

Revista de

Farmacología de Chile

Órgano oficial de la Sociedad de Farmacología de Chile • <http://www.sofarchi.cl>

Volumen 9, Número 1

ISSN N° 0718-8811

Año 2016



“Fitofarmacología”

ARTÍCULOS ORIGINALES EN FITOFARMACOLOGÍA

- **ANHIDRASA CARBONICA DE *Helicobacter pylori* COMO BLANCO FARMACOLÓGICO: USO DE POLIFENOLES NATURALES COMO POTENCIALES MODELOS PARA EL DISEÑO DE NUEVOS ANTIMICROBIANOS** (Carbonic Anhydrase from *Helicobacter pylori* as pharmacological target: Using Natural polyphenols as potential templates for development of new antimicrobials).
Edgar Pastene N. y cols.
- **CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MODELOS DE MEMBRANAS CELULARES DE *Solanum lycopersicum* L.** (Antioxidant capacity of *Solanum lycopersicum* L. on cell membrane models).
Marcia Avello L. y cols.
- **POLIFENOLES EN NEURODEGENERACION Y ALTERACIONES NEUROENDOCRINAS: UNA APROXIMACIÓN METABOLÓMICA** (Polyphenols in neurodegeneration and neuroendocrine alterations: A metabolomic approach).
Leonel E. Rojo y cols.

ARTÍCULOS ORIGINALES EN FARMACOLOGÍA CLÍNICA-ODONTOLÓGICA

- **PROFILAXIS ANTIBIÓTICA EN CIRUGÍA ORAL. EXPERIENCIA EN LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA UNIVERSIDAD DEL DESARROLLO-LA FLORIDA. PARTE I.** (Antibiotic prophylaxis in patients undergoing oral surgery at the Clínica Universidad del Desarrollo-La Florida. Part I).
Verónica Schulte-Herbrüggen K. y cols.
- **PRESCRIPCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN CIRUGÍA ORAL. EXPERIENCIA EN LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA UNIVERSIDAD DEL DESARROLLO-LA FLORIDA. PARTE II.** (Antibiotic prescription in oral surgery patients at the Clínica Universidad del Desarrollo-La Florida. Part II).
Stefania Pedemonte V. y cols.

PANEL DE EDITORES

La Revista de Farmacología de Chile tiene un panel de editores conformado por connotados farmacólogos nacionales que son miembros de la Sociedad de Farmacología de Chile y académicos de las principales universidades chilenas.

Comité Editorial:

Dr. Ramón Sotomayor-Zárate, Editor en Jefe
(Universidad de Valparaíso, Chile)
Dr. Pablo Jara Picas, Co-Editor (Volumenes Especiales)
(Universidad de Santiago de Chile, Chile)
Dr. Jorge Fuentealba Arcos, Neurofarmacología
(Universidad de Concepción, Chile)
Dra. Viviana Noriega, Farmacología Clínica
(Universidad de Chile, Chile)
Dr. Miguel Reyes-Parada, Química Médica
(Universidad de Santiago de Chile, Chile)
Dra. María Angélica Rivarola, Neuroendocrinología
(Universidad Nacional de Córdoba, Argentina)
Dr. Juan Pablo G. Huidobro-Toro, Farmacodinamia
(Universidad de Santiago de Chile, Chile)
Dra. Marcela Julio-Pieper, Farmacología Gastrointestinal
(P. Universidad Católica de Valparaíso, Chile)

Dra. Georgina M. Renard, Co-Editor (Reviews)
(Universidad de Valparaíso, Chile)
Dra. Gabriela Díaz-Véliz, Psicofarmacología
(Universidad de Chile, Chile)
Dra. Carolina Gómez Gaete, Ciencias Farmacéuticas
(Universidad de Concepción, Chile)
Dr. Edgar Pastene, Fitofarmacología
(Universidad de Concepción, Chile)
Dr. Rodrigo Castillo, Farmacología Cardiovascular
(Universidad de Chile, Chile)
Dr. Patricio Iturriaga-Vásquez, Química Médica
(Universidad de La Frontera, Chile)
Dr. Mauricio D. Dorfman, Metabolismo y Diabetes
(University of Washington, Seattle-USA)
Dr. Javier Bravo Vivallo, Neurofarmacología
(P. Universidad Católica de Valparaíso, Chile)

Evaluable Asociados:

Dr. Hugo F. Miranda
 Dra. María Eugenia Letelier
 Dr. Sergio Mora
 Dr. Jorge Farías Avendaño
 Dr. Alfonso Paredes
 Dr. Guillermo Díaz-Araya
 Dra. Verónica Donoso
 Dr. Mario Faúndez
 Dr. Hernán E. Lara
 Dra. Jacqueline Sepúlveda
 Dr. Yedy Israel
 Dr. Juan Carlos Prieto
 Dr. Gonzalo Cruz
 Dr. Sergio Lavandero

Dra. María Elena Quintanilla
 Dra. Teresa Pelissier S.
 Dr. Raúl Vinet
 Dr. Luis Quiñones
 Dr. Patricio Saéz-Briones
 Dra. Diadelis Remírez (La Habana, Cuba)
 Dr. Leonel Rojo
 Dra. Inés Ruiz
 Dr. Víctor Domingo Ramírez (Illinois, USA)
 Dra. M. Antonieta Valenzuela
 Dra. Katia Gysling
 Dr. Luis Videla
 Dr. Iván Saavedra S.
 Dr. Juan Diego Maya

Revista de Farmacología de Chile es publicada por la Sociedad de Farmacología de Chile

Derechos Reservados a la Sociedad de Farmacología de Chile.

ISSN 0718-8811 versión impresa

ISSN 0718-882X versión digital

Todos los derechos reservados. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, almacenada en sistema alguno de tarjetas perforadas o transmitida por otro medio -electrónico, mecánico, fotocopiador, registrador, etcétera- sin permiso previo por escrito del comité editorial.

MISIÓN

La Revista de Farmacología de Chile es considerada el órgano oficial de difusión científica y de opinión de la Sociedad de Farmacología de Chile. En un principio esta revista nació como un remozado libro de resúmenes del XVIII Congreso Latinoamericano de la Asociación de Farmacología realizado en Chile el año 2008. Desde 2009 y hasta ahora la Revista de Farmacología de Chile ha recibido varios trabajos originales de investigación y diversas revisiones de temas farmacológicos relevantes.

La Revista de Farmacología de Chile aborda temas relacionados con la farmacología básica y experimental, así como investigaciones clínicas. Las áreas temáticas principales son: farmacocinética, farmacodinamia, farmacología cardiovascular, farmacología pulmonar, farmacología endocrina, neurofarmacología, farmacología clínica, estudios preclínicos, estrés oxidativo, fitofarmacología, ciencias farmacéuticas, química-médica y toxicología. También la revista actualmente permite divulgar opiniones sobre los principales temas de salud relacionados con medicamentos en Chile, la presentación de líneas de investigación de laboratorios nacionales en donde se realizan investigaciones farmacológicas, información de curso y programas de postgrados nacionales en farmacología y la publicación de resúmenes científicos del Congreso Anual SOFARCHI.

Audiencia:

La Revista de Farmacología de Chile esta dirigida a farmacólogos nacionales e internacionales interesados en la divulgación de la farmacología. También está dirigida a estudiantes de pregrado de carreras universitarias del área de la salud y ciencias biomédicas, y a estudiantes de postgrado que cursen maestrías y doctorados en farmacología.

Periodicidad:

Se editaran 3 números anuales (Abril, Agosto y Diciembre) en formato digital e impreso. El número de Diciembre incluirá trabajos originales y los resúmenes del Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile.

Temas a Publicar:

- Artículos originales en Farmacología Básica, Farmacología Clínica, Farmacoterapia y Toxicología.
- Artículos originales de investigación nacional e internacional en Farmacocinética y Farmacogenética.
- Artículos de revisión de temas farmacológicos importantes sobre las diversas temáticas de la disciplina.
- Artículos de Información de nuevos fármacos incorporados al arsenal terapéutico nacional.
- Opiniones oficiales de la sociedad sobre los aspectos regulatorios y nuevas políticas de medicamentos.
- Artículos sobre nuevas metodologías docentes, aplicadas en Farmacología.
- Información detallada de nuevos reportes de reacciones adversas reportadas a nivel internacional y nacional.
- Libros y revistas de los temas.
- Promoción de actividades académicas, congresos y cursos nacionales e internacionales en farmacología.
- Publicitar las ofertas de trabajo de inserción académica en Universidades Chilenas y extranjeras, así como las oportunidades de inserción laboral en la industria privada ligada al desarrollo de fármacos.

Revista de Farmacología de Chile es publicada por la Sociedad de Farmacología de Chile.

Contacto: Avenida Independencia 1007, Independencia, Santiago, Chile. Teléfono: 56-2-29786050; Correo Electrónico: consultas.sofarchi@gmail.com; farmacologia@med.uchile.cl

Editor: Dr. Ramón Sotomayor-Zárate, Laboratorio de Neuroquímica y Neurofarmacología, Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. Avenida Gran Bretaña 1111, Playa-Ancha, Valparaíso, Chile. Teléfono: 56-32-2508050; Correo Electrónico: ramon.sotomayor@uv.cl

EDITORIAL VOLUMEN ESPECIAL DE FITOFARMACOLOGÍA

Edgar Pastene, M.Sc., Ph.D.

Co-Editor

Vice Presidente de la Sociedad de Farmacología de Chile

Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción

La medicina basada en sustancias de origen vegetal, posee un uso muy bien documentado durante miles de años. La maquinaria bio-sintética del reino vegetal ha evolucionado generando una miríada de metabolitos secundarios útiles como agentes de defensa contra bacterias, virus, hongos e insectos. La etnomedicina ha empleado estos recursos naturales con diversos fines y gracias al avance del conocimiento científico ha ayudado a dar forma a la Fitoterapia moderna con sólidas bases farmacológicas. De acuerdo a la OMS, alrededor del 80% de las personas aún reconoce usar plantas como medicina para propósitos de atención primaria. Cabe destacar que el 80% de 122 drogas derivadas de plantas poseen una aplicación estrechamente relacionada con su uso etnofarmacológico.

En este número de la Revista de la Sociedad de Farmacología de Chile, se presentan tres trabajos de autores nacionales que abordan este campo. El primer trabajo, corresponde a una revisión de Pastene *et al.*, en la cual se destaca el interés por el desarrollo de nuevos antimicrobianos con efecto inhibitorio de la anhidrasa carbónica, la cual en ciertas bacterias como el *Helicobacter pylori* es una de las enzimas esenciales para la aclimatación en el medio ácido estomacal. En el artículo se explora el potencial que ofrecen las estructuras polifenólicas extraídas de fuentes vegetales de bajo valor como molde para el desarrollo de nuevos inhibidores enzimáticos. Se discuten estrategias sintéticas sobre la base de resultados preliminares del grupo de investigación, destacando cómo estos derivados híbridos podrían dar origen a una nueva generación de antimicrobianos más selectivos y seguros. El segundo trabajo de Avello *et al.*, presenta un estudio experimental sobre el efecto protector de un extracto de *Solanum lycopersicum* (tomate) en modelo de membranas biológicas a través de ensayos antioxidantes, técnicas de difracción de rayos X y microscopía óptica de desenfoque. En el artículo se demuestra cómo el licopeno en conjunto con carotenos y sustancias fenólicas pueden proteger membranas biológicas del ataque con agentes oxidantes, mediante una combinación de efectos anti-radicalarios y biofísicos. Finalmente, en el tercero de estos trabajos de Rojo *et al.*, revisa la importancia de las bio-transformaciones que sufren los polifenoles provenientes de productos naturales (plantas medicinales y alimentos). Si bien, el microbioma humano es una caja de pandora que sólo recientemente ha empezado a entenderse, cada vez hay más antecedentes de que éste puede generar nuevos compuestos a partir de los polifenoles con variadas actividades biológicas más allá de sus consabidas propiedades antioxidantes. Este enfoque busca entender los mecanismos mediante los cuales los polifenoles pueden desplegar efectos beneficiosos *in vivo*, incluso en compartimientos particularmente complejos como el cerebro. Se analiza el caso específico del efecto neuroprotector de metabolitos fenólicos, así como de los desafíos futuros de este emergente campo de investigación. Por último y adicional a este volumen especial se incluyen dos trabajos de farmacología clínica realizados en nuestro país que muestran la experiencia clínica del uso de antibióticos en odontología.

INDICE

Revista de Farmacología de Chile

AÑO 2016 VOLUMEN 9 NÚMERO 1

ARTÍCULOS ORIGINALES EN FITOFARMACOLOGÍA

ANHIDRASA CARBONICA DE *Helicobacter pylori* COMO BLANCO FARMACOLÓGICO: USO DE POLIFENOLES NATURALES COMO POTENCIALES MODELOS PARA EL DISEÑO DE NUEVOS ANTIMICROBIANOS (Carbonic Anhydrase from *Helicobacter pylori* as pharmacological target: Using Natural polyphenols as potential templates for development of new antimicrobials).

Edgar Pastene N. y cols.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MODELOS DE MEMBRANAS CELULARES DE *Solanum lycopersicum* L. (Antioxidant capacity of *Solanum lycopersicum* L. on cell membrane models).

Marcia Avello L. y cols.

POLIFENOLES EN NEURODEGENERACION Y ALTERACIONES NEUROENDOCRINAS: UNA APROXIMACIÓN METABOLÓMICA (Polyphenols in neurodegeneration and neuroendocrine alterations: A metabolomic approach).

Leonel E. Rojo y cols.

ARTÍCULOS ORIGINALES EN FARMACOLOGÍA CLÍNICA-ODONTOLÓGICA

PROFILAXIS ANTIBIÓTICA EN CIRUGÍA ORAL. EXPERIENCIA EN LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA UNIVERSIDAD DEL DESARROLLO-LA FLORIDA. PARTE I. (Antibiotic prophylaxis in patients undergoing oral surgery at the Clínica Universidad del Desarrollo-La Florida. Part I).

Verónica Schulte-Herbrüggen K. y cols.

PRESCRIPCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN CIRUGÍA ORAL. EXPERIENCIA EN LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA UNIVERSIDAD DEL DESARROLLO-LA FLORIDA. PARTE II. (Antibiotic prescription in oral surgery patients at the Clínica Universidad del Desarrollo-La Florida. Part II).

Stefania Pedemonte V. y cols.

REVIEW ARTICLE

CARBONIC ANHYDRASE FROM *Helicobacter pylori* AS PHARMACOLOGICAL TARGET: USING NATURAL POLYPHENOLS AS POTENTIAL TEMPLATES FOR DEVELOPMENT OF NEW ANTIMICROBIALS

(Anhidrasa carbonica de *Helicobacter pylori* como blanco farmacológico: uso de polifenoles naturales como potenciales modelos para el diseño de nuevos antimicrobianos).

Edgar Pastene N.^{1*}, Romina Carvajal C.^{1,4}, Felipe Zúñiga A.², Julio Alarcón E.³ y Apolinaria García C.⁴

¹Laboratorio de Farmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, P.O. Box 237, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

²Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, P.O. Box 237, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

³Laboratorio de Síntesis y Productos Naturales, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile.

⁴Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

ABSTRACT

The pathogen *Helicobacter pylori* (Hp) is a bacterium that infect near the half of the world's. In Chile infection with Hp reach overall ~ 80%, depending on the geographic area and socioeconomic factors. Nowadays, it is well established that Hp infection underlies the etiology of several gastrointestinal pathologies like duodenal ulcer, gastritis and gastric cancer. The consensus for treatment of Hp infection considers using two antibiotics and a proton pump inhibitor during 14 days. This schedule often is associated with the report of side-effects, which eventually could lead to drop out eradication therapy and finally to elevate the prevalence of antimicrobial resistance. Due to Hp strains displaying antibiotic resistance phenotypes are dramatically increasing, a plethora of studies has been focused in the search for new natural substances with anti-Hp activity. Regarding this later, since year 2011 our group investigates the effect of natural proanthocyanidins (PAC) upon Hp infection (Fondecyt 11110442). In this study we demonstrate that urease inhibition and Hp-adherence to AGS cells depends on PAC size and flavan-3-ol nature. Recently, Hp carbonic anhydrase (CA) has gained importance because it acts cooperatively with urease and help to neutralize the pH of the surrounding environment. According to literature, inhibition of CA depends on the "Zinc Binding Properties" of the molecule. In this context, polyphenols have been the most investigated, albeit its activity is by far less potent than classical inhibitors like sulfonamides (e.g., acetazolamide). In line with these findings, we observe that a series of PACs-derivatives prepared via nucleophilic attack showed poor inhibition upon urease, but display a consistent inhibition of human carbonic anhydrase (hCA I). In order to improve Hp CA inhibition properties, different synthetic strategies could be applied using various phenolic scaffolds as template. In this review we will give an overview regarding the importance of the AC as a potential anti-Hp target and specifically how polyphenols could be interesting candidates for development of new HpCA inhibitors. Hence, natural polyphenols could be used as model for the design of new semi-synthetic and synthetic derivatives with anti-Hp effects through the concomitant inhibition of carbonic anhydrase and urease activities (Fondecyt 1150948). Such effects could reduce the ability of this pathogen to colonize gastric mucosa. The introduction of specific "Zinc Binding Groups" and the support of *in silico* tools will guide the refining of such compounds in order to originate more potent, selective and safer molecules valuable for the eradication of this pathogen.

