs is indeed a fact that supports the possibility of many more modes of action, not yet described, for these agents (Abramson, Korchak *et al*, 1985).

Through *in vitro* radiolysis techniques in aqueous diluted solutions, it has been shown that some of these NSAIDs are capable of interacting with hydroxyl radicals, turning themselves into free-radicals ("scavenger effect") and thus lowering the hydroxyl radical concentration in the reaction media (Hiller and Wilson, 1983). However, it is not known if all of the NSAIDs share the same effect or if it is reproducible in *in vivo* situations.

Studies carried out in *in vitro* free-radical production systems, using phenylhydrazine autooxidation and the Fenton reaction as models, have shown that captopril, an antihypertensive drug, initially considered a free-radical scavenger, inhibited radical production by interacting with transition metals (i.e., iron, copper) included in the reaction media as electron donors (Jay, Cuellar, *et al*, 1991). This could be an alternative mechanism, theoretically at least, for other drugs to be able to induce similar effects.

Recently, it has been shown that piroxicam (4-hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridil)-2 H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide) (PIR), an NSAID, at a therapeutic concentration (i.e., 100  $\mu$ M), prevents increased levels of lipid peroxidation derived compounds in rat liver extracts induced by acute ethanol ingestion (Zentella de Piña, Hernández-Tobias, *et al*, 1992). Since lipid peroxidation is used as an indirect marker of free-radical formation *in vivo*, it was suggested that PIR may inhibit free radical production or act as a free-radical scavenger itself. Although it has been demonstrated that other NSAIDs exert similar changes decreasing the hepatic lipid peroxidation promoted by ethanol (Zentella de Piña, Saldaña-Balmori, *et al*, 1993), the precise molecular mechanism of such effects is not known.

Since free-radical overproduction has been implicated in the pathogenesis of ethanol-related hepatic diseases (Videla, and Valenzuela, 1982), such as cirrhosis, a better understanding of the action of these drugs could lead to a more rational therapeutic strategy in the prevention and management of these clinical entities.

Previous Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy studies using spin-trapping techniques demonstrated that ibuprofen (2-(4-isobutyl-phenyl) propanoic acid), another NSAIDs, was able to scavenge hydroxyl radicals and formed a different kind of radical species in the process (Hamburger, and Mc Cay, 1990). Similar *in vitro* studies carried out in our laboratory have shown that PIR induces phenyl radical (phe.) (a non-oxygen centered radical) formation in a dose-dependent fashion but failed to reproduce this effect when tested with hydroxyethyl radicals (et-HO.) (an oxygen-centered radical) in the reaction media (Castrejón, Boldú, *et al*, 1996). These results appear to contradict those obtained in the *in vivo* studies previously mentioned. However, since alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN), a non-selective spin-trap was used in this initial stage, the possibility that PIR may induce the formation of different free-radical species than those obtained under basal conditions (i.e. phe. or et-HO. radicals) could not be ruled out. If such radical species are truly formed and turned out to be less reactive than those initially produced, *in vitro* experiments would totally agree with results obtained under *in vivo* conditions.

In order to determine the possible mechanism of action of NSAIDs that explain their *in vivo* effects, we decided to undertake *in vitro* spin-trapping studies using both a hydroxyl radical (HO.) producing system and a more selective spin trap, 5,5-dimethyl-pyrroline-N-oxide (DMPO). The NSAIDs chosen were considered to be representative of each of the seven chemical families of these drugs and were the following: acetylsalicylic acid (ASA), naproxen (NAX), phenylbutazone (PHB), nimesulide (NMS), mefenamic acid (MFA), diclofenac (DCF) and PIR.

#### *Materials And Methods.*

The reaction system contained ferrous sulfate (1  $\mu$ M), DMPO (10 mM), all in a potassium phosphate buffer (150 mM; pH 7.4), for a final reaction volume of 400  $\mu$ L.



Radical formation was started by the addition of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (1 mM). Another series of studies was carried out in the presence of ethanol (100 mM) in the reaction media. Reaction products were measured after 4 minutes of incubation at room temperature, in an anaerobic atmosphere, using a glove box filled with gaseous nitrogen under saturation conditions.

The concentrations of NSAIDs tested were 6, 12, 25, 50, 100 and 200  $\mu$ M of each drug (PIR, ASA, NAX, PHB, NMS, MFA and DCF). All drug concentrations represent the therapeutic range for their pharmacologic use.

The effect of diethylene-triamine-pentaacetic acid (DETAPAC), a divalent-cation chelating agent, at a 100  $\mu$ M concentration, in the first series of studies was also evaluated.