Keywords: *Helicobacter pylori*, polyphenols, carbonic anhydrase, zinc binding group.

Rev. Farmacol. Chile (2016) 9 (1) 7-18

Received 14-03-2016; Revised 15-04-2016; Accepted 24-04-2016

1) *Helicobacter pylori* INFECTION, A PUBLIC HEALTH PROBLEM:

Helicobacter pylori (Hp) is a bacterium that infect near the half of the world's population with prevalence up to 90% in some developing countries. In such countries this pathogen is acquired during childhood and its prevalence is greater in individuals belonging to lower socioeconomic status (García, et al., 2014). In Chile infection with Hp reach

overall ~ 80%, depending on the geographic area and gastric cancer mortality rate, principally (Ferrecio et al., 2007). This bacteria is the etiologic agent of several gastrointestinal pathologies like duodenal ulcer, gastritis, gastric cancer and MALT lymphoma (Lamb and Chen 2013; Wang et al., 2014). Additionally, the role of Hp in extra-gastric pathogenesis like cardiovascular disease, Alzheimer or colorectal cancer has been proposed (Franceschi et al., 2014; Wang et al., 2014).

Correspondence to: Dr. Edgar Pastene. Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, P.O. Box 237, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. Teléfono: 56-041-2204208, E-mail: edgar.pastene@gmail.com

Currently, *Hp* treatment combines two antibiotics (clarithromycin plus amoxicillin or metronidazol) and a proton pump inhibitor (omeprazol), which must be administrated during 14 days according with the last Maastricht consensus (Malfertheiner et al., 2012). Despite of therapy duration, it is well-known that side-effects are frequent and eventually could lead to fail to eradicate *Hp* (Cavallo et al., 2006; Ayala et al., 2014). On the other hand, the prevalence of antimicrobial resistance varies geographically and ranges from 10 % to 90 % for metronidazol and from 15 to 83 % for clarithromycin (Megraud, 2007; Carmago, 2014). Moreover, strains displaying antibiotic resistance are increasing, thereby the search of new substances with anti-*H. pylori* activity is considered an important task (Ayala et al., 2014). In this line, a number of different natural products have been screened, for instance essential oils, alkaloids and polyphenols (Romero et al., 2007; Ayala et al., 2014).

2) KEY ROLE OF UREASE AND CARBONIC ANHYDRASE IN ACID ACCLIMATION OF *H. pylori*:

The high efficiency of this bacterium to colonize human gastric mucosa is largely due to its ability to neutralize acidic environment of the stomach (Salama et al., 2013). Such property is associated with the production of a large amount of an enzyme named urease (EC 3.5.1.5), which represent about 2-16% of the total protein synthesized by this pathogen (Sachs et al., 2003). Although urease is important during early stages of colonization, recently has been established that urease is not the only enzyme that *Hp* used to neutralize HCl in order to prevail in the gastric mucosa. It is known that **carbonic anhydrase (CA) of this bacterium acts cooperatively with urease, helping to neutralize the pH** of the surrounding environment by means of bicarbonate production (Marcus et al., 2005). As shown in **Figure 1**, there is a close relationship between urease and CA, which allow to this bacterium manage a fine control of the surrounding pH. Indeed, *Hp* is endowed with pH-sensor systems (HP0244, ARSS, ExDb) that enable to detect changes in pH and further assemble the cytoplasmic urease to produce ammonia (Scott et al., 2010; Marcus, 2013; Wen et al., 2009). The urease activity is also dependent on the urea influx, which is controlled by a porin located in the outer membrane and the UreI channel, which increases about 300 times the diffusion of urea to the cytoplasm of *Hp* when the pH drops to critical levels (Bury-Moné et al., 2001). Wen et. al, (2007), found that exposure to acid pH also induces the expression of other genes linked to adaptation. In particular, they noted that

ArsRS regulon is also involved in raising up to **5 times in the expression of periplasmic carbonic anhydrase** (gene HP1186, hpaCA, carbonate dehydratase EC 4.2.1.1). This isoform of CA has certain modifications allowing its location in the inner membrane of bacterium with the catalytic site facing the periplasm. As shown in **Figure 1**, CA also has a regulatory role in the cytoplasm where participates in the pH modulation. However, through the work of Chirica and colleagues (2001, 2002) it was determined that **this kind of CA belongs to a different isoform named β -CA, which predominates in the cytoplasm**. Moreover, SS1 *Hp* mutant strains for both urease and CA were unable to colonize murine gastric mucosa. These findings clearly demonstrate that CA is an enzyme essential for the survival of *Hp* (Bury-Moné et al., 2008). Importantly, recently has been reported that certain CA inhibitors such as acetazolamide can inhibit the infective capability of *Hp* suggesting that the enzyme is a molecular target of high value (Nishimori et al., 2006). Interestingly, the aforementioned is consistent with previous studies in humans that were treated with acetazolamide to aid the healing of gastric ulcers (Valean et al, 1984; Shahidzadeh et al, 2005). In such patients, the treatment not only was effective in the healing of the ulcer but also lowering its recurrence (6% after 2 years treatment). **This latter has encouraged many researchers to seek for new antibiotics based on the structure of these molecules** (Nishimori et al, 2006; Supuran 2011).

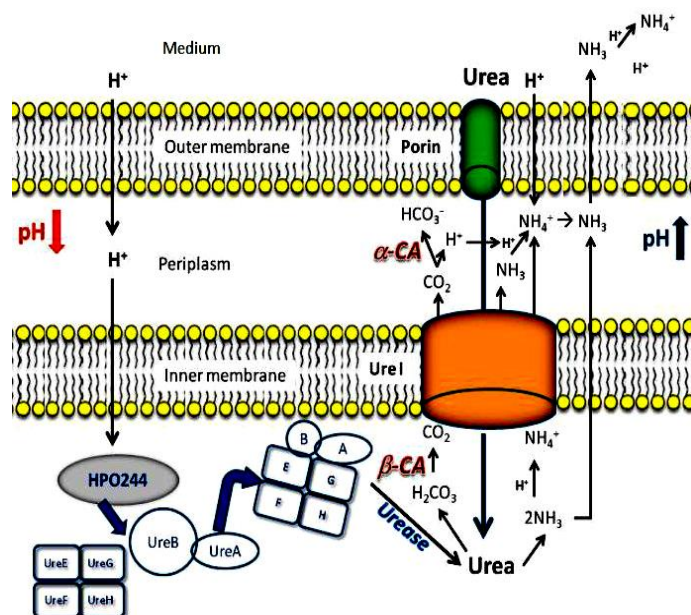
3) CARBONIC ANHYDRASE FROM *H. pylori*:

Carbonic anhydrases CA (EC 4.2.1.1) are a group of metalloenzymes widely distributed in living organisms. There are six distinct forms of CA described to date: α -, β -, γ -, δ -, ζ - and η -CAs (Supuran et al., 2010; Supuran, 2015; Capasso & Supuran, 2015). Although, α -CA commonly is found mainly in its monomer form, a crystallographic analysis performed recently by Modak et al., (2013) establish that in *Hp* this type of CA form predominantly dimers. By another side, β -CA could form dimers, tetramers and octamers. The α -CA is typically founded in vertebrates, protozoa, algae, green plants and bacteria, whereas β -CA are mostly founded in bacteria, algae and *Archaea* (Smith et al., 1999).

In living organism these enzyme participates in many relevant biological process such as respiration, CO₂ homeostasis, gluconeogenesis, lipogenesis and ureagenesis and tumorigenicity (Supuran 2008; Imtaiyaz et al., 2013). Indeed, one of the drawbacks of using CA as molecular

target is the fact that there are a large number of isoforms in many tissues and organs (Supuran, 2010). In humans, only CA isoforms such as CA II, VI, VII, IX, XII and XIII are susceptible of being inhibited by sulfonamides. Therefore, in the designing process of hpCA inhibitors one should guarantee that these new molecules as far as possible should be highly specific. The alpha form of *Hp* CA (hp α CA) was initially cloned by Chirica et al., (2001). This group reported that hp α CA has a catalytic activity similar to hCA I. Interestingly, using the full-length hp α CA and its carboxyterminal truncated form, inhibitors of human α -CA like acetazolamide were able to inhibit the bacterial enzyme with K_i values of 12-84 nM (Nishimori et al., 2006 a,b). Moreover, this group performs the same approach with hp α CA and demonstrates that this form also could be inhibited by different sulfonamides and sulfamates. **All these data suggest that the design of inhibitors with activity against both isozymes should lead to *Hp* death and thereby to its eradication** (Nishimori et al., 2007, 2008).

Figure 1. Role of urease and carbonic anhydrase in pH regulation by *Helicobacter pylori* (Adapted from Supuran, 2008 and Scott et al., 2007).

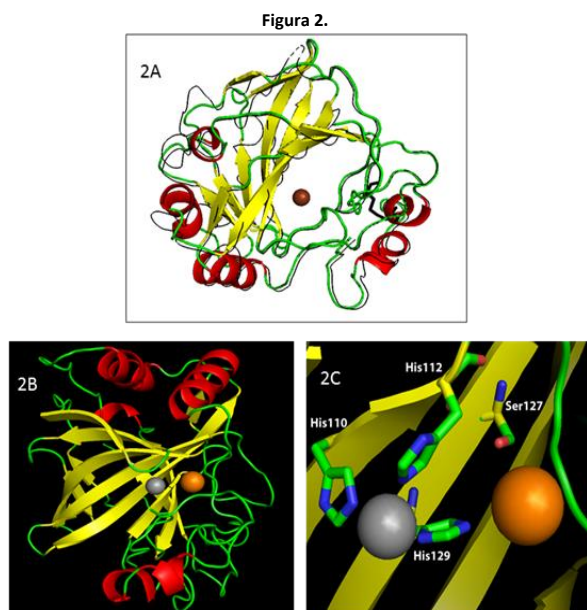


3.1) STRUCTURAL INSIGHTS OF ALPHA-CARBONIC ANHYDRASES

Crystal structures of the α -class include various mutants of different isoforms as well as complexes of the protein with inhibitors and/or activators. The first CA crystal structure of human isozyme II was determined in 1972 (Liljas *et al.*, 1972). Despite the obvious overall structural differences between CA classes, closer inspection of the active sites reveal remarkably similitude of the catalytic zinc center. The overall fold of hCA II can be described as a single-domain, mixed α/β , globular protein that is almost spherical with approximate dimensions of 5 x 4 x 4 nm³ (Lindskog, 1997). A cluster of aromatic residues at the N-terminus of the enzyme consisting of Trp5, Tyr7, Trp16, and Phe20 has been suggested to assist in the anchoring of this region to the rest of the enzyme (Lindskog, 1997). The active site folds first and independently of the N-terminal region (Aronsson *et al.*, 1995). The central feature of the hCA II structure can be described as a 10-stranded (β A- β J) twisted β -sheet, which is decorated on the surface by seven α -helices. The strands of the β -sheet are mainly antiparallel, with the exception of two pairs of parallel strands. There is a conserved loop region extending towards the active site that contains the proton shuttling residue, His64. The active site consists of a conical cleft that is ~ 15 Å deep with the catalytic Zn²⁺ placed at the bottom of the cleft. The Zn²⁺ is tetrahedrally coordinated by four direct ligands: the imidazole groups of three conserved His residues (His94, His96, and His119) and a H₂O/OH⁻ molecule (Figure 2 B). In HpCA Zn²⁺ atom is coordinated by three histidine residues, His110, His112 and His129 as is shown in Figure 2 C. Additionally, a Cl⁻ ion (orange, sphere) is coordinated by histidine residue 129 and serine residue 127.

Major research on the α -class CA was performed mostly with the mammalian isoforms. However, many bacteria contain α -CAs as well (Supuran 2012). They were identified in many pathogenic species, such as *N. gonorrhoeae*, *H. pylori* and *E. coli*, among others. As is shown in Figure 2A amino-acid sequence and structural comparison of the *N. gonorrhoeae* α -CA with the human isoforms hCA I and II and hpCA suggested that secondary structures are essential identical, although, some loops are much shorter

(Chirica *et al.* 1997; Elleby *et al.* 2001). The active-site residues are almost identical to those of the hCA II.

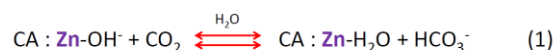


(A) The threaded structure of HpCA (dark line) superimposed on the *N. gonorrhoeae* CA crystal structure (ribbon, pdb code 1kop [Huang, S., 1998]). The putative zinc binding site is shown in brown sphere representation. Threading calculations were performed using the software DeepView/Swiss pdb-viewer together with Swissmodel on ExPASy (<http://www.expasy.org/spdbv/>), [Guex N, 1997]. **Figure 2B:** Active Site of α -HpCA. The 3D structure of α -HpCA of *Helicobacter pylori* is shown in cartoons representation. **Figure 2C:** Three histidines residues (H110, 112 and 129) coordinate the zinc at the putative binding site (shown in grey sphere representation). A Cl⁻ ion (orange, sphere) is coordinated by histidine residue 129 and serine residue 127.

3.2) CATALYTIC FUNCTION OF hpCA:

Although alpha and beta isozymes have similar activity, cytoplasm hp α CA form has a role strongly linked to urease function, because it participates in the metabolism of urea and bicarbonate (Scott *et al.*, 2007). Cytoplasmic isoform has a catalytic activity 3.2 times higher than that of hp α CA and very similar to hCA I activity. However, its Km is closer to the reported value for hCA II (Nishimori *et al.*, 2006). Overall, the catalytic efficiency of CA is one of the most elevated in nature ($k_{cat} \text{ CO}_2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$) with second order constants close to the diffusion-control limit ($k_{cat}/K_m \text{ CO}_2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Lingskog and Silverman, 2000). The main function of this enzyme is to catalyze the reversible hydration of CO₂ to bicarbonate. This reaction occurs in

two steps in a mechanism named "ping pong" (Lingskog, 1997). In the first part it occurs a direct nucleophilic attack of the Zn(II)-bound hydroxide group upon CO₂ to form metal-bound HCO₃⁻, which is further displaced by a molecule of water (equation 1).



In the second step, the molecule of water that remains bounded to Zn(II) it transfers a proton to buffer molecules present in the solvent regenerating the Zn(II)- bound hydroxide of CA (equation 2) (Boone *et al.*, 2013). Such mechanism is shared by Hp CA isozymes.

4) CARBONIC ANHYDRASE INHIBITORS

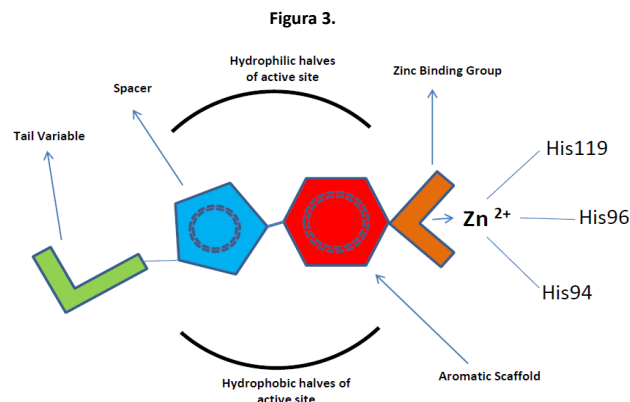
4.1) DESIGN AND SYNTHESIS OF NEW CA INHIBITORS: IMPORTANCE OF ZINC BINDING GROUPS AND *in silico* APPROACHES:

AS mentioned above, acetazolamide (AZA) and several of it derivatives have also demonstrate been effective hpCA inhibitors. In general terms such property could be explained by the presence of substituent -SO₂NH₂ which functions as a "Zinc Binding Group" (ZBG), forming a complex that prevent catalytic activity of the enzyme (Aggarwal *et al.*, 2013) (**Figure 3**). According to the model, these derivatives bind to the deprotonated form of the Zn(II) ion and also forming part of hydrogen bonds and van der Waals interactions with amino acid residues which participate in the definition the hydrophobic and hydrophilic regions of the active site. By far, research regarding sulfonamides derivatives is the most frequent, mainly in the search of new leading molecules with better selectivity upon different CA isoforms (Di Fiore *et al.*, 2007; Rami *et al.*, 2013; Alafeefy *et al.*, 2013; Aggarwal *et al.*, 2013; Vullo *et al.*, 2016; Prete *et al.*, 2016). However, as will be discussed below, the ZBG may vary and should not necessarily belong to -SO₂NH₂ family, although this group has one of the higher affinities to CA-bounded zinc. Additional modifications of the sulfonamide derivatives may improve their affinity and in some cases the selectivity toward other isoforms. For example, the introduction of substituent like cyanoacrylamide in certain benzenesulfonamides generates inhibitors with activities in the subnanomolar range. Moreover, these derivatives are more specific upon the human CA isoforms IX and XII,

which are associated to malignancy (Alafeefy et al., 2013). Similarly, the compounds derived from nitroimidazole-sulfonamides/sulfamide/sulfamates possess greater activity on CA isoform IX and have shown great potential for attack hypoxic tumors over-expressing extracellular CA isoforms (Rami et al., 2013). Recently, it was reported that sulfonamides incorporating 4- and 3-nitrophthalimide moieties generates potent inhibitors of human CA I, II, IX and XII isoforms (Sethi et al., 2014). One of the more detailed sulfamate and sulfamide derivatives QSAR studies was recently published by Tarko and Supuran (2013). Using the algorithm PRECLAV they analyzed 116 derivatives in their ability to inhibit human CA isoforms I, II, IX and XII, 51 of which were theoretical molecules (not synthesized). Among the main conclusions that can be mentioned: a) inhibition depends on the molecular shape and size of sulfonamide ($-SO_2NH_2$) and to a lesser extension sulfamate ($-O-SO_2NH_2$)/sulfamide ($-NH-SO_2NH_2$) b) the introduction of lipophilic groups seems not to affect the activity c) the presence of molecular fragments C6 (fully substituted benzene), F, O, and NO_2 increases the activity of the inhibitors d) the presence of molecular fragments C, CH, CxHy (benzene / substituted naphthalene) decrease the activity e) The mechanism of inhibition appears to be similar for isozymes hCA IX and XII. As mentioned above, other groups besides sulfonamides could inhibit different isoforms of CA. For instance, Barrese et al., (2008) reported that the synthetic drug thioxolone inhibit hCA II. Actually, this compound suffers hydrolysis giving a mercaptophenol derivate which is the inhibitor formed *in situ*. Despite the interesting profile of these thio-derivates, sulfonamides still are the better inhibitors with Ki values in the nanomolar range (Innocenti et al., 2008). By another side, Senturk et. al., (2009) tested 10 new synthetic biphenyl di-phenols which demonstrate interesting inhibitory properties against hCA I and II. These results indicate that phenol framework could be used as template for the synthesis of new CA inhibitors. Another research group described the CA inhibitory effects of dithiocarbamates (DTC) (Innocenti et.al, 2010; Carta et al, 2012; Oozing, 2015; Vullo et. al, 2016). Through studies based on x-ray crystallography, Carta et al., (2012) demonstrated that one of the sulfur atoms of the inhibitor coordinates with the ion Zn (II) as monodentate ligand and in turn directs the canonical interactions of all ZBGs with Thr199-Glu106 residues establishing favorable interactions with nearby amino acid residues, whose range of activity was between 0.97 nM-1.84 mM. Maresca et al., (2013) and Monti et al., (2012) describe a series of disubstituted dithiocarbamates (N-mono- and -N, N) as effective inhibitors of β -CA from the pathogen *Mycobacterium tuberculosis* [mtCA1

(Rv1284) and mtCA3 (Rv3273)], and also from pathogenic fungi *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and *Candida glabrata*. All these enzymes were inhibited effectively in subnanomolar to micromolar ranges, depending on the substitution pattern of the nitrogen atom of dithiocarbamate zinc binding group.

Recently, a new class of inhibitors belonging salicylaldoxime skeleton has been synthesized. Eight of these derivatives were assayed against CA I, II, IX and XII, (Tuccinardi et al., 2013). Using docking and quantum molecular experiments author demonstrated that salicylaldoxime group is a new kind of ZBG. Hydroxamic acid derivates also possess metal binding functions and have been assessed for its inhibitory properties on histone deacetylase, other zinc enzyme associated to cancer process. However, these compounds could be metabolized generating potentially mutagenic hydroxilamines (Park et al., 2010). Due to most of the synthetic compounds described above have limited clinical applications and unknown toxicity, the search of safer molecules is necessary.



General scheme for the design of CA inhibitors harboring ZBG and variable tail. Aromatic scaffold and the spacer help to modulate interactions with hydrophilic and hydrophobic boundaries of the active site (adapted from Pala et al., 2014).

4.2) Natural phenolic compounds as CA inhibitors:

Recent studies incorporate both, natural and its isolated constituents (such as fungi and plants). These works have reported new chemotypes possessing CA inhibitory activity that can potential serve for the design of future

drugs (Karioti et al., 2015). Certain flavonoids inhibit the enzyme glyoxalase-1, which is involved in cancer (Al-Balas et al., 2012). Among the findings of this study, it was reported that the presence of planar C-4 carbonyl and C-5 hydroxy groups in flavonoids allows the coordination with zinc atom of the enzyme in a similar manner to hydroxamic acid, a well-known zinc binding molecule, which inhibit CA. Huang et al., (2009) investigated the inhibition of seven natural phenols upon hCA II, being grifolic acid (IC_{50} 6.37 μ mol/L) and 4-O-methylgrifolic acid (9.79 μ mol/L) the most active. These results suggest that there are other functional groups beside sulfonamides that can bind zinc. Indeed, docking calculations suggest that grifolic acid could form bidentate interactions with zinc. So, flavonoids from different sources are among the phenolic compounds more investigated as inhibitors of CA. Ekinci et al., (2013) evaluated the inhibitory effect of quercetin, catechin, apigenin, luteolin and morin on the activity of four different human hCA (isoforms I-IV). In all cases inhibition (K_i) was in the range 2.2-12.8 μ mol. In other study (Sarikaya et al., 2010), several phenolic acid were investigated on hCA I and II. Competitive inhibition was founded for quercetin against hCA I, whereas gallic acid and p-coumaric acid inhibited hCA II. Nevertheless, syringic acid, ellagic acid, ferulic acid, caffeic acid, p-coumaric and p-hydroxybenzoic acid inhibit hCA I and hCA II in a non-competitive fashion. Innocenti et al., (2008) investigate the effect of resveratrol, curcumin, catechin, silymarin and 2-hydroxycinnamic acid against β CA isoforms I-XV. All compounds inhibit CA in the range of K_i 380 nmol - 12.02 μ mol. The authors note that these compounds were competitive inhibitors but not elucidate the nature of the interaction with the enzyme. Coumarins are one of the few reported examples of phenolic natural products (non-flavonoid) modified by the introduction of sulfonamide groups. Previously, Maresca et al., (2009) demonstrated that these coumarins inhibit CA in nanomolar range after they were hydrolyzed inside the catalytic site giving *cis*-2-hydroxy cinnamic acid. They establish that coumarins are suicide inhibitors because their hydrolysis products in fact are able to plug the entrance of the catalytic site. This mechanism does not compromise the catalytically active zinc ion as sulfonamide derivatives. Despite these findings, Tars et al. (2013) synthesized several sulfocoumarins, which suffered hydrolysis by esterase activity of CA II. The products of this cleavage were 2-hydroxyphenyl vinylsulfonic acids, which subsequently bound in a different region of the catalytic site. However, the sulfonic acid was observed anchored to the zinc-coordinated water molecule, making favorable interactions with Thr200 and

Pro201. Moreover, certain natural phenolics compounds inhibit CA by means of different interactions inside de active site cleft of CA and not necessarily by direct coordination with zinc. This finding was reported by Davis et al., (2011) in a study where 21 natural phenolic derived compounds (fungal and plant reported) were tested against fungal and *Mycobacterium* β and α CAs. This work revealed that phenolic hydroxyl of these compounds interacts with CA in a nonclassical fashion binding directly to zinc-bound water molecule through hydrogen bond. Furthermore, this binding mode provide to these compounds with certain selectivity of β over α CA inhibition. Additionally, these natural phenolics were used as scaffolds to synthesize eight new phenol-based amides by reaction of 3-chloro-4-hydroxyphenylacetic acid with different amines using 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride and 4-dimethylaminopyridine. One of these compounds contain the ZBG sulfamide (-SO₂NH₂). As expected, in this derivative the binding to CA zinc and its inhibition were improved. **Therefore, we thought that different phenolic compounds structures could be refined, improving its zinc binding properties.** However, ZBG derived from sulfonamide, sulfamate or sulfamide are very rare in plants (Poulsen and Davis, 2014). Hitherto, (-) altemicidin and psammaphin are the unique natural compounds harboring the ZBG -SO₂NH₂. Both compounds are alkaloids isolated originally from the marine organisms *Streptomyces sioyaensis* and *Pseudoceratina purpurea*, respectively. Such compounds have acaricidal and antitumor activities acting for example as autophagy inducers or histone deacetylase and topoisomerase II inhibitors (Takahashi et al., 1989; Kim et al., 1999; Mallol et al., 2014; Kim et al., 2015). Scozzafava et al., (2015) reported that certain phenolic compounds inhibit isozymes of human carbonic anhydrase (hCA I, II, IX and XII), with K_{is} ranging from 2.20 to 515.98 μ M. Among the phenols tested, compounds derivatives of 4-methyl catechol and 3-methoxy catechol showed potent activity (sub-micromolar range) and high selectivity against transmembrane tumor associated isoforms of CA (hCA IX and XII). Karioti et al., (2015) described the *in vitro* inhibition of different hCA isoforms of a group of natural polyphenols including flavones, flavonols, flavanones, flavanols, isoflavones and depsides extracted from *Salvia miltiorrhiza* and *Quercus ilex*. They found that these derivatives not only showed inhibitory activity but also high selectivity against isoforms of hCA I and II. An additional comment is that the introduction of caffeic acid units in such structures compared to the tested monomers caused a significant change in the inhibitory activities. It was reported that their potency improved dramatically for

hCA IV, VII and XII isoforms (e.g. 0.04 to 0.07 μM for salvianolic acid versus 10.1 to 6.4 mM for caffeic acid). Demir et al., (2015) report that total anthocyanins from Cherry inhibit the activity of hCA I and II hCA. Among all cultivars, 'Karakiraz' was the most active both in hCA I (IC_{50} = 30.59 mg/mL) and hCA II (IC_{50} = 44.52 mg/mL). Also, effects of rosmarinic acid on the inhibition of tumor-associated hCA IX and XII had been demonstrated. Interestingly, rosmarinic acid inhibited these enzymes with K_{is} ranging from micromolar to picomolar order (Gülçin et al., 2015). On the other hand, a series of flavonoid C-glycosides were tested for the inhibition of class β CA from *Brucella suis*. Many compounds showed activity in the micromolar range or submicromolar with K_i values in the range of 0.68 to 7.92 mM. Also an excellent selectivity against human isoenzymes in the range 3.6 - 9.3 μM range (hCA I) and 3.1- 8.8 μM (hCA II) was observed. Glycosides that incorporate 3-hydroxyphenyl moiety showed the best inhibition profile (Riafrecha et al., 2015). Küçükbay et al., (2015) reacted quinolone coumarin derivatives and replacing with the amino group, resulting amino acid conjugates coumarin / quinolinone. These coumarins conjugates showed selective inhibition profile for membrane bound cytosolic isoforms of CA. They displayed inhibition at submicromolar levels for hCA IV and XII, with inhibition constants ranging from 92 nM to 1.19 μM for hCA IV, and between 0.11 and 0.79 μM for hCA XII. Ferrari et al., (2015) studied a series of coumarins and its corresponding 2-thioxocoumarines. Unlike the mechanism above mentioned in the text for *in-situ* hydrolysed coumarins its was observed that intact 2-thioxocoumarin binds to hCA II, with its exo-sulfur atom anchored to the water molecule of coordinated zinc atom, while the scaffold provides favorable contacts with surrounding amino acid residues of the active site. The interaction with CA of 7-Amino-3,4-dihydro-1H-quinolin-2-one, a compound structurally similar to coumarins, also was investigated. Effectively it inhibited the cytosolic isoform of VII hCA (K_i 480 nM) and the transmembrane isoforms of hCA, IX, XII and XIV (K_{is} in the range of 16.1 to 510 nM) where inhibition was associated to the presence of amino bicyclic -quinolinone group (Vullo et al., 2015). Hunt et al., (2015) tested the *in vivo* and *ex vivo* effects of dopamine arachidonoyl, 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde and 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic acid against esterase and CO_2 -hydratase activities of CA isozymes I and II. For hCA I the K_i values were 203.80, 910.00 and 1170.00 μM , respectively and for hCA II were 75.25, 354.00 and 1510.00 μM , respectively. Using the CO_2 -hydratase methodology, IC_{50} values were in the range of 173.25 to 1360.0 μM for CA I and II, respectively. These results demonstrated that the

phenolic compounds assayed *in vivo* may be used in several biomedical applications to inhibit about 30% of the CO_2 -hydratase activity of CA.

With these data in mind, our research strategy initially is focused in: 1) Through virtual screening explore the presence of no-sulfonamide ZBG in phenolic compounds 2) generate flavonol-derived (PACs-adducts) compounds with CA inhibitory properties 3) Introduce ZBG to phenolic compounds in order to improve its inhibitory activity (Fondecyt 1150948). In previous work, our group found that proanthocyanidins (PACs) can inhibit urease, which makes them an interesting natural and low toxicity supplement to prevent infection (Pastene et al., 2009). PACs are oligomeric forms (DPm 2 to >10) of flavan-3-ol like epicatechin or catechin as main monomers (Fine, 2000). A structure-activity study established that the effect of these compounds depends largely on its molecular size and type of monomer (Fondecyt No. 11110442). In particular, it was established that the minimal active structure corresponds to dimers of PAC, being catechin-derived PACs more effective than their epicatechin-derived counterparts (Pastene et al., 2014). However, after reviewing the literature it is clear that so far has not been explored the possibility of combine both urease inhibitory properties of PACs, with the ability to inhibit the CA of phenolic-derivatives harboring ZBG. These new strategies may go beyond prophylactic aspects. In order to specify the minimum structure able to inhibit *Hp* urease, we prepare low-molecular derivatives form PACs by nucleophilic attack. These compounds showed far less inhibitory effects compared with natural PAC, like dimers (eg. PAC B2, PAC B1). However, in a preliminary screening using human CA (hCA I), derivatives prepared by nucleophilic attack of **apple PACs with phenols such as phloroglucinol, resorcin and orcin showed a consistent inhibition of the enzyme (Table 1).**

Table 1. Inhibition of Carbonic anhydrase CA I by different flava-3-ol adducts prepared from polymeric PACs.

Extract/Compound	* IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Apple peel Extract	> 3000
Polymeric PACs apple	> 1000
epicatechin-Phl	520**
epicatechin-orc	320**
epicatechin-res	123**
epicatechin-toluene- β -thiol	2240**
epicatechin-cysteamine	2240**
acetazolamide	0.12

* Determined in human Carbonic anhydrase (CA I) by nitrophenyl acetate method. ** Adducts prepared from apple peel polymeric PACs.