EPR measurements were recorded using a Varian E-line Century Series E112 band-X spectrometer, with a rectangular TE102 cavity. Spectra were achieved with 1 Gauss p.p. modulation at 100 KHz. Other recording conditions were: Central Field 3339 Gauss, sweep 100 Gauss, time constant 0.5 sec., sweeping time 4 minutes.

All the reactants were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and were of the highest purity grade available.

#### *Results.*

Characteristic EPR spectra of the hydroxyl radical adduct of DMPO (DMPO-OH.) ( $a_N=14.8\pm 0.2$  Gauss;  $a_H= 14.8\pm 0.2$  Gauss) (Buettner, 1987) were obtained under baseline conditions. When PIR was added to the reaction system, the height of DMPO-HO. signals was decreased in a dose-dependent mode; a five-fold decrease was observed with a 200 mM final drug concentration. Simultaneously, a different signal pattern was recorded ( $a_N=16.0\pm 0.2$  Gauss;  $a_H= 22.8\pm 0.2$  Gauss) (Buettner, 1987) and its maximum height reached when using top PIR concentrations (Figure 1).

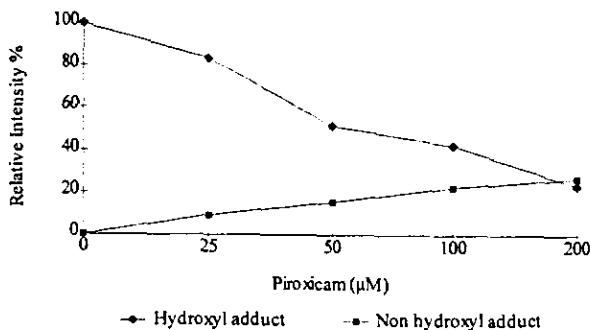


Figure 1.- Effect of PIR on DMPO-HO adduct production in an *in vitro* Fenton reaction system. Reaction medium included 1 mM ferrous sulfate, 10 mM DMPO, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 150 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4. Note the dose dependent effect of PIR on the above described system; top curve describes the fall of DMPO-HO signal's medium height and bottom curve the rise of non DMPO-HO signal (dose range: 25-200 μM). Recording conditions were: central field 3330 Gauss, sweep 100 Gauss, modulation frequency 100 KHz, amplitude 1 Gauss p.p., time constant 0.25 sec., sweeping time 4 min.

Similar results were obtained when testing PIR in the presence of DETAPAC in the reaction medium (Figure 2). No signals were recorded when PIR (at a 100 μM dose) was added to a reaction medium lacking ferrous sulfate but containing every other reactant.

In those experiments carried out in the presence of ethanol, typical hydroxyethyl radical-DMPO adduct (DMPO-etHO) signals were recorded ( $a_N=16.2\pm 0.2$  Gauss;  $a_H=23.4\pm 0.2$  Gauss) (Buettner, 1987). Although an initial mild increase at 25 μM PIR concentration was shown, a similar decrease of signal intensity resulted at 50, 100 and 200 μM doses of PIR; maximum (60%) of signal reduction was also achieved at a 200 μM dose (Figure 3). No different signals from those corresponding to DMPO-etHO were obtained in this case.

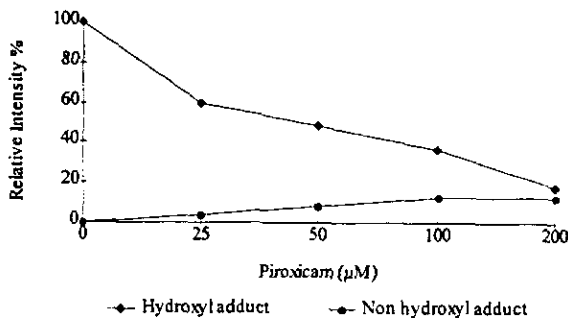


Figure 2.- Effect of PIR on DMPO-HO<sup>•</sup> production in a Fenton reaction *in vitro* system containing 100 mM DETAPAC. Reaction media composition is the same as in figure 2, excepting the presence of the chelating agent at the previously mentioned concentration. Note the aforementioned described dose dependence of the DMPO-HO<sup>•</sup> signals' decrease and the non-DMPO-HO increase. The dose range used is the same as in figure 1, as well as the recording conditions.