4.3) FUTURE PERSPECTIVES:

These preliminary results lead us to propose **that phenolic derivatives could be an unlimited source of candidates for development of new molecules with CA inhibitory activity**. Nevertheless, there are a reduced number of nucleophilic agents that can be used for generate flavan-3-ol-adducts from PACs. Therefore, the construction of a vast library of phenolic-based compounds useful as CA inhibitors is limited. Considering this last issue and based in the antecedents gathered in this review, during 2016 we plan to explore some alternatives for the synthesis of phenolic with improved CA inhibitory properties. For instance, aldol condensation using acetophenones and substituted benzaldehyde (eg. p-sulfamoylbenzaldehyde) will be explored in order to generate new phenolic-ZBG compounds (Alarcón et al., 2013). As mentioned above, one of the most noticeable group of CA inhibitors are coumarins, which could be easily synthesized via classic Peachmann condensation of phenols with α - keto esters (Pechmann 1883). Also, Knoevenagel condensation of salicylaldehyde with different ethyl acetate derivatives allows the synthesis of a high variety of coumarins (Freeman 1980). Furthermore, we plan to develop another synthesis strategy using the advantage and knowledge of "Click Chemistry" approach. Hence, we will prepare phenolic compounds with different ZBG using click partners for cycloaddition reaction of alkyne/azide. Hitherto, **synthesis of these flavonoid chimeras through such approach has not been reported before**, albeit the synthesis of flavonoids carrying azide groups or the alkyne moiety was published previously (Patoney et al., 1988; Tanaka et al., 2000; Roy et. al., 2009). Using this strategy, a bigger amount of new inhibitors could be obtained reacting the flavonoid (carrying azide or alkyne moieties) with several alkyne or azido-substituted sulfonamides. This approach has the advantage of its modularity, short reaction times and high yields. The synthesis could be assisted with copper or "target-guided" using CA as catalyst for assembling the new inhibitors. Also one can project that these new class of "phenolic-inspired" molecules could be orientated to other biological targets like cancer-associated CA and inflammation (Zhuang et al., 2015).

ACKNOWLEDGEMENTS

E. Pastene acknowledges Fondecyt Grant N° 1150948 for financial support.

REFERENCES:

- Aggarwal M, Kondeti B, McKenna R. Insights towards sulfonamide drug specificity in alpha-carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem.* 2013; 21: 1526-1533.
- Alarcón J, Alderete J, Escobar C, Araya R, Céspedes C. *Aspergillus niger* catalyzes the synthesis of flavonoids from chalcones. *Biocatalysis and Biotransformation.* 2013; 31(4):160-167.
- Alafeefy A, Isik S, Al-Jaber N, Vullo D, Abdel-Aziz H, Awaad A, Capasso C, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors. Benzenesulfonamides incorporating cyanoacrylamide moieties strongly inhibit *Saccharomyces cerevisiae* b-carbonic anhydrase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013; 23(12): 3570-3575.
- Al-Balas Q, Escobedo-Hinojosa M, Al-Oudat B, Alzoubi H, Mhaidat N, Almaaytah A. Generation of the first structure-based pharmacophore model containing a selective "Zinc Binding Group" feature to identify potential glyoxalase-1 inhibitors. *Molecules.* 2012; 17: 13740-13758.
- Aronsson G., Mårtensson L.G., Carlsson U., Jonsson B.H. Folding and stability of the N-terminus of human carbonic anhydrase II, *Biochem.* 1995; 34:2153-2162.
- Ayala G, Escobedo-Hinojosa Wl, de la Cruz-Herrera CF, Romero I. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* Infection. *World J Gastroenterol* 2014; 14; 20(6): 1450-1469.
- Barrese A, Genis C, Fisher S, Orwenyo J, Kumara M, Dutta S, Phillips E, Kiddle J, Tu C, Silvermann D, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, McKenna R, Tripp B. Inhibition of Carbonic anhydrase II by thioxolone: a mechanistic and structural study. *Biochemistry.* 2008; 47(10): 3174-3184.
- Boone CD, Habibzadegan A, Gill S, McKenna R. Carbonic Anhydrases and Their Biotechnological Applications. *Biomolecules.* 2013; 3(3):553-562.
- Bury-Moné S, Skouloubri S, Labigne A, De Reuse H. Urel: A *Helicobacter pylori* protein essential for resistance to acidity and for the early steps of murine gastric mucosa infection. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2001; 25(6-7): 659-663.
- Bury-Moné S, Mendz GL, Ball GE, Thibonnier M, Stingl K, Ecobichon C, Avé P, Huerre M, Labigne A, Thiberge JM, De Reuse H. Roles of alpha and beta carbonic anhydrases of *Helicobacter pylori* in the urease-dependent response to acidity and in colonization of the murine gastric mucosa. *Infect. Immun.* 2008; 76(2): 497-509.
- Camargo MC, García A, Riquelme R, Otero W, Camargo CA, Hernández-García T, Candia R, Bruce MG, Rabkin CS. The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America. *American Journal of Gastroenterology* 2014; 109(4):485-95.
- Cao X, Tsukamoto T, Nozaki K, Tanaka H, Cao L, Toyoda T, Takasu S, Ban H, Kumagai T, Tatematsu M. Severity of gastritis determines glandular stomach carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected mongolian gerbils. *Cancer Sci.* 2007; 98(4): 478-483.

- Capasso C, Supuran C. Bacterial, fungal and protozoan carbonic anhydrases as drug targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2015; 19(12): 1689-1704.
- Carta F, Aggarwal M, Maresca A, Scozzafava A, McKenna R and Supuran C. Dithiocarbamates: a new class of carbonic anhydrase inhibitors. Crystallographic and kinetic investigations. *Chemical Communication*, 2012; 48:1868-70.
- Cavallo L, Egan B, Morain CO, Mario FD. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2006; 11: 36-39.
- Chirica L. C, Elleby B, Jonsson B. H, and Lindskog S. The complete sequence, expression in *Escherichia coli*, purification and some properties of carbonic anhydrase from *N. gonorrhoeae*. *Eur. J. Biochem*. 1997; 244: 755-760.
- Chirica LC, Elleby B, Lindkog S. Cloning, expression and some properties of alpha-carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys Acta*. 2001; 2544(1-2): 55-63.
- Chirica LC, Petersson C, Hurtig M, Jonsson BH, Borén T, Lindskog S. Expression and localization of alpha- and beta-carbonic anhydrase in *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys Acta*. 2002; 160(2): 191-199.
- Davis R, Innocenti A, Poulsen SA, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors. Identification of selective inhibitors of the human mitochondrial isozymes VA and VB over the cytosolic isozymes I and II from a natural product-based phenolic library. *Bioorg. Med. Chem*. 2010; 1: 14-18.
- Davis R, Hofmann A, Osman A, Hall R, Muhlschlegel F, Vullo D, Innocenti A, Supuran C, Poulsen S. Natural product-based phenols as novel probes for mycobacterial and fungal carbonic anhydrases. *J. Med Chem*. 2011; 54: 1682-1692.
- Demir T, Gunesli Z, Sonmez F, Bilen C, Yavuz E and Gencer N. Inhibition of carbonic anhydrase I and II with total anthocyanins extracted from sweet cherry cultivars. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)*. 2015; 14(4):935-941.
- Di Fiore A, De Simone G, Menchise V, Pedone C, Casini A, Scozzafava A, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors: x-ray crystal structure of a benzenefulfonamide strong CA II and CA IX inhibitor bearing a pentafluorophenylaminothioureido tail in complex with isozyme II. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2005; 15(7): 1937-1942.
- Elleby B, Chirica L. C, Tu C, Zeppezauer M, and Lindskog S. Characterization of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae*. *Eur. J. Biochem*. 2001; 268: 1613-1619.
- Ekinci D, Karagoz L, Ekinci D, Sentuk M, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors: in vitro inhibition of alpha isoforms (hCA I, hCA II, hCA III, hCA IV) by flavonoids. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*. 2013; 28(2): 283-288.
- Ferraroni M, Carta F, Scozzafava A and Supuran C. Thioxocoumarins Show an Alternative Carbonic Anhydrase Inhibition Mechanism Compared to Coumarins. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015; 59 (1): 462-473.
- Ferreccio C, Antonio Rollán A, Harris P, Serrano C, Gederlini A, Margozzini P, Gonzalez C, Aguilera X, Venegas A and Alejandro Jara A. Gastric Cancer is Related to Early *Helicobacter pylori* Infection in a High-Prevalence Country. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2007; 16: 662-667.
- Fine AM. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern. Med. Rev*. 2000; 5: 144-51.
- Franceschi F, Zuccala G, Roccarina D, Gasbarrini A. Clinical effects of *Helicobacter pylori* outside the stomach. *Nature Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2014; 11: 234-242.
- Freeman, F. Properties and reactions of ylidenemalononitriles. *Chem. Rev*. 1980, 80, 329-350.
- García A, Salas-Jara MJ, Herrera C, González C. Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host. *World Journal of Gastroenterology* 2014; 20(19): 5632-5638.
- Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997;(18): 2714-2723.
- and Gülcin I, Scozzafava A, Supuran C, Koksai Z, Turkan F, Cetinkaya S, Bingöl Z, Huyut Z & Alwasel S. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016; 10:1-5.
- Huang H, Pan X, Ji Ch, Zeng G, Jiang L, Xiang F, Liu J, Hao X, Zhang Y, Tan N. Screening and docking studies of natural phenolic inhibitors of carbonic anhydrase II. *Science in China Series B-Chem*. 2009; 52(3): 332-337.
- Huang, S., Xue, Y., Sauer-Eriksson, E., Chirica, L., Lindskog, S., and Jonsson, B. H. Crystal structure of carbonic anhydrase from *N. gonorrhoeae* and its complex with the inhibitor acetazolamide. *J. Mol. Biol*. 1998; 283: 301-310.
- Huyut Z, Beydemir S, Gülcin İ. Inhibitory effects of some phenolic compounds on the activities of carbonic anhydrase: from in vivo to ex vivo. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015; 15:1-7.
- Imtaiyaz HM, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg. Med. Chem*. 2013; 21: 1570-1582.
- Innocenti A, Maresca A, Scozzafava A, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of new membrane-associated isoform XV with phenols. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2008; 18: 3938.
- Innocenti A, Scozzafava A, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of transmembrane isoforms IX, XII, and XIV with less investigated anions including trithiocarbonate and dithiocarbamate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012; 20:1548-50.
- Kim D, Lee IS, Jung JH, Lee CO, Choi, SU. Psammaphin A, a natural phenolic compound, has inhibitory effect on human topoisomerase II and is cytotoxic to cancer cells. *Anticancer Res*. 1999; 19(5B): 4085-4090.
- Kim, TH, Kim HS, Kang YJ, Yoon S, Lee J, Choi WS, Jung JH, Kim HS. Psammaphin A induces Sirtuin 1-dependent autophagic cell death in doxorubicin-resistant MCF-7/adr human breast cancer cells and xenografts. *Biochimica et biophysica acta*. 2015; 1850:401-410.
- Karioti A, Carta F and Supuran C. An update on natural products with carbonic anhydrase inhibitory activity. *Current Pharmaceutical Design*, 2015; 22: 1 – 1.

- Karioti A, Ceruso M, Carta F, Bilia A, Supuran C. New natural product carbonic anhydrase inhibitors incorporating phenol moieties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015; 23: 7219–7225.
- Kim J, Min Hee K, Park JG, Park HS, Park J, Chong Y. Synthesis of 4-sulfamoylapigenin as potential antiproliferative agent. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2007; 28(5): 723.
- Küçükbay F, Küçükbay H, Tanc M and Supuran C. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of amino acid – coumarin/ quinolinone conjugates incorporating glycine, alanine and phenylalanine moieties, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015; 1475-6374.
- Lamb A, Chen L-F. Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013; 114:491-497.
- Liljas A., Kannan K.K., Bergstén P.C., Waara I., Fridborg K., Strandberg B., Carlom U., Järup L., Lövgren S., Petef M. (1972), Crystal structure of human carbonic anhydrase C, *Nature New Biol.* 235, 131-137.
- Lindskog S. Structure and mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharmacology and Therapeutics*, 1997; 74(1): 1–20.
- Lindskog S, Silverman D.N. The Catalytic Mechanism of Mammalian Carbonic Anhydrases. In *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*; Chegwidden, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H., Eds.; Birkhäuser Verlag: Boston, MA, USA, 2000; 175–195.
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C A, Atherton J, Axon A T, Bazzoli F., Gian Franco Gensini GF, Javier P Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ, The European *Helicobacter* Study Group (EHSG). Management of *Helicobacter pylori* infection-The maastricht IV/Florence consensus report. *Gut*. 2012; 61(5): 646–664.
- Mallol A, Santalo J, Ibañez E. Psammaplin A improves development and quality of somatic cell nuclear transfer mouse embryos. *Cell Reprogram.* 2014; 16(5): 392-406.
- Maresca A, Temperini C, Pochet L, Masereel B, Scozzafava A, Supuran C. Deciphering the mechanism of carbonic anhydrase inhibition with coumarins and thiocoumarins. *J. Med. Chem.* 2010; 53(1): 335-344.
- Maresca A, Carta F, Vullo D and Supuran C. Dithiocarbamates strongly inhibit the β -class carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2013; 28:407–11.
- Marcus E, Moshfegh A, Sachs G, Scott D. The periplasmic α -carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. *J. Bacteriol.* 2005; 187(2): 729-738.
- Marcus E, Sachs G, Scott D. The role of ExbD in periplasmic pH homeostasis in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2013; 18(5): 363-372.
- Maresca A, Temperine C, Vu H, Pham N, Poulsen SA, Scozzafava A, Quinn R, Supuran C. Non-Zinc Mediated inhibition of carbonic anhydrase: coumarins are a new class of suicide inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; 131(8): 3057-3062.
- Megraud, F. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut*. 2007; 56: 1502.
- Mobley HLT, Hu L, Foxall PA. *Helicobacter pylori* urease: properties and role in pathogenesis. *Scand. J. Gastroenterol.* 2001; 26: 39-46.
- Monti SM, Maresca A, Viparelli F, Carta F, De Simone G, Mühlischlegel F, Scozzafava A and Supuran C. Dithiocarbamates are strong inhibitors of the β -class fungal carbonic anhydrases from *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012; 22:859–62
- Nishimori I, Vullo D, Minakuchi T, Morimoto K, Onishi S, Scozzafava A, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors: cloning and sulfonamide inhibition studies of a carboxyterminal truncated α -carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006; 16: 2182-2188.
- Nishimori I, Minakuchi T, Morimoto K, Sano S, Onishi S, Takeuchi H, Vullo D, Scozzafava A, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors: DNA cloning and inhibition studies of the α -carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*, a new target for developing sulfonamide and sulfamate gastric drugs. *J. Med. Chem.* 2006; 49: 2117-2126.
- Nishimori I, Minakuchi T, Onishi S, Takeuchi H, Vullo D, Scozzafava A, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors: the β -carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori* is a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007; 17(13): 3585-3594.
- Nishimori I, Onishi S, Takeuchi H, Supuran C. The α and β carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori* as novel drug target. *Curr. Pharm. Des.* 2008; 14(7): 622-630.
- Pala N, Micheletto L, Sechi M., Aggarwal M, Carta F, McKenna R, Supuran C. Carbonic Anhydrase Inhibition with Benzenesulfonamides and Tetrafluorobenzenesulfonamides Obtained via Click Chemistry. *ACS Med. Chem Lett.* 2014, 5(8): 927-930.
- Park H, Kim S, Kim Y, Lim S. A structure-based virtual screening approach toward the discovery of histone deacetylase inhibitors: identification of promising zinc-chelating groups. *Chem. Med. Chem.* 2010; 5(4): 591-597.
- Pastene E, Troncoso M, Figueroa G, Alarcón J, and Speisky H. Association between Polymerization Degree of Apple Peel Polyphenols and Inhibition of *Helicobacter pylori* Urease. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 416-424.
- Pastene E, Speisky H, García A, Moreno J, Troncoso M, Figueroa. G. In Vitro and In Vivo Effects of Apple Peel Polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 7172-7179.
- Pastene E, Parada V, Avello M, Ruiz A, García A. Catechin-based procyanidins from *Peumus boldus* Mol. aqueous extract inhibit *Helicobacter pylori* urease and adherence to adenocarcinoma gastric cells. *Phytother. Res.* 2014. DOI 10.1002/ptr.5176. 2119–2128.
- Poulsen SA, and Davis RA. Natural products that inhibit carbonic anhydrase. *Subcell. Biochem.* 2014; 75: 325-347.
- Rami M, Dubois L, Parvathaneni NK, Alterio V, van Kujik SJ, Monti SM, Lambin P, De Simone G, Supuran C, Winum JY. Hypoxia-targeting carbonic anhydrase IX inhibitors by a new series of nitroimidazole-sulfonamide/sulfamides/sulfamates. *J. Med. Chem.* 2005; 56(21): 8512-8520.
- Prete S, Vullo D, Luca V, Carginale V, Osman S, AlOthman Z, Supuran C and Capasso C. Comparison of the sulfonamide inhibition profiles of the α -