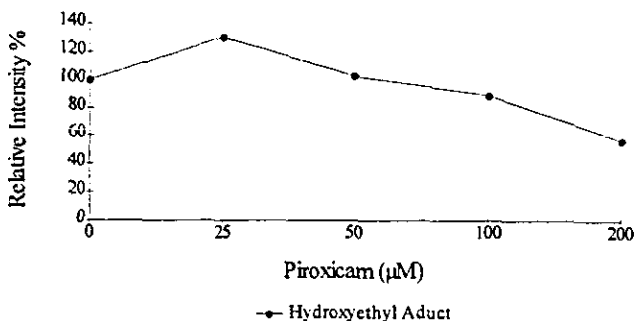
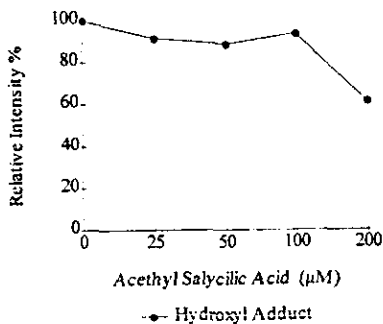
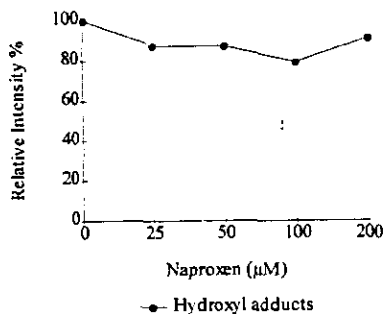


Figure 3.- Effect of PIR on DMPO-etHO<sup>•</sup> production in a Fenton type *in vitro* reaction system. Reaction medium is the same as in previous figures, with the addition of 100 mM ethanol. Note that the previously mentioned dose dependent effect is consistent in decreasing the DMPO-etHO<sup>•</sup> signal medium height and that the overall effect is very similar to the one found in figures 1 and 2; There were no non-DMPO-etHO signals detected. Dose range employed and recording conditions were the same as described previously.

When the other NSAIDs were tested, similar results were not produced. ASA showed nearly a 40% of signal reduction at a 200  $\mu\text{M}$  concentration, without any significant change at lower concentrations ( Figure 4a). NAX showed a maximal 20% signal reduction at 200  $\mu\text{M}$  concentration but failed to improve the effect with 200  $\mu\text{M}$  achieving a less than 10 % of reduction (Figure 4b). PHB and NMS showed no effect at all (Figures 4c and d). MFR and DSF caused a maximal 15% and 20% reduction respectively, but both drugs failed to show a concentration dependent effect (Figures 4e and f). In none of these experiments, were new radical species formed, as a consequence of the presence of the NSAIDs in the reaction media.



4a



4b

Figure 4 continued on next page....

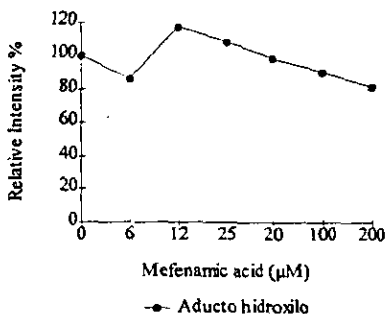
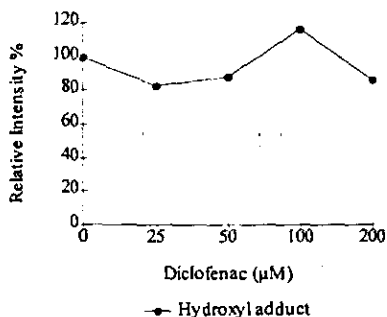
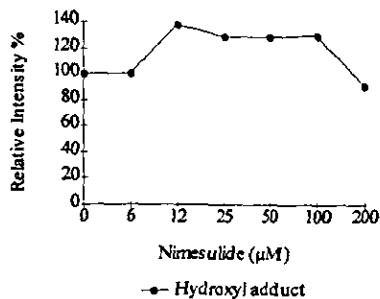
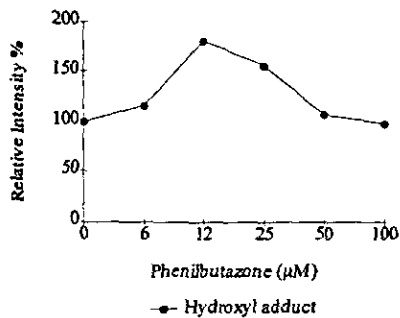


Figure 4.- Effect of NSAIDs on DMPO-HO production in an *in vitro* Fenton type reaction. Reaction medium composition is the same as before. Figure 4a shows the effect of ASA; figure 4b the effect of NAX; figure 4c the effect of PHB; figure 4d the effect of NMS ; figure 4e the effect of MFA; and figure 4f the effect of DCF. Dose range employed and recording conditions were the same as before.

Studies carried out with the ethanol-containing reaction media showed similar results as those described above (data not shown).

#### Discussion.

The results of the present *in vitro* study suggest that PIR acts as a free radical scavenger. Since the height of the EPR signal is proportional to the number of free radicals produced in the medium, putative scavengers should be able to reduce the signal-

height of spin-adducts derived from the radical species to be scavenged (Blasig, Ebert, *et al*, 1988). In view of the fact that PIR exerted such an effect in our investigation, we concluded that the drug is capable of reacting with HO. radicals formed during the Fenton reaction and of generating new free radical species.

An alternative explanation for our findings could be an interaction of the NSAIDs with the divalent metals in the incubation medium. If the metals were chelated, HO. radicals would not be formed in the absence of an adequate reducing agent. Such a possibility is ruled out when testing PIR in the presence of DETAPAC, a chelating agent that enhances free-radical formation when used as part of Fenton type reactions, as reported by previous studies (Jay, Cuellar, *et al*, 1992). Under these conditions, DETAPAC would prevent PIR-metal complex formation without interfering with radical production. However, PIR produced its effect even in the presence of DETAPAC, thus excluding a possible interaction with iron. On the other hand, radical formation was not induced in the absence of iron sulfate in the reaction media even when PIR was present. This indicates that metals and no other reactant (including PIR) could serve as an electron donor in the reaction medium.

Moreover, in both instances (with and without DETAPAC), a different signal from that corresponding to DMPO-HO. was recorded. Since EPR signals are more or less radical-specific, we concluded that a different kind of radical was being formed as hydroxyl radicals were being scavenged. Consistent with previously mentioned studies carried out with ibuprofen (Jay, Cuellar *et al.*, 1991), our data suggest that PIR may be forming an organic carbon-centered species of free-radical when scavenging HO., as indicated by the analysis of the hyperfine splitting pattern of the EPR spectra obtained (Buetner, G. R., 1987). Further studies are needed for the identification of the specific PIR derived DMPO adduct formed under these conditions.

It is also evident from the studies carried out in the presence of ethanol that PIR can scavenge carbon-centered radicals as ei-HO. radicals. This finding may explain the previously mentioned effects of PIR observed in our laboratory (Castrejón, Boldú, *et al*, 1996) when the drug was tested during the autoxidation of phenylhydrazine. In such experiments, phenylhydrazine was used as a source of phe., a carbon-centered radical, and PBN as the spin-trap. PIR increased the PBN-phe. adduct signal's medium height, in a dose-dependent fashion, by inducing the formation of different carbon-centered free-radical species (i.e., PIR-radicals) that could also be spin-trapped, under those conditions. It would seem that PIR has a relatively broad-spectrum scavenging action.

The results described in this report are of particular interest when trying to explain those obtained under *in vivo* conditions. PIR prevents biochemical changes in the rat liver induced during acute ethanol intoxication apparently by scavenging free radicals. Interaction with metals for such an effect would seem a probable mechanism in light of

our results. Moreover, since PIR simultaneously led to the production of different radical species than those originally formed, it is possible that PIR may induce the production of less reactive, thus less harmful, radicals under these conditions. Both actions would make PIR a very useful agent in preventing such changes in experimental as well as in clinical situations.

Furthermore, it is well known that HO $\cdot$  is formed during the early stages of alcohol induced hepatic changes and that it is a primary enhancer (by autopropagation mechanisms) of alcohol induced free-radical mediated changes (Videla, and Valenzuela, 1982). If PIR is capable of scavenging different free radical species (i.e., oxygen-centered and carbon-centered), then it may probably be acting from the initiation of the chain of events that result from ethanol metabolism as well as in the later stages, when carbon-centered radicals are formed from membrane lipids and other organic molecules. Such a diverse role would be highly desirable in a drug intended to be used in the prevention of free radical formation.

Although PIR was shown to be effective in our studies, the other NSAIDs tested (ASA, NAX, PHB, NMS; MFA and DCF) failed to show a clear-cut effect. Of particular interest is the fact that none of these compounds demonstrated an ability to generate different signals than those obtained under basal conditions. This finding along with the fact that no reduction greater than 40% (in the case of ASA) could be achieved using any of these drugs, compared with the 80% decrease reached with PIR, leads us to conclude that other NSAIDs may not have a hydroxyl-radical scavenging effect. This finding is not consistent with previous *in vivo* studies. Nevertheless, such effects could be explained if a scavenger action for radical species other than HO $\cdot$  could be achieved by these drugs. Many different species of radicals may be generated in the model used under the *in vivo* conditions. Since free-radicals show the ability to autopropagate, turning other molecules in the surrounding media into radicals themselves, it may be a difficult task to characterize the nature of all the different radical species formed.