- β - and γ -carbonic anhydrases from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016; 24(5): 1115–1120.
- Riafrecha L, Vullo D, Ouahrani-Bettache S, Köhler E, Dumy P, Winun J, Supuran C and Colinas P. Inhibition of β -carbonic anhydrases from *Brucella suis* with C-cinnamoyl glycosides incorporating the phenol moiety. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015; 30:6, 1017-1020.
- Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M, De Castro A. In vitro activity of Olive Oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55:(3) 680-686.
- Sachs G, Weeks DL, Melchers K, and Scott DR. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu. Rev. Physiol.* 2003; 65:349–369.
- Salama Nina, Hartung M, Muller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature Rev. Microbiology*. 2013; 11: 385-399.
- Sarikaya SB, Gulcin I, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of human isozymes I and II with a series of phenolic acids. *Chem. Biol. Drug. Des.* 2010; 75(5): 515-520.
- Scozzafava A, Passaponti M and Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors: guaiacol and catechol derivatives effectively inhibit certain human carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I, II, IX and XII). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015; 30(4): 586-591.
- Scott DR, Marcus EA, Wen Y, Oh J, Sachs G. Gene expression in vivo shows that *Helicobacter pylori* colonizes an acidic niche on the gastric surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104(17): 7235-7240.
- Scott DR, Marcus EA, Wen Y, Sing S, Feng J, Sachs G. Cytoplasmic histidine kinase (HPO244)-regulated assembly of urease with UreI, a channel for urea and its metabolites, CO₂, NH₃ and NH₄⁺, is necessary for acid survival of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 2010: 94-103.
- Senturk M, Gulcin I, Dastan A, Kufrevioglu OI, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. *Bioorg. Med. Chem.* 2009; 17: 3207-3211.
- Senturk M, Gulcin I, Beydemir S, Kufrevioglu OI, Supuran C. In vitro inhibition of human Carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chem. Biol. Drug Design.* 2011; 77(6): 494-499.
- Sethi KK, Verma SM, Tanc M, Purper G, Calafato G, Carta F, Supuran C. Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of the human carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII with benzene sulfonamide incorporating 4- and 3- nitrophthalimide moieties. *Bioorg. Med. Chem.* 2014; 22(5): 1586-1595.
- Shahidzadeh R, Opekun A, Shiatori A, Graham DY. Effect of the carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, on the *Helicobacter pylori* infection in vivo: a pilot study. *Helicobacter.* 2005; 10(2): 136-138.
- Smith KS, Jakubczik C, Whittam TS, Ferry JG. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(26): 1584-15189.
- Supuran C. Carbonic anhydrases- an Overview. *Curr. Pharm. Des.* 2008; 14(7): 603-614.
- Supuran C. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20(12): 3467-3474.
- Supuran C. Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics? *Front. Pharmacol.* 2011; 2: 34.
- Supuran C. Inhibition of bacterial carbonic anhydrases and zinc proteases: from orphan targets to innovative new antibiotic drugs. *Curr Med Chem.* 2012;19: 831-844.
- Supuran C, Capasso C. The η -CAs carbonic anhydrases as drug targets for antimalarial agents. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2015; 19: 551–63.
- Supuran C. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015: 1475-6366.
- Takahashi, A., Kurasawa, S., Ikeda, D., Okami, Y., and Takeuchi, T. Altemicidin, A New Acaricidal and Antitumour Substance. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physicochemical and biological properties. *J. Antibiot.* 1989; 42: 1556-1561.
- Tarko L, Supuran C. QSAR studies of sulfamate and sulfamide inhibitors targeting human carbonic anhydrase isozymes I, II, IX and XII. *Bioorg. Med. Chem.* 2013; 21(6): 1404-1409.
- Tars K, Vullo D, Kazaks A, Leitans J, Lends A, Grandane A, Zalubovskis R, Scozzafava A, Supuran C. Sulfocoumarins (1,2-benzoxathiine-2,2-dioxides): a new class of potent and isoform-selective inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrase. *J. Med. Chem.* 2013; 56(1): 293-300.
- Tuccinardi T, Bertini S, Granchi C, Ortore G, Macchia M, Minutolo F, Martinelli A, Supuran C. Salicylaldehyde derivatives as new leads for the development of carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2013; 21:1511-1515.
- Valean S, Vlaicu R, Ionescu I. Treatment of gastric ulcer with carbonic anhydrase inhibitors. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 1984; 429: 597-600.
- Vullo D, Del Prete S, De Luca V, Carginale V, Ferraroni M, Dedeoglu N, Osman S, AlOthman Z, Capasso C and Supuran C. Anion inhibition studies of the β -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Vibrio cholera*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016; 26(5): 1406–1410.
- Vullo D, Isik S, Bozdog M, Carta F and Supuran C. 7-Amino-3,4-dihydro-1H-quinolin-2-one, a compound similar to the substituted coumarins, inhibits α -carbonic anhydrases without hydrolysis of the lactam ring. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015; 30(5):773-777.
- Wang SC, Zamble DB. Fluorescence analysis of sulfonamide binding to carbonic anhydrase. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2006; 34(5): 364-368.
- Wang X-L, Zeng J, Feng J, Tian Y-T, Liu Y-J, Qiu M, Yan X, Yang Y, Xiong Y, Zhang Z-H, Wang Q, Wang J-Z and Liu R. *Helicobacter pylori* filtrate impairs spatial learning and memory in rats and increases β -amyloid by enhancing expression of presenilin-2. *Front. Aging Neurosci.* 2014; 6:66.
- Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Letters.* 2014; 345: 196-202.

Wen Y, Feng J, Scott DR, Marcus EA, Sachs G. The HP0166 two component system (ArsRS) regulates acid-induced expression of HP1186 alpha-carbonic anhydrase in *Helicobacter pylori* by activating the pH-dependent promoter. *J. Bacteriol.* 2007; 189(6): 2426-2434.

Wen Y, Feng J, Scott DR, Marcus EA, Sachs G. The pH-responsive regulon of HP0244 (FlgS), the cytoplasmic histidine kinase of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 2009; 19(2): 449-460.

Zhuang G, Keeler B, Grant J, Bianchi L, Fu E, Zhang Y, Erasso D, Cui J, Whiltshire T, Li Q, Hao S, Sarantopoulos K, Candiotti K, Wishneck S, Smith S, Maixner W, Diatchenko L, Martin E, Levitt R. Carbonic Anhydrase-8 Regulates Inflammatory Pain by Inhibiting the ITPR1-Cytosolic Free Calcium Pathway. *PLoS ONE*, 2015; 10(3): DOI:10.1371/journal.pone.0118273

RESUMEN

El patógeno *Helicobacter pylori* (Hp) es una bacteria que infecta a cerca de la mitad de la población mundial. En Chile la infección por Hp llega a general ~ 80 %, dependiendo de la zona geográfica y los factores socioeconómicos. Hoy en día, está bien establecido que la infección por Hp subyace a la etiología de diversas patologías gastrointestinales como úlcera duodenal, gastritis y cáncer gástrico. El consenso para el tratamiento de la infección por HP considera el uso de dos antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones durante 14 días. Este esquema se asocia a menudo con el reporte de efectos secundarios, lo que eventualmente podría conducir a abandonar la terapia de erradicación y, finalmente, elevar la prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos. Debido a que la aparición de cepas de Hp que exhiben fenotipos con alta resistencia a antibióticos, han aumentando de manera sostenida, los estudios orientados a la búsqueda de nuevas sustancias naturales con actividad anti - Hp. Con respecto a esto, desde el año 2011 nuestro grupo investiga el efecto de proantocianidinas naturales (PAC) sobre la infección por Hp (Fondecyt 11110442).

En este estudio demostramos que la inhibición de la ureasa y adherencia de HP a células AGS depende del tamaño de las PAC y la naturaleza del flavan-3-ol que las forma. Recientemente, la anhidrasa carbónica (CA) de Hp ha ganado importancia ya que actúa en cooperación con ureasa y ayuda a neutralizar el pH del medioambiente circundante. De acuerdo con la literatura, la inhibición de CA depende de las propiedades de unir " Zinc " de las moléculas. En este contexto, los polifenoles han sido los más investigados, aunque su actividad es mucho menos potente que los inhibidores clásicos como las sulfonamidas (por ejemplo, acetazolamida). De acuerdo con estos resultados, se observó que una serie de derivados de PACs preparados mediante ataque nucleofílico mostraron una pobre inhibición de ureasa, no obstante fueron capaces de inhibir consistentemente a la anhidrasa carbónica humana (HCA I). Con el fin de mejorar las propiedades de inhibición de la CA de Hp, diferentes estrategias sintéticas se podrían aplicar usando varios como plantilla diferentes scaffolds polifenólicos. En esta revisión daremos una visión general sobre la importancia de la AC como un potencial blanco anti-Hp y específicamente cómo los polifenoles podrían ser candidatos interesantes para el desarrollo de nuevos inhibidores de la CA de HP. Por lo tanto, los polifenoles naturales podrían utilizarse como modelo para el diseño de nuevos derivados semisintéticos y sintéticos con efectos anti-Hp, a través de la inhibición concomitante de las actividades de la anhidrasa carbónica y de la ureasa (Fondecyt 1150948). Tales efectos pueden reducir la capacidad de este agente patógeno para colonizar la mucosa gástrica. La introducción de grupos específicos capaces de unir zinc (ZBG) y el apoyo de herramientas *in silico* guiará la refinación de dichos compuestos con el fin de originar moléculas más potentes, selectivas, seguras y con alto valor para la erradicación de este patógeno.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, polifenoles, anhidrasa carbónica, grupo enlazante de zinc.

Rev. Farmacol. Chile (2016) 9 (1) 7-18

Recibido 14-03-2016; Revisado 15-04-2016; Aceptado 24-04-2016

ARTÍCULO DE REVISIÓN

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MODELOS DE MEMBRANAS CELULARES DE *Solanum lycopersicum* L. (Antioxidant capacity of *Solanum lycopersicum* L. on cell membrane models)

Marcia Avello L.^{*1}, Mario Suwalsky W.², Claudia Moraga C.¹, Edgar Pastene N.¹

¹Laboratorio de Farmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, P.O. Box 237, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

²Laboratorio de Polímeros, Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

RESUMEN

Solanum lycopersicum L. syn. *Lycopersicon esculentum* Mill, (tomate) es un fruto globoso y jugoso nativo de la región andina de América del Sur. Esta hortaliza es la más popular y aceptada en la cultura gastronómica del mundo, por lo que su demanda aumenta continuamente, incentivado su cultivo, producción y comercio. Se ha observado que el consumo de tomate puede prevenir el desarrollo de enfermedades no transmisibles tales como eventos cardiovasculares y cáncer, efectos atribuibles a su rica composición química, en la que destacan el licopeno y betacaroteno (carotenoides), compuestos fenólicos y vitamina C, todos con reconocida capacidad antioxidante. Dichas moléculas, aunque en dosis mayores, además se incorporan en preparados nutraceuticos. Dado su alto uso, se llevó a cabo un estudio con el objeto de evaluar el efecto protector que ejercen estas sustancias fitoquímicas presentes en la pulpa y piel de *S. lycopersicum* L. Para ello se determinó el efecto protector sobre modelos moleculares de membranas biológicas y eritrocitos humanos sometidos al estrés oxidativo inducido por HClO. En glóbulos rojos humanos se estudio el efecto protector de la pulpa y piel de *S. lycopersicum* midiendo el porcentaje de hemólisis inducido por HClO. Por difracción de rayos X se determinaron los efectos estructurales en modelos moleculares de membranas celulares constituidos por bicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), clases de fosfolípidos que se ubican respectivamente en las monocapas externas e internas de membranas celulares y la protección de la pulpa y piel de *S. lycopersicum* frente al mismo oxidante. Los resultados mostraron protección antioxidante del fitocomplejo contenido en ambas muestras donde destaca la presencia de polifenoles, vitamina C y carotenos, respectivamente, observándose una disminución del porcentaje de hemólisis, como también un efecto protector en las multicapas lipídicas de los fosfolípidos DMPC y DMPE. En el caso de la piel de tomate fue más evidente a nivel de DMPE. La protección más importante se observó con la pulpa en ambos métodos. Por otra parte, tanto la pulpa como la piel de *S. lycopersicum* a altas concentraciones generaron una mayor perturbación de la membrana, aumentando con ello su permeabilidad, lo que dio lugar a la hemólisis celular, la que fue sinérgica cuando se hizo en presencia de HClO. Por lo tanto, los resultados sugieren que la mayor protección de membranas tendría lugar sólo a bajas concentraciones.

Palabras Claves: *Solanum lycopersicum*, eritrocitos humanos, modelos de membranas celulares.

Rev. Farmacol. Chile (2016) 9 (1) 19-28

Recibido 14-03-2016; Revisado 15-04-2016; Aceptado 24-04-2016

1) INTRODUCCIÓN

El mantener un óptimo nivel de salud es una de las mayores preocupaciones en los países de todo el mundo, éste está condicionado fundamentalmente por factores genéticos y ambientales, en donde la variable externa más

importante es la alimentación, por lo que llevar una dieta variada y completa puede prevenir o al menos reducir el riesgo de padecer ciertas alteraciones o enfermedades a corto o a largo plazo que aquejan hoy a la sociedad.

Correspondencia a: Dra. Marcia Avello, Laboratorio de Farmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, P.O. Box 237, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. Teléfono: 56-041-2204208, Correo electrónico: maavello@udec.cl

Solanum lycopersicum Linnaeus (*Solanaceae*), tomate, es una de las hortalizas de mayor consumo e importancia en la dieta de la población mundial (1), por lo que ha sido objeto de interés para muchos científicos que mediante estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto el efecto beneficioso del consumo de *S. lycopersicum* en la prevención de enfermedades crónicas tales como el cáncer y enfermedades cardiovasculares, efecto atribuido principalmente a la actividad antioxidante de moléculas presentes en él. Está compuesto principalmente por carotenoides, pigmentos orgánicos vegetales, además de otros que si bien, su proporción es menor en comparación a los carotenoides, son importantes. Entre los compuestos mencionados se encuentran el ácido ascórbico, compuestos polifenólicos, tocoferoles (vitamina E), flavonoides, fitoeno y fitoflueno (2).

Los antioxidantes son sustancias que al estar presentes a concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable (moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN) previenen, retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales fácilmente oxidables. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar o interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno (EROS) que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas como lípidos, proteínas y ADN. En función de su procedencia se pueden clasificar como endógenos y exógenos. Al referirnos a antioxidantes exógenos, hablamos de los que son ingeridos con la dieta que actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen (2-4).

El deterioro de la membrana celular por agentes oxidantes ha motivado la investigación de los factores que rigen la peroxidación de lípidos, así como también la actividad antioxidante de metabolitos protectores de membranas. El objeto del siguiente estudio fue determinar el efecto protector que producen los compuestos presentes en la pulpa y piel de *S. lycopersicum* sobre modelos de membranas biológicas y eritrocitos humanos debido al estrés oxidativo inducido por ácido hipocloroso (HClO).

2) MATERIALES Y METODOS:

2.1) Material vegetal y obtención de muestras: La adquisición del fruto de *S. lycopersicum* se realizó en un supermercado de alto flujo de público, ubicado en la

provincia de Concepción, Región del Biobío, comuna de San Pedro de la Paz. La variedad de tomate corresponde al tomate suelto larga vida, es una variedad de forma externa regular, tamaño medio o grande, color rojo intenso y se caracteriza especialmente por su larga conservación sin necesidad de refrigerador. Su pulpa es de textura suave y succulenta. A partir del fruto de *S. lycopersicum* se obtuvieron dos muestras; el sobrenadante de la pulpa de tomate y la piel de tomate deshidratada.

2.1.1.- Pulpa

Para su obtención se trataron 3 tomates. Se extrajo la cáscara y la pulpa fue licuada, de esta forma se obtuvo el zumo. Éste fue llevado a centrifugación a 2000 rpm por 2 minutos y el sobrenadante fue retirado y filtrado (22 µm).

2.1.2.- Piel

Para su obtención se procedió a extraerla de un pool de 9 tomates. Luego se secó a 30°C por 12 horas y se pulverizó. Ambas muestras se almacenaron protegidas de la luz, humedad y oxígeno.

2.2) Estandarización y caracterización química de la pulpa y piel de *S. lycopersicum*:

2.2.1.- Determinación de fenoles totales

Se determinó el contenido total de polifenoles mediante el método Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965) (5). Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (EAG).

2.2.2.- Determinación de carotenos totales

Se procedió a la determinación de carotenos totales según lo descrito por Jaeger de Carvalho, et al (6). Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como equivalentes de β-caroteno.