In summary, alcohol-related diseases are frequently associated with the ability to overproduce highly reactive free radicals. Some of the consequent diseases are progressive and irreversible, as in the case of cirrhosis. Strategies to prevent these degenerative processes are desirable. In this regard therapeutic agents such as PIR may prove useful.

#### *Acknowledgment*

This investigation was supported, in part, by grant IN-210094 from DGAPA, UNAM, México.

*References*

- Abramson, S.; Korchak, H.; Ludewig, R.; Edelson, H.; Haines, K.; Levin, R.I.; Herman, R.; Rider, L.; Kimmel, S.; Weissmann, G. (1985); Modes of action of aspirin-like drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7227-7231.
- Blasig, I. E.; Ebert, B.; Hanke, T.; Lowe, H. (1988); Hydroxyl radical scavenging action of cardioactive drugs compared to standard antioxidants: an ESR-spin trap study. *Pharmazie*. 43:139-140.
- Buettner, G.R. (1987); Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Rad. Biol. Med.* 3:259-303.
- Castrejón, M.; Boldú, J.L.; Muñoz, E.; Zentella de Piña, M.; Piña, E.; Gleason, R. (1996); Effects of piroxicam on two *in vitro* free-radical production systems (phenylhydrazine autooxidation and Fenton reaction). Submitted for publication at *Free Radical Res. Commun.* (November, 1996.)
- Hamburger, S. A.; Mc Cay, P.B. (1990); Spin trapping of ibuprofen radicals: evidence that ibuprofen is a hydroxyl radical scavenger. *Free Rad. Res. Commun.* 9:337-342.
- Hiller, K.O.; Wilson, R.L. (1983); Hydroxyl-free radicals and antiinflammatory drugs: biological inactivation studies and reaction rate constants. *Biochem. Pharmacol.* 32:2109-2111.
- Jay, D.; Cuéllar, A.; Jay, E.G.; Garcia, D.; Gleason, R.; Muñoz, E. (1992); Study of a Fenton type reaction: effect of captopril and chelating reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 298:740-746.
- Jay, D.; Cuéllar, A.; Zamorano, R.; Muñoz, E.; Gleason, R. (1991); Captopril does not scavenge superoxide: captopril prevents  $O_2^-$  production by chelating copper. *Arch. Biochem. Biophys.* 290:001-005.
- Videla, L.A.; Valenzuela, A. (1982); Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation: Metabolic interrelations and pathological implications. *Life Sci.* 31:2395-2407.
- Zentella de Piña, M.; Hernández-Tobías, A.; Saldaña -Balmori, Y.; Díaz-Belmont, A.; Piña, E. (1992); Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *FEBS Lett.* 298:123-125.
- Zentella de Piña, M.; Saldaña-Balmori, Y.; Hernández-Tobías, A.; Piña, E. (1993); Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17:1228-1232

COPYRIGHT © 1996 BY  
PJD PUBLICATIONS LIMITED, P.O. BOX 966, WESTBURY, NY 11590





EFFECTS OF PIROXICAM ON TWO *IN VITRO* FREE RADICAL  
PRODUCTION SYSTEMS (PHENYLHYDRAZINE AUTOOXIDATION AND  
FENTON REACTION)

M. Castrejón S.\* +, M. Zentella de Piña and E. Piña  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina.

J.L. Boldú O., E. Muñoz P. and R.J. Gleason V.\*\*  
Departamento de Estado Sólido, Instituto de Física.

Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70159  
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.

*Abstract*

Piroxicam, a non-steroidal antiinflammatory drug, can prevent free radical mediated changes during experimental acute alcoholic intoxication in rats. The precise mechanism of such effects is not known. Other drugs have shown an ability to interfere with metals in the reaction media or to scavenge free radicals *in vitro* studies. The present report becomes a first-stage approximation in order to gain insight about the role of piroxicam in free radical production systems *in vitro*. For this aim, spin-trapping studies were carried out during the auto-oxidation process of phenylhydrazine and Fenton reaction separately, in the presence of piroxicam. The spin adducts were measured by EPR. Piroxicam increased free radical production during the autooxidation of phenylhydrazine and decreased it in the Fenton reaction system at high concentrations. The possible interaction of piroxicam with metals in the reaction media is discarded as well as a phenyl and hydroxyethyl radicals scavenger effect. Other possible mechanisms explaining such effects are discussed.