2.2.3.- Caracterización de carotenoides y vitamina C

La identificación y cuantificación de carotenoides y vitamina C se efectuó por HPLC, según lo descrito por Ramos et al, (7).

2.3) Capacidad antioxidante en modelos de membranas celulares:

2.3.1.- Glóbulos rojos (RBC)

El fundamento de esta técnica para determinar capacidad protectora de un potencial antioxidante, se basa en la medida indirecta del porcentaje de hemólisis de glóbulos rojos, a través de la liberación de hemoglobina (Hb), utilizando como oxidante HClO. La muestra de sangre se obtuvo de un donante sano sin tratamiento farmacológico y no consumidor de cigarrillos. Se utilizó EDTA como

anticoagulante (BD Hemogard™), la muestra fue centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos (Centrífuga Selecta, Mod. Mixtasel, España). Luego se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS pH 7.4 tres veces. Se preparó una suspensión de RBC (10% v/v). De la suspensión de RBC, 150 µL se distribuyeron en tubos Eppendorf con diferentes concentraciones de pulpa y piel de *S. lycopersicum*. Se incubaron en un baño de agua termostatzado (Thermo Haake C10, Germany) por 15 minutos a 37°C y luego se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos y la absorbancia del sobrenadante se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu (UV-mini 1240). Al exponerlos a la acción de HClO, primero se incubaron las muestras de RBC con las respectivas alícuotas de pulpa y piel y pasados 2 minutos se procedió a adicionar HClO (0.50 y 1.25 mM). Luego se centrifugaron y la hemoglobina del sobrenadante se determinó a 540 nm (8-10).

3.2.- Difracción de rayos X

El fundamento de esta técnica para determinar capacidad protectora de un potencial antioxidante, se basa en la interacción del agente oxidante HClO con las multicapas de los fosfolípidos sintéticos DMPC y DMPE. Para esto se pesaron 2 gramos de cada fosfolípido (Microbalanza Cahn C-33, Orion, USA) en tubos Eppendorff, en los cuales se preparó un blanco tanto con DMPC como para DMPE al que se le agregó 180 µL de agua bidestilada y también se prepararon muestras con pulpa y piel de *S. lycopersicum*. Una vez preparadas fueron incubadas a 30°C para el caso de DMPC y a 60°C para DMPE, que corresponden a sus respectivas temperaturas de transición, durante 30 minutos en un baño de agua termostatzado (Thermo Haake C10, Germany). Terminada la incubación las suspensiones fueron introducidas en capilares de vidrio de 2 mm de diámetro (Glas-Technik & Konstruktion, Berlin, Germany) y centrifugadas a 2500 rpm por 20 minutos (Centrífuga Selecta, Mod. Mixtasel, España). Las muestras fueron difractadas en el generador de rayos X (Siemens, modelo Kristalloflex 760, Karlsruhe, Germany) durante 25 minutos utilizando radiación CuKα ($\lambda = 1.52 \text{ \AA}$) con filtro de Ni a una temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Las intensidades relativas de las reflexiones fueron obtenidas mediante un detector lineal sensible de posición (MBraun PSD 50 M, Germany) y procesadas por el software ASA. Para el tratamiento y el análisis de los datos se trabajó con el programa Origin 7.0 (OriginLab Corporation, USA). Al exponerlos a la acción de HClO (0.50 y 1.25 mM), se esperó por 2 minutos luego de la incubación hasta que alcanzaran temperatura ambiente (11).

3) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1) Estandarización y caracterización química de la pulpa y piel de *S. lycopersicum*:

3.1.1.- Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales presente en la pulpa de *S. lycopersicum* fue 3.25 mM EAG (1.57 g EAG/100 g muestra).

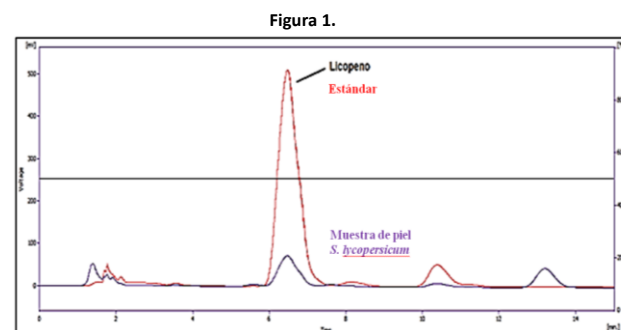
La muestra fue estandarizada en fenoles totales (expresados en EAG) porque según bibliografía son uno de los principales compuestos presentes en *S. lycopersicum* (12), además se les usa comúnmente con este propósito por ser estables, buenos marcadores químicos, fácilmente cuantificables y solubles en medio acuoso (13).

3.2.2.- Determinación de carotenos totales

La piel de *S. lycopersicum*, en cambio, fue estandarizada en equivalentes de β -caroteno por su contenido en este tipo de compuestos, hasta cinco veces más que en la pulpa, especialmente licopeno (14). Además esta muestra se presentaba como polvo seco y dado sus características y tamaño de partícula es insoluble en medios como agua. El contenido de carotenos totales presentes en la piel de *S. lycopersicum* fue 58.7 µg/mL E β C (11.7 mg E β C/100 g muestra).

3.2.3.- Caracterización de ácido ascórbico y carotenoides

El contenido de ácido ascórbico presente en la pulpa de *S. lycopersicum* fue 0.78 mM AA (0.39 g AA/100 g muestra). Se describe para *S. lycopersicum* importante presencia en ácido ascórbico (15). Si bien, es probablemente la vitamina hidrosoluble más inestable es también un potente antioxidante y agente reductor. En *S. lycopersicum* hay presentes carotenoides, los que por su carácter insoluble en medios polares, se encuentran mayormente en la piel de éste (14). En la Figura 1 se puede observar el cromatograma correspondiente a la muestra de piel de *S. lycopersicum*, en el cual se pueden observar picos que dan cuenta de la presencia de estos compuestos y la gran proporción de licopeno en la muestra cuyo pico representa un 81.9% de los carotenoides totales.



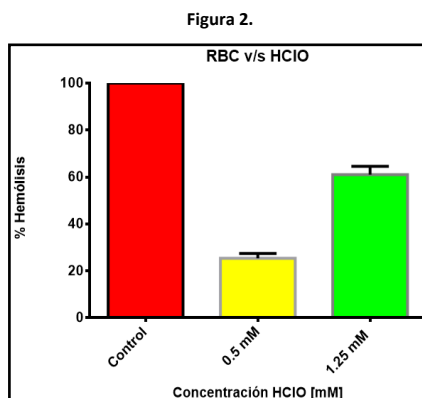
Cromatograma correspondiente a la muestra de piel de *S. lycopersicum* en la identificación de carotenoides.

3.2) Capacidad antioxidante en modelos de membranas celulares:

3.2.1.- Glóbulos rojos (RBC)

Mediante este ensayo se evaluó la actividad antioxidante de la pulpa y piel de *S. lycopersicum* en eritrocitos humanos expuestos a estrés oxidativo inducido por HClO, oxidante biológico extremadamente tóxico generado por neutrófilos y monocitos en condiciones inflamatorias (16). En condiciones patológicas, HOCl/OCl se encuentra en concentraciones de hasta 200 mM. El HClO es directamente tóxico para bacterias, células endoteliales, células tumorales y la producción excesiva de éste causa daño tisular. Los eritrocitos humanos son comúnmente empleados como modelos de membrana celular para detectar estrés oxidativo, con un resultado final bien conocido; la hemólisis celular. La exposición a HClO provoca un cambio inmediato en la estructura de la membrana de RBC que afecta la forma de éste y su permeabilidad. Estos cambios son seguidos por la inflamación gradual de las células, salida de K^+ y finalmente la lisis. Sin embargo, el mecanismo exacto de daño a RBC y hemólisis es poco conocido (17).

La técnica de espectroscopia visible, se fundamenta en el espectro de absorción de la oxihemoglobina (hemoglobina en agua), cuyas bandas de absorción están a 540 nm y 575 nm. La capacidad antioxidante es evaluada de manera indirecta mediante el porcentaje de hemoglobina liberada al exponer los glóbulos rojos a distintas concentraciones de HClO para determinar el efecto protector tanto de la pulpa como de la piel de *S. lycopersicum* (18). Considerando que el mayor porcentaje de hemólisis se logra al exponer los glóbulos rojos en agua destilada, en la Figura 2, se hace una comparación con los porcentajes de hemólisis inducidos por HClO a concentraciones de 0.5 mM y 1.25 mM, concentraciones que fueron empleadas para determinar el efecto protector de *S. lycopersicum*.

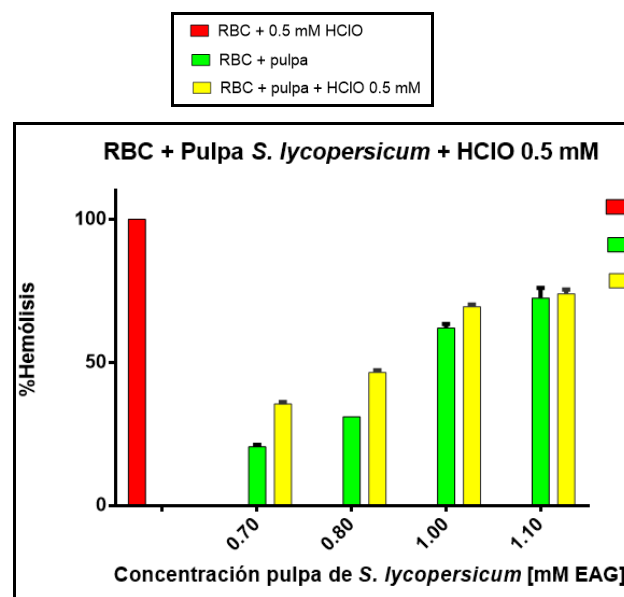


Porcentaje de hemólisis provocada por HClO sobre RBC cuantificado en base a la hemoglobina liberada.

En las Figuras 3 y 4 se muestra el efecto de la pulpa de *S. lycopersicum* en glóbulos rojos. Se observa que a concentraciones iguales o superiores a 0.7 mM EAG se genera daño a nivel celular lo que se evidencia a través del porcentaje de hemólisis que se genera. Por otra parte, cuando se adiciona 0.5 mM de HClO (Figura 3), se produce un efecto sinérgico entre la pulpa y HClO. Sin embargo, es posible observar un efecto protector, ya que las muestras incubadas con pulpa sólo alcanzan un 75% de hemólisis en comparación al 100% del control. De igual manera, al adicionar 1.25 mM HClO (Figura 4), el porcentaje de hemólisis aumenta conforme lo va haciendo la concentración de la pulpa, pero en este caso el efecto protector es aún mayor, ya que el porcentaje de hemólisis provocado alcanza sólo un 52% en comparación al control.

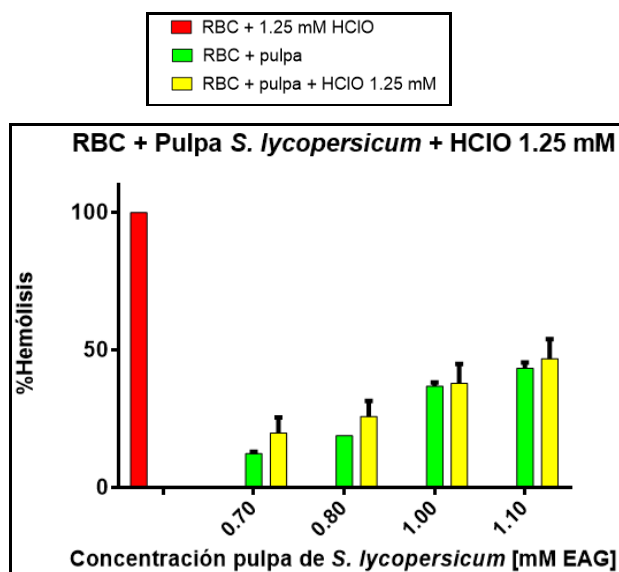
El efecto protector presentado por la pulpa sería mayor cuando la concentración de ésta es menor, así el porcentaje de hemólisis a una concentración de pulpa de 0.7 mM EAG con 0.5 mM HClO no superaría el 36% y con 1.25 mM HClO no sería mayor al 24%. De esta protección sería responsable el fitocomplejo presente en la pulpa que corresponde a un conjunto de compuestos antioxidantes entre los que destacan polifenoles y vitamina C que interactúan con la membrana impidiendo así la entrada del HClO a la célula.

Figura 3.



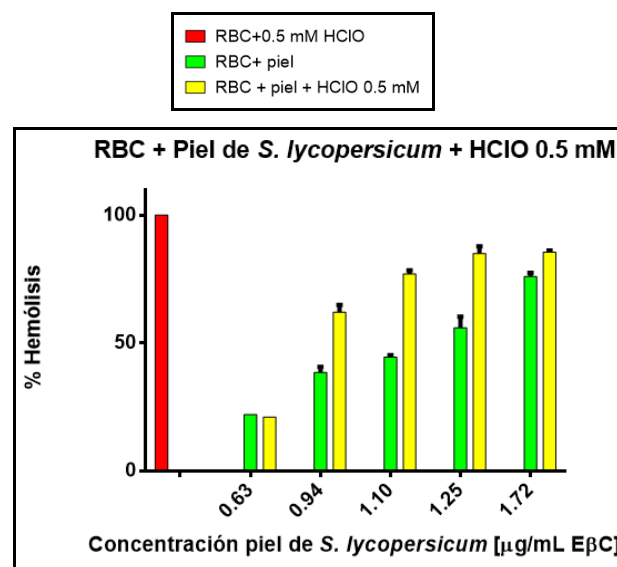
Porcentaje de hemólisis en RBC incubados con 0.5 mM HClO y concentraciones crecientes de pulpa de *S. lycopersicum*.

Figura 4.



Porcentaje de hemólisis en RBC incubados con 1.25 mM HClO y concentraciones crecientes de pulpa de *S. lycopersicum*.

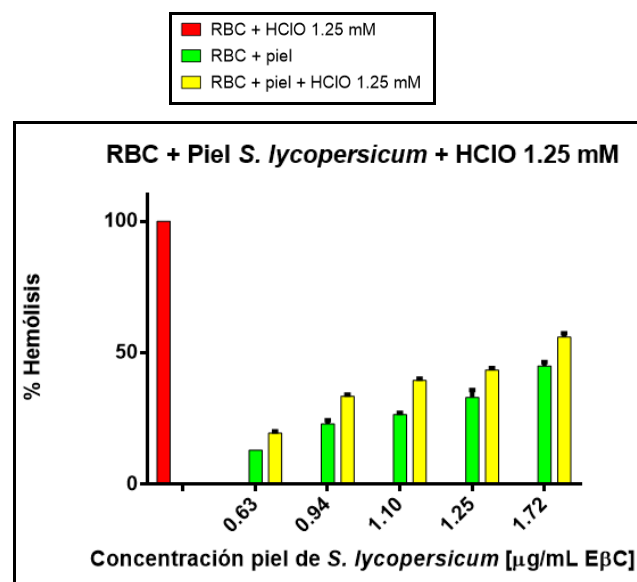
Figura 5.



Porcentaje de hemólisis en RBC incubados con 0.5 mM HClO y concentraciones crecientes de piel de *S. lycopersicum*.

En las Figuras 5 y 6 está representada la capacidad antioxidante de la piel de *S. lycopersicum* frente al daño inducido por HClO. Así se puede observar que al igual que en el caso de la pulpa, a medida que se va aumentando la concentración de la muestra la lisis celular es mayor. Y que al adicionar 0.5 mM HClO (Figura 5), este efecto es sinérgico alcanzando un 86% de hemólisis a una concentración de piel de 1.72 µg/mL EβC, lo que indica un cierto efecto protector en comparación al control. Al aumentar la concentración de HClO a 1.25 mM (Figura 6) se observa también un efecto sinérgico entre la piel y el ácido, pero la protección es mayor alcanzando sólo un 57% de hemólisis en comparación al control. Cabe destacar que en ambos casos a concentraciones menores de piel el efecto protector es mayor, así por ejemplo, a 0.63 µg/mL EβC en presencia de HClO 0.5 mM y 1.25 mM el porcentaje de hemólisis alcanzado es tan solo de un 23% y 20% respectivamente. Por otra parte, al comparar ambos gráficos se puede observar que el efecto protector que ejerce la piel de *S. lycopersicum* sobre los glóbulos rojos es más evidente cuando la concentración de HClO es mayor, es decir, a 1.25 mM.

Figura 6.