*Introduction*

Non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are one of the more widespread used compounds in contemporary medicine. Their therapeutic applications spectrum runs from nonspecific inflammatory states to thrombosis prevention in high-risk individuals. Members of this pharmacologic family are of a very diverse nature, both in their chemical

---

\*Inscrito en el Programa de Maestría en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina; Becario CONACYT.

\*\*Inscrito en el Programa de Doctorado en Física de Materiales, CICESE.

+ To whom correspondence should be addressed.

structure and pharmacokinetics. Nevertheless, they share most of their biological effects. (Ellenhorn and Barceloux, 1988).

Such therapeutic effects are explained mostly in terms of their ability to prevent the production of some biochemical cellular mediators (such as prostaglandins and thromboxanes), and other biological effects of these agents have become evident as well. Direct interaction of some NSAIDs with cellular metabolites has been demonstrated (Abramson, Korchak, *et al.*, 1985). In spite of the great chemical diversity of the members of this pharmacological group, the mechanisms of action of these drugs is diverse and subject to research.

It has been shown (Mihalic, Hofman *et al.*, 1986) that piroxicam (an NSAID, 4-hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridyl)-2 H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide) at therapeutic concentrations (i.e. 100  $\mu$ M), prevented acute alcohol-induced enhancement hepatic cellular lipid peroxidation in the rat. Hepatic cell lipid peroxidation has been associated with free radical production during hepatic alcohol metabolism and also reputedly implicated in some forms of alcohol-mediated liver damage (Zentella de Piña, Hernández-Tobías, *et al.*, 1992).

Although some other NSAIDs assayed to date have shown similar actions, the precise molecular mechanism (or mechanisms) of action for this effect remains obscure (Zentella de Piña, Saldaña-Balmori, *et al.*, 1993). An important breakthrough in therapeutic strategies for such diseases as alcoholic hepatitis or cirrhosis may result from the detailed knowledge and manipulation of these drugs actions.

Through radiolysis *in vitro* studies, it has been shown that some of these NSAIDs (piroxicam was not tested) were capable of scavenging hydroxyl radicals (Hiller and Wilson, 1983). Nevertheless, it is not known if all the drugs in this group show this effect or if it is reproducible in an *in vivo* setting.

In electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) studies with *in vitro* free radical-producing systems, it was found that captopril (a non-NSAID used in the treatment of hypertension) initially considered a free radical scavenger, inhibited free radical production by interacting with the transition metals used as electron donors in

such systems (Jay, Cuéllar *et al.*, 1991). This may be an alternative mechanism of action, hypothetically at least, for different drugs with similar effects.

In order to find if piroxicam prevented free radical formation by interaction with metals in the reaction media or if it acts as a radical-scavenger itself, we decided to test this NSAID in two different systems producing free radicals *in vitro* (phenylhydrazine autooxidation and Fenton reaction) and to measure its effects with EPR spin-trapping techniques.

#### *Materials and Methods.*

Phenylhydrazine was obtained from Sigma Chemical Co., MO, in the highest purity grade available; alpha-phenyl-N-t-butyl nitron (PBN), the spin trap used was also from Sigma Chemical Co. Other reagents used were standard laboratory purity grade.

Phenylhydrazine was incubated in aerobic media, according to conditions detailed elsewhere (Jay, Cuéllar, *et al.*, 1992). Sodium borate (25 mM, pH 10.2) was used as buffer in the reaction mixtures, which also contained PBN (3 mM). The reaction was started when cupric chloride ( $\text{CuCl}_2$ ) 0.01 mM was added. The final sample volume was 500  $\mu\text{l}$ . Piroxicam at 12, 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$  concentrations was added to different samples without final volume change. EPR measurements were undertaken in a Varian E-Line Century Series E112, X-band 3 spectrometer, with a rectangular Te 102 cavity. Spectra were recorded with 1 Gauss p.p. modulation at 100 KHz.

For the Fenton reaction studies, hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) of the highest purity grade was obtained from Sigma Chemical Co., as well as ferrous sulphate ( $\text{FeSO}_4$ ). PBN, of the same source as noted above, was used as spin-trap again. All other reagents were of standard laboratory purity grade.