Porcentaje de hemólisis en RBC incubados con 1.25 mM HClO y concentraciones crecientes de piel de *S. lycopersicum*.

El efecto protector de las muestras de pulpa y piel de *S. lycopersicum*, se debe a los compuestos que en concentraciones bajas estarían actuando como antioxidantes, capaces de neutralizar en cierta proporción al agente oxidante, ya que al interaccionar con la

membrana celular impiden la difusión del HClO al interior de la célula evitando así que se desencadenen reacciones de oxidación. A concentraciones mayores estas mismas sustancias pudieran estar provocando el efecto contrario, lo que resulta en una actividad prooxidante, acción que se ha observado *in vitro* en compuestos fenólicos, vitamina C y carotenoides, principales metabolitos del fitocomplejo presente en ambas muestras. La toxicidad puede ocurrir cuando las concentraciones del antioxidante son muy altas lo que lleva a la lisis de los glóbulos rojos (19, 20).

En este estudio el fitocomplejo está en contacto directo con las células, a diferencia de lo que ocurre *in vivo* donde se forman diversos metabolitos por el resultado digestivo o actividad hepática, los que muchas veces difieren de sus formas nativas y pueden o no ser activos, afectando con esto su biodisponibilidad (21). Así la biodisponibilidad de los polifenoles es muy variable, ya que la mayoría de ellos son metabolizados por microorganismos del colon antes de ser absorbidos. Incluso hay estudios que muestran que la concentración de éstos en el plasma de una persona con una dieta rica en polifenoles (más de 1 g diario), no es superior a 1.0 µM. Por otra parte, la absorción de carotenoides se produce principalmente en el intestino delgado y varias investigaciones han mostrado que sólo una pequeña proporción de la cantidad ingerida se absorbe en cada dosis individual. Así, sólo 1.4 mg de 40 mg suplementario de β-caroteno (3.5%) se absorben, 1 mg de 38 mg de licopeno suplementario (2.6%) se absorben, y 0.8 mg de luteína de 31.2 mg suplementario (2,6%) se absorben (20).

3.2.2.- Difracción de rayos X

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para determinar el arreglo de átomos de compuestos sólidos y para medir las longitudes y ángulos de enlace. Además casi todos los avances recientes en biología molecular han surgido a partir de su aplicación en la determinación de las estructuras moleculares. Su requisito fundamental es que las sustancias a analizar deben estar puras y a la forma de cristales, es decir, regularmente ordenadas en las tres dimensiones del espacio. La membrana celular no cumple esta condición por estar constituida por tres clases de moléculas distintas (proteínas, lípidos y agua), por lo que en este estudio se emplearon multicapas lipídicas de dos fosfolípidos ampliamente estudiados por esta técnica DMPC y DMPE representativos de la monocapa externa e interna respectivamente, que forman sistemas semi-cristalinos con un adecuado grado de orden molecular e indicativos de un aceptable grado de cristalinidad.

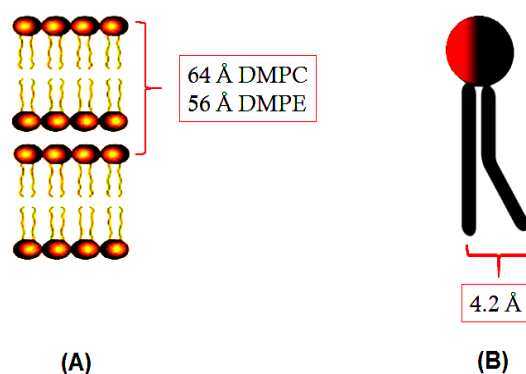
El haz de rayos X a una determinada longitud de onda se hace incidir sobre la muestra en estudio que se encuentra en el interior de capilares especiales que no difractan rayos X, generando un patrón de intensidades que es interpretado por la Ley de Bragg, que concibe la difracción en términos de planos de reflexión (26, 27).

$$n\lambda = 2d \sin \vartheta$$

Donde $n\lambda$: número de longitudes de onda, d : distancia interplanar y ϑ : ángulo de reflexión.

Las intensidades de reflexión resultantes son representativas de lo que sucedería en las membranas biológicas. El comportamiento de estos fosfolípidos en medio acuoso se ve afectado por el grado de hidratación, así mientras éste sea menor, el agregado será más ordenado asemejándose a una estructura cristalina, si el grado de hidratación aumenta, el agregado se vuelve desordenado y se asemeja más a un fluido. Las perturbaciones de los fosfolípidos se evalúan mediante variaciones de la intensidad relativa y distancias interplanares, observándose reflexiones de ángulo pequeño (64 Å y 56.4 Å) correspondientes a las distancias de repetición de las bicapas de DMPC y DMPE respectivamente, y la de ángulo mayor (4.2 Å) que corresponde a la distancia de separación de las cadenas hidrocarbonadas de una misma molécula de fosfolípido (Figura 7). El aumento de las intensidades relativas, tanto de ángulo pequeño como de ángulo mayor es interpretado como un mayor orden molecular o rigidez de las multicapas, por el contrario, una disminución en las intensidades indica un mayor desorden de éstas (11).

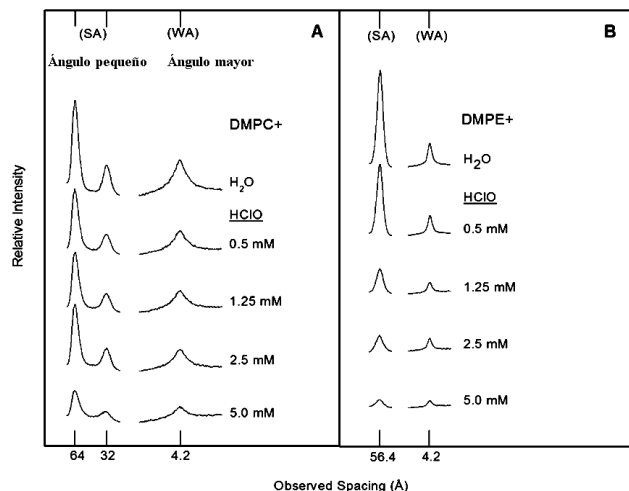
Figura 7:



Distancias de repetición de bicapas (A) y de separación de las cadenas hidrocarbonadas (B) de fosfolípidos DMPC y DMPE.

Se realizó el estudio entre las multicapas lipídicas de DMPC y DMPE en presencia de concentraciones crecientes del oxidante (HClO) como se muestra en la Figura 8, donde tanto en el diagrama de DMPC como DMPE se observa una perturbación de las multicapas, reflejada en una disminución de las intensidades de reflexión tanto de ángulo mayor, como las de ángulo menor a medida que va aumentando la concentración del ácido hipocloroso.

Figura 8:



Microdensitograma de difracción de rayos X de DMPC y DMPE con agua y soluciones de HClO; (SA) reflexión de ángulo pequeño; (WA) reflexión de ángulo mayor.

Para evaluar si la pulpa de *S. lycopersicum* ejerce un efecto protector sobre las membranas, se utilizaron modelos de fosfolípidos sintéticos los que forman multicapas lipídicas que representan la membrana externa (DMPC) y membrana interna (DMPE). La concentración de oxidante fue de 5 mM, por ser la concentración que provocaba un mayor grado de desorden de ambos fosfolípidos.

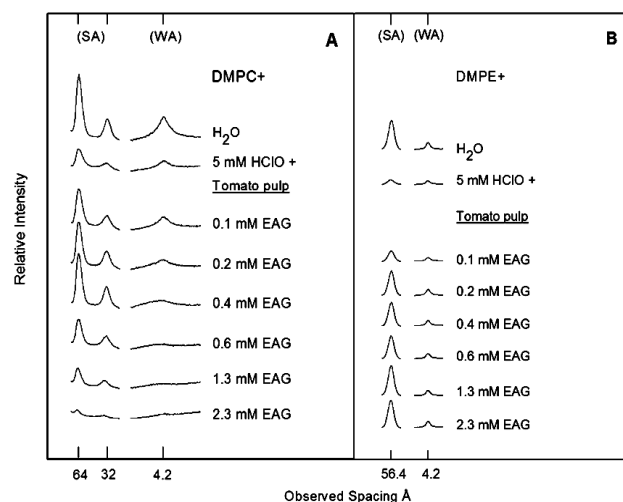
En el caso de DMPC (Figura 9A) la concentración más baja estudiada que corresponde a 0.1 mM EAG ejerce un efecto protector en el que los fosfolípidos de la multicapa son capaces de recuperar la organización inicial. En el caso de la porción polar de la multicapa, la que está representada por las reflexiones de ángulo menor (SA) sigue aumentando conforme va aumentando la concentración, hasta una concentración de 0.4 mM EAG donde el sistema parece saturarse. Por otra parte, las reflexiones de ángulo mayor aumentan sólo hasta una concentración 0.1 mM EAG de pulpa, pero a concentraciones mayores éstas disminuyen considerablemente, lo que no se puede interpretar como una falta de protección por parte de los compuestos presentes en la pulpa, sino más bien a una mayor interacción del fitocomplejo con la porción de las cadenas acilo de los fosfolípidos que serían los causantes de un mayor desorden a este nivel y no necesariamente atribuible a la acción del ácido hipocloroso.

Si se observa lo que ocurre con las multicapas de DMPE (Figura 9B), el efecto protector a una concentración de 0.1 mM EAG es casi imperceptible, pues tanto la reflexión de

ángulo menor como la de ángulo mayor están muy disminuidas, pero a partir de 0.2 mM EAG las reflexiones van aumentando levemente conforme aumenta la concentración de la pulpa.

La pulpa es de naturaleza acuosa, por lo tanto predominan compuestos principalmente polares, por lo que la protección de la multicapa se atribuye a compuestos fenólicos y vitamina C, capaces de interactuar mediante sus grupos hidroxilos formando enlaces de hidrógeno con los fosfolípidos impidiendo la acción del HClO. Sin embargo esta protección sería más efectiva a concentraciones bajas, pues la muestra por si sola puede perturbar la monocapa externa a concentraciones mayores.

Figura 9:

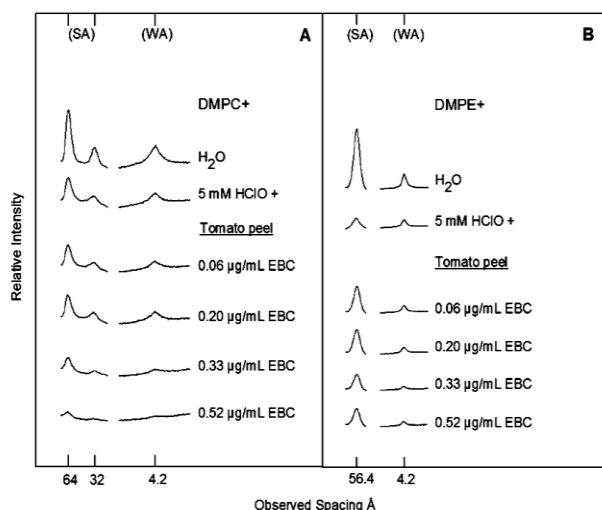


Microdensitograma de difracción de rayos X de DMPC (A) y DMPE (B) con agua, soluciones de HClO 5 mM y concentraciones crecientes de pulpa de *S. lycopersicum*; (SA) reflexión de ángulo pequeño; (WA) reflexión de ángulo mayor.

Los resultados del efecto de la piel de *S. lycopersicum* sobre este modelo se muestran en la Figura 10. En el diagrama A, no se observa un efecto protector a nivel de lo que se puede interpretar como la monocapa externa de la bicapa celular, ya que la intensidad de las reflexiones de SA y WA a concentraciones bajas de piel son de igual tamaño que las del control, las que disminuyen a concentraciones mayores hasta alcanzar lo que se interpreta como un desorden total de la multicapa. Por otra parte, en el diagrama B, la piel muestra un efecto protector frente a la acción de HClO, el que es levemente mayor a concentraciones más bajas. Considerando que en la composición de la piel encontramos mayormente carotenoides, su acción protectora a nivel de DMPE, lo que se puede interpretar como la monocapa interna de la

membrana del glóbulo rojo, pudiera atribuirse a la acción de éstos ayudando a mantener el orden de la multicapa.

Figura 10:



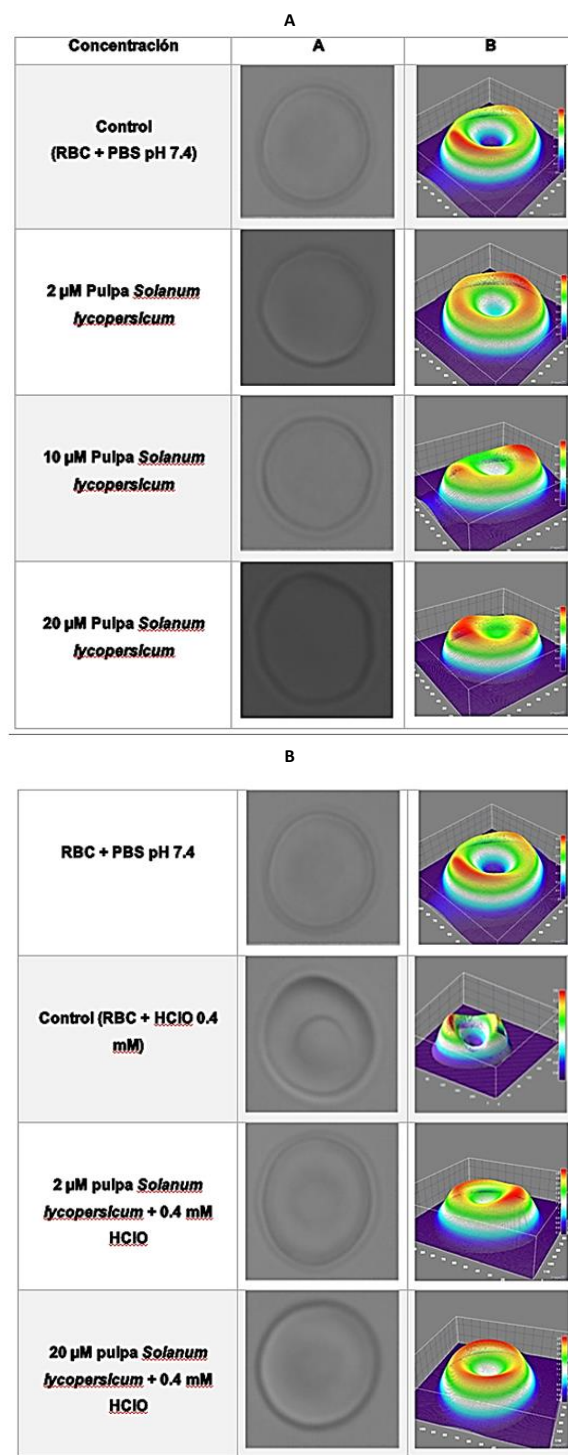
Microdensitograma de difracción de rayos X de DMPC (A) y DMPE (B) con agua, soluciones de HClO 5 mM y concentraciones crecientes de piel de *S. lycopersicum*; (SA) reflexión de ángulo pequeño; (WA) reflexión de ángulo mayor.

A este nivel, los compuestos polares presentes en la pulpa, estarían protegiendo en mayor proporción, a la monocapa externa celular. Algo similar se observa en el modelo RBC, donde la pulpa ejerce mayor protección frente a la injuria de HOCl. Los mecanismos antioxidantes para los compuestos fenólicos y vitamina C están en su mayor parte descritos (21).

El siguiente es un gráfico (Figura 11) que corrobora la interacción de los compuestos presentes en la pulpa de *S. lycopersicum* con la monocapa externa celular de glóbulos rojos humanos (Figura 11A, 10 y 20 µM de pulpa), a través de Microscopía óptica de Desenfoque observada en los experimentos realizados con RBC (22).

El cambio de forma de los glóbulos rojos a estomatocitos en presencia de HClO indica la interacción del oxidante con la membrana celular. En el caso del control el efecto es evidentemente deletéreo. Al adicionar concentraciones crecientes de pulpa (2-20 µM) esta forma cambia y la invaginación característica del estomatocito disminuye, lo que sugiere una disminución de la acción del ácido en la membrana, dando lugar a formas nuevas de las células semejantes a las normales.

Figura 11:



Interacción de la pulpa de *S. lycopersicum* con glóbulos rojos a través de Microscopía óptica de Desenfoque (A). En la Figura 11B se observa a 2 y 20 µM de pulpa evidente protección del fitocomplejo frente la injuria inducida por HClO 0.4 mM.