Fenton reaction studies were carried out in phosphate buffer media, as previously reported (Reinke, Rau *et al.*, 1990), containing 150 mM of the potassium salt at pH 7.4 and 100 mM ethanol. In this case, reactions were undertaken in anaerobic conditions, using a nitrogen-saturated atmosphere created inside a glove box. The media also contained PBN (10 mM) and  $\text{FeSO}_4$  (1mM). The reaction was started with the addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to a final volume of 500  $\mu\text{L}$ . The concentrations of piroxicam tested in this experimental setting were 25, 50, 100 and 200  $\mu\text{M}$ . Non-aqueous extractions were

performed by adding 750  $\mu\text{L}$  of toluene to enhance the half-lives of the spin-adducts. The measured sample volume placed inside the spectrometer cavity was 350  $\mu\text{L}$ . EPR signals were recorded under the same spectrometer conditions as before, after 4 minutes of incubation.

Results

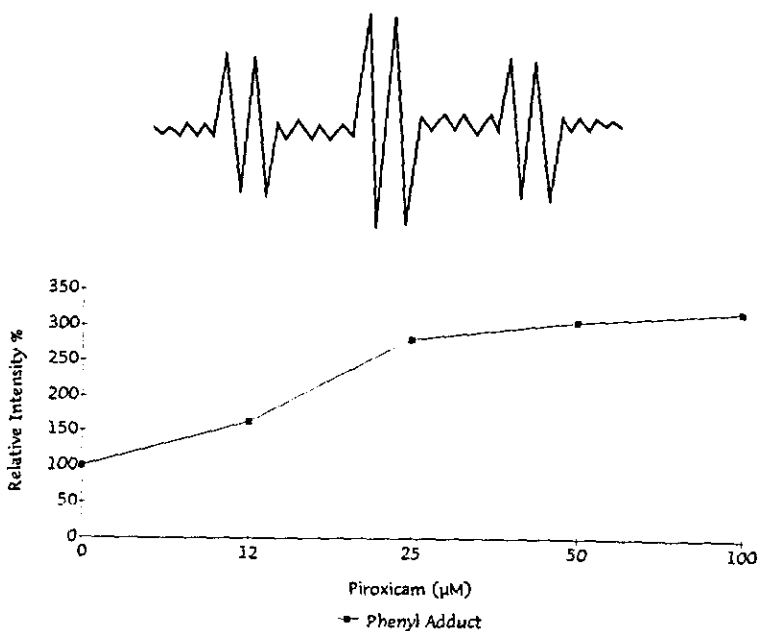


Figure 1.- Effect of piroxicam on phenyl radical production during the autooxidation of phenylhydrazine *in vitro*. Top figure shows typical phenyl-PBN adduct EPR spectral signal pattern recorded at baseline conditions (i.e. PBN 3 mM; phenylhydrazine 1 mM;  $\text{CuCl}_2$  0.01 mM; sodium borate buffer 25 mM, pH 10.2). Bottom figure shows the effect of the addition of 12, 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$  concentrations of piroxicam to the reaction mixture. Note the rise of the relative intensity of the EPR signal in a dose-dependent fashion to the NSAID concentration. Recording conditions were: Central Field 3330 Gauss, Sweep 100 Gauss, Modulation Frequency 100 KHz, Amplitude 1 Gauss p.p., Time Constant 0.25 sed., Sweeping Time 4 min.

In the first system, piroxicam did not alter free radical production when the autooxidation of phenylhydrazine was started with the addition of  $\text{CuCl}_2$ . In a second set

of experiments,  $\text{CuCl}_2$  was excluded from the incubation medium. Under these conditions phenylhydrazine autooxidation was started by piroxicam. When the concentration of the drug in the medium was increased, there was a concomitant increase in the EPR signal, a response that may be conceived as an increase in spin-adduct formation and thus of free radical.

The effect of piroxicam on the Fenton reaction system (Figure 2) was studied. No appreciable change in the formation of spin-adducts was detected using the lower three concentrations of the drug. When higher concentrations (100 and 200  $\mu\text{M}$ ) of piroxicam were added a decrease in free radical production was observed.

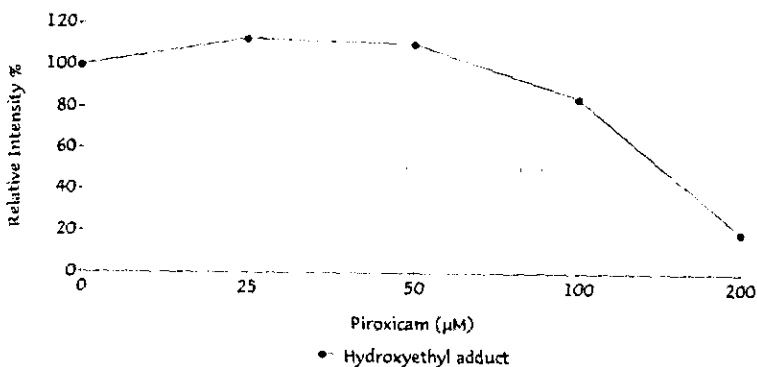


Figure 2.- Effect of piroxicam on hydroxyethyl production in a Fenton reaction *in vitro* system. The figure shows the effect of the addition of 25, 50, 100 and 200  $\mu\text{M}$  concentrations of piroxicam to the reaction mixture (i.e. PBN 10 mM;  $\text{FeSO}_4$  1 mM;  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM; potassium phosphate 150 mM, pH 7.4 and ethanol 100 mM). Note the fall in EPR signal relative intensity with the 100 and 200  $\mu\text{M}$  concentrations of the drug. Recording conditions are same as before in figure 1.

#### Discussion.

During phenylhydrazine autooxidation, piroxicam apparently increases free radical formation in the absence of metals in the reaction medium. Since in the presence of metals the drug does not alter free radical production, a possible metal-trapping mechanism as well as a radical scavenger effect (for phenyl-radical species, at least) may be ruled out. It is worth mentioning that since PBN is not a highly selective spin-trap, it is

not possible to assure that the radical species produced by the effect of piroxicam on phenylhydrazine were the same as those generated during autooxidation process in the absence of the NSAID or those in the metal-induced reaction.

During Fenton reaction studies, there were no piroxicam-induced changes on the hydroxyethyl-radical production, except at very high concentrations. Such changes may not have meaningful biological effects.

Although these data are apparently in contradiction with the results obtained in *in vivo* conditions, the possibility that piroxicam may induce the production of less reactive and thus harmful radical species than those usually produced within liver cells cannot be discarded. Both radical systems tested in this work generate carbon-centered (i.e. phenyl and hydroxyethyl) radicals (Buettner, 1987). Further studies must be carried out using both free radical production systems that generate other than carbon-centered (oxygen-centered, as hydroxyl or superoxide) radicals and more selective spin-traps.

#### *Acknowledgments.*

This investigation was supported, in part, by grant IN-210094 from DGAPA, UNAM, México. The authors would like to thank Orison R. Huerta Encinas and Jorge A. Velázquez Ortiz for their technical support.

#### *References.*

- Abramson, S.; Korchak, H.; Ludewig, R.; Edelson, H.; Haines, K.; Levin, R.I.; Herman, R.; Rider, L.; Kimmel, S.; Weissmann, G. (1985); Modes of action of aspirin-like drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7227-7231.
- Buettner, G.R. (1987); Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts. Free Radical Biol. Med. 3:259-303.
- Ellenhorn, M.J. and Barceloux, D.G. (1988). Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. 1<sup>st</sup>. Ed. Elsevier Publishing Co., New York, p.p. 492-498.
- Hiller, K.O.; Wilson, R.L. (1983); Hydroxyl free radicals and antiinflammatory drugs: biological inactivation studies and reaction rate constants. Biochem. Pharmacol. 32:2109-2111.
- Jay, D.; Cuéllar, A.; Jay, E.G.; Garcia, D.; Gleason, R.; Muñoz, E. (1992); Study of a Fenton type reaction: effect of captopril and chelating reagents. Arch. Biochem. Biophys. 298:740-746.

- Jay, D.; Cuéllar, A.; Zamorano, R.; Muñoz, E.; Gleason, R. (1991); Captopril does not scavenge superoxide: captopril prevents  $O_2^-$  production by chelating copper. Arch. Biochem. Biophys. 290:001-005.
- Mihalic, M., Hofman, H., Kufinec, J., Krile, B., Caplar, V., Kajfez, F. and Blazevic, N. (1986). Piroxicam. Anal. Prof. Drug Subs., 15, 511-530.
- Reinke, L.A., Rau, J.M. and Mc. Cay, P.B. (1990). Possible roles of free radicals in alcoholic tissue damage. Free Radical Res. Comm. 9, 205-211.
- Zentella de Piña, M.; Hernández-Tobias, A.; Saldaña -Balmori, Y.; Díaz-Belmont, A.; Piña, E. (1992); Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. FEBS Lett. 298:123-125.
- Zentella de Piña, M.; Saldaña-Balmori, Y; Hernández-Tobias, A.; Piña, E. (1993); Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. Alcohol. Clin. Exp. Res. 17:1228-1232

COPYRIGHT © 1997 BY  
PJD PUBLICATIONS LIMITED, P.O. BOX 966, WESTBURY, NY 11590