El cambio de forma de los glóbulos rojos a estomatocitos en presencia de HClO indica la interacción del oxidante con la membrana celular. En el caso del control el efecto es evidentemente deletéreo. Al adicionar concentraciones crecientes de pulpa (2-20 µM) esta forma cambia y la invaginación característica del estomatocito disminuye, lo que sugiere una disminución de la acción del ácido en la membrana, dando lugar a formas nuevas de la célula semejante a las normales.

4) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Estudios de la capacidad antioxidante de la pulpa y piel de *S. lycopersicum* muestran protección del fitocomplejo contenido en ambas muestras donde destaca la presencia de polifenoles, vitamina C y carotenos, respectivamente, que resulta en una disminución del porcentaje de hemólisis, así también se observa un efecto protector en las multicapas lipídicas de los fosfolípidos DMPC y DMPE. En el caso de la piel es más evidente a nivel de DMPE. La protección más importante se observa con la pulpa, en ambos métodos, y a nivel de monocapa externa celular. Por otra parte, tanto la pulpa como la piel de *S. lycopersicum* a altas concentraciones generan una mayor perturbación de la membrana aumentando con ello su permeabilidad lo que da lugar a la hemólisis celular, que en combinación con HClO tienen un efecto sinérgico, por lo que la mayor protección tendría lugar sólo a bajas concentraciones.

AGRADECIMIENTOS

M. Avello agradece a la Dra. María José Gallardo del Centro de Óptica y Fotónica de la Universidad de Concepción (CEFOP-UdeC), al Sr. Fernando Neira del Laboratorio de Rayos X de la Facultad de Ciencias Químicas y al Sr. Ivor Novoa del Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Bergougnoux V. The history of tomato: From domestication to biopharming Biotechnology Advances. 2013; 32: 170-189.
- (2) Palomo I, Moore-Carrasco R, Carrasco G, Villalobos P., Guzmán L. El consumo de tomates previene el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción, IDESIA (Chile). 2010; 28: 121-129.
- (3) Pinela J, Barros L, Carvalho A. M, Ferreira I. Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. Food and Chemical Toxicology. 2012; 50: 829-834.
- (4) Palomo I, Fuentes E, Carrasco G, González D, Moore-Carrasco R. Actividad antioxidante, hipolipemiente y antiplaquetaria del tomate

- (*Solanum lycopersicum* L.) y el efecto de su procesamiento y almacenaje. Revista Chilena Nutrición. 2010; 37: 524-533.
- (5) Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 1965; 16(3): 144-158.
- (6) Jaeger de Carvalho L.M, Barros Gómez M, De Oliveira Godoy R, Pacheco S, Fernández do Monte H, Viana de Carvalho J.L, Regina Nutti M, Lima Nevera A. C, Rodrigues Alves A, Ármalo Ramos R. Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study, Food Research International. 2012; 47: 337-340.
- (7) Ramos Z, García L, Pinedo M. Evaluación de factores de procesamiento y conservación de pulpa de *Myrciaria dubia* HBK (Camu-Camu) que reducen el contenido de vitamina C (ácido ascórbico). Revista Amazónica de Investigación Alimentaria. 2002; 2(2): 89-99.
- (8) Vives, M.A, Infante, M.R, García, E, Selve, C, Maugras, M, Vinardell M.P. Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants. Chemico-Biological Interactions. 1999; 118: 1-18.
- (9) Morris, J.C. The acid ionisation of HOCl from 5 degree to 35 degree. J. Phys. Chem. 1966; 70: 3798-3805.
- (10) Vissers, M.C.M, Winterbourn, C.C. Oxidation of intracellular glutathione after exposure of human red blood cells to hypochlorous acid. Biochemical Journal. 1995; 307: 57-62.
- (11) Manrique-Moreno M., Londoño-Londoño J. Structural effects of the *Solanum* steroids solasodine, diosgenin and solanine on human erythrocytes and molecular models of eukaryotic membranes. Biochimica et Biophysica Acta. 2014; 1838(18): 266-277.
- (12) Sommano S, Caffin N, McDonald J. The impact of thermal processing on bioactive compounds in Australian native food products (bush tomato and Kakadu plum). Food Research International. 2013; 50(2): 557-561.
- (13) Rizk E, El-Kady A, El-Bialy A. Characterization of carotenoids (lyco-red) extracted from tomato peels and its uses as natural colorants and antioxidants of ice cream. Annals of Agricultural Sciences. 2014; 59(1): 53-61.
- (14) Lanfranconi M. Historia de la microscopía. Universidad Nacional de Mar de la Plata. Argentina. 49-57.
- (15) González S. Evaluación de la relación estructura-actividad antioxidante de antocianinas mediante métodos computacionales. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán, Oaxaca. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos. 2007.
- (16) Barberán T. Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alimentación, nutrición y salud. 2003.
- (17) Benzie I, Choi S. Chapter one- antioxidants in food: content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs. Advances in Food and Nutrition Research. 2014; 71: 1-53.
- (18) Pinela J, Barros L, Carvalho A. Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer varieties in Northeastern Portugal homegardens. Food and Chemical Toxicology. 2012; 829-834.
- (19) Goltz Sh, Sapper T, Failla M, Carotenoid bioavailability from raw vegetables and a moderate amount of oil in human subjects is greatest when the majority of daily vegetables are consumed at one meal. Nutrition Research. 2013; 33(5): 358-366.
- (20) Antioxidantes: definición, clasificación y conceptos generales. Portal antioxidante. (online). Laboratorio de Antioxidantes del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA),

- Universidad de Chile. Disponible en: (22) Etcheverry S. Microscopía de desenfoque: Implementación y aplicaciones. Universidad de Concepción. Concepción, Tesis de Magister en Física, 2012.
- (21) Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea. 2006; 494: 161-172.

ABSTRACT

Solanum lycopersicum L. syn. *Lycopersicon esculentum* Mill, (tomato) is a native globose, juicy fruit of the Andean region of South America. This vegetable is one of the most popular and accepted in the culinary culture of the world. So, its demand continuously increases, encouraged its culture, production and trade. It has been observed that consumption of tomato can prevent the development of chronic non communicable diseases such as cardiovascular events and cancer. Such effects have been attributed to its rich chemical composition, which include lycopene and beta-carotene (carotenoids), phenolic compounds and vitamin C, all with recognized antioxidant capacity. Such molecules, although in higher doses, also are incorporated into nutraceutical preparations. Due to its wide use we conduct a study with the aim to evaluate the protective effect exerted by these phytochemicals present in the pulp and skin of *S. lycopersicum* L. To accomplish this objective the protective effect was assessed on molecular models of biological membranes and human red blood cells challenged with HClO as oxidant stressor. In human red blood cells the protective effect of the pulp and skin of *S. lycopersicum* was measured as percent of hemolysis induced HClO. By X-ray diffraction analysis, structural effects were determined using molecular models of cell membranes formed with bilayers of dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE), which are phospholipid classes located in the outer and inner monolayers of cell membranes respectively. In this model, protective effect of *S. lycopersicum* pulp and skin were compared using the same oxidant agent. The results showed antioxidant protection of the phyto-complex of both samples, where highlights the presence of polyphenols, vitamin C and carotenes, respectively. The results show a decrease in the percentage of hemolysis, as well as a protective effect on the lipid multilayers of DMPC and DMPE phospholipids. In the case of the tomato skin the protection was more evident on DMPE. The most important protection was observed with the pulp in both methods. Moreover, both the *S. lycopersicum* pulp and skin generated further disruption of the membrane at high concentrations, thereby increasing its permeability and resulting in cell hemolysis. This latter effect was synergistic with the addition of HClO. Therefore, the results suggest that higher protection of membrane would occur only at low concentrations of tomato antioxidants.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, human erythrocytes, cell membrane models.

Rev. Farmacol. Chile (2016) 9 (1) 19-28

Received 14-03-2016; Revised 15-04-2016; Accepted 24-04-2016

REVIEW ARTICLE

POLYPHENOLS IN NEURODEGENERATION AND NEUROENDOCRINE ALTERATIONS: A METABOLOMIC APPROACH

(Polifenoles en neurodegeneración y alteraciones neuroendocrinas: una aproximación metabolómica)

Leonel E. Rojo^{1*}, Carmen Villaguala², Marcia Avello³ and Edgar Pastene³

¹ Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile. ² Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chile.

³ Laboratorio de Farmacognosia – Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Chile.

ABSTRACT

Polyphenols are common secondary metabolites in the plant kingdom; this diverse family of chemical compounds has been extensively studied in pharmacology due to its high biomedical potential and abundance in vegetables and fruits. Among the pharmacological activities attributed to natural polyphenols are antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, anthelmintic, antidiabetic, antiaging and neuroprotective. Interestingly, recent clinical trials have confirmed, some of the overwhelming –and sometime misleading– in vitro pharmacological studies, especially those describing orally administered polyphenols with protective effect against metabolic and neurological diseases. In this article, we also centered our attention on a group of rationally selected polyphenols reported as preventive molecules against prevalent Alzheimer and Parkinson's disease. Thus, mechanistic and structure-activity relationships are discussed for anthocyanins, equol, catechins and resveratrol. We also focused on the limitations of natural polyphenols to be absorbed and reach meaningful plasma levels. This article also summarizes recent studies on the biochemical transformations occurred to polyphenols in the intestinal tract induced by the gut microbiota. We think that future studies on this latter area are the next frontier towards expanding the current knowledge on the mode of action of plant-derived compounds, and their metabolites, on human health.

Keywords: Polyphenols, Alzheimer, microbiome, metabolome.

Rev. Farmacol. Chile (2016) 9 (1) 29-39

Received 14-03-2016; Revised 15-04-2016; Accepted 24-04-2016

1) NEURODEGENERATIVE DISEASES

Alzheimer, Parkinson and Huntington disease, are among the most prevalent and costly neurological disorders (Kuljis et al., 2013). The medical costs of these conditions are increasing, as no cure is available and they affect, not only the patient, but also the entire family through serious limitations on the daily living activities. Alzheimer's disease (AD) is the most frequent cause of dementia in the elderly, it affects almost 10% of individuals over 65 years and older, and it increases rapidly in developed countries as life expectancy increases (Maccioni et al., 2009). The aggregation of amyloid peptide and tau protein, along with brain inflammation and dysfunctional cholinergic/glutamatergic neurotransmissions are the key features of AD (Rojo et al., 2008). Epidemiologic studies indicate that there are almost 40 million cases of AD around

the world, and it is estimated by the World Health Organization (WHO) that AD will globally increase reaching over 150 million cases by 2050. The pandemic proportions of AD and other forms of dementias will demand more research towards natural and cost efficient prophylactic interventions, especially if no etiologic treatments are developed in the near future. In this review, we discuss the potential effect of polyphenols in AD and other neurological disorders, with emphasis on the need for re-directing the research on anthocyanins and other polyphenols with neuroprotective effect. Especially those present on berries and grape, which have consistently been reported as neuroprotective in several in vivo and in vitro studies (Kalt et al., 2008, Flanagan et al., 2003).

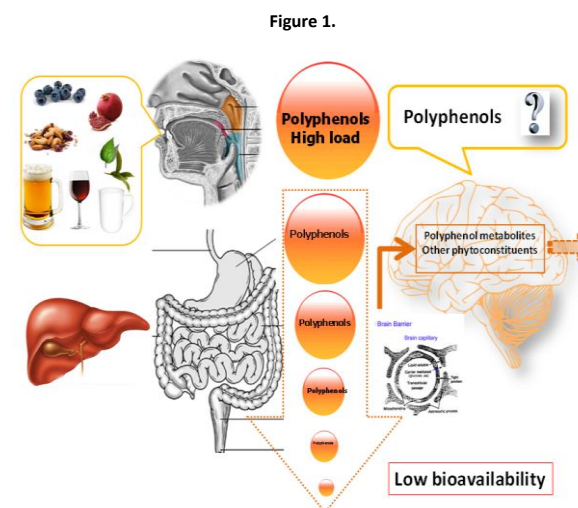
Correspondencia a: Dr. Leonel E. Rojo. Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile. Dirección: Avenida Libertador Bernardo O'Higgins N°3363. Estación Central. Santiago. Chile. Teléfono: + (562) 2 718 00 00. Correo electrónico: leonel.rojo@usach.cl

2) METABOLIC FATE OF POLYPHENOLS AND THE KEY ROLE OF MICROBIOME

Polyphenols ingested from diet and phytopharmaceutical products are generally poorly absorbed in the intestine and reach the colon where they are metabolized by the colonic microbiome (Deprez et al., 2001) (Figure 1). For instance, proanthocyanidins [1] with high polymerization degree could be degraded into aromatic acids and γ -valerolactones. Such metabolites could be easily detected in stools or fecal water of healthy subjects (Monagas et al., 2010; Appeldoorn et al., 2009; Jenner et al., 2005). Depolymerization of proanthocyanins during their pass through gastrointestinal tract generates monomers named flavan-3-ols or catechins [2]. *Clostridium coccoides* and *Bifidobacterium* spp. use these monomers to generate simpler microbial metabolites such as 3-hydroxyphenyl acetic acid (3-HPAA [3]), 4-hydroxyphenyl valeric acid (4-HPVA [4]), 4-hydroxyphenyl acetic acid (4-HPAA [5]), 3,4-dihydroxyphenyl propionic acid (3,4-DHPPA [6]). Some of the final metabolites of this pathway are protocatechuic acid (PA [7]), 3-hydroxybenzoic acid (3-HBA [8]), 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA [9]) and hippuric acid (HA [10]) (Marin et al., 2015). Other polyphenols like caffeic acid also undergo important colonic degradation giving origin to 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid (3-HPPA [11]), which also has been reported as microbial metabolite of flavan-3-ols (Aura et al., 2008). Many researchers think that these compounds may be absorbed in the colon and eventually may exert systemic activities (Jenner et al., 2005). Recently, Najmanova et al. (2016), demonstrated that 3-HPPA has potent *in vivo* vasodilatory activity. Also, intestinal microflora could form late metabolites from procyanidin and flavonoids such as 3-phenyl propionic acid [12] (Deprez et al., 2000). This compound has potential as antitumoral and anti-inflammatory molecule (Waldecker et al., 2008; Karlsson et al., 2005). By other hand, animal and human studies show that administration of cocoa, red wine, apple or green tea polyphenol-rich extracts stimulate the growth of bacterial populations in the colon, including *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp., which could underlay prebiotic-like effects (Excheverria et al., 2013; Masot-Cladera et al., 2012; Jin et al., 2012; Shinohara et al., 2010; Sánchez-Patán et al., 2012). Colonic metabolites of proanthocyanidins have been detected in urine of human subjects after the intake of certain food rich in polyphenols. This finding suggests that these compounds are absorbed in the colon and in consequence could exert their benefit effects in other tissues and organs (Henning et al., 2013; Carrasco-Pozo et al., 2015). In the last years many researchers have provide evidence of the presence of polyphenol metabolites in brain and its modulator effects on mammalian signal transduction pathways (Nichols et al., 2015). For example, it is well-known that microbiota plays a key role in bio-transformation of

ellagitannins and ellagic acid [13] generating new bioactive compounds named urolithins. Since the discover of urolithins (6*H*-dibenzo[*b,d*] pyran-6-one derivatives [14]) as main colonic metabolites of ellagitannins, great body of evidence has supported their preventive properties in different diseases. A recent study (Yuan et al., 2016) revealed that after the ingestion of pomegranate juice - which it is rich in complex ellagitannin moiety- anti-Alzheimer effects are evidenced. This group concludes that ellagitannins suffer bio-conversion into urolithins and can reach the brain and prevent neurotoxicity induced by β -amyloid. Additionally, they stated that physicochemical properties of such molecules help them to permeate into brain tissues.

To have a wider vision of the potential effects of polyphenol metabolites in the brain, advanced reader may consult the articles of Kennedy (2014), Wang et al., (2014) and Gasperotti et al., (2015).



Scheme of the metabolic fate of polyphenols after the ingestion of different herbal teas and foods.

3) ANTHOCYANINS

Anthocyanins (Figure 2) are polyphenols that confer red-to-blue pigmentation to fruits, flowers, cereals and certain tubers. These phenolic compounds occur in their free form (anthocyanidins), also called aglycones, acylated or glycosylated (anthocyanins). This latter chemical form the most commonly found in plant species. Anthocyanins are among the most widely consumed polyphenolic compounds (Wu et al., 2006) and their popularity is constantly increasing due to the numerous scientific reports describing neuroprotective and anti-obesity properties (Tsuda et al., 2003, Tsuda et al., 1998, Rojo et

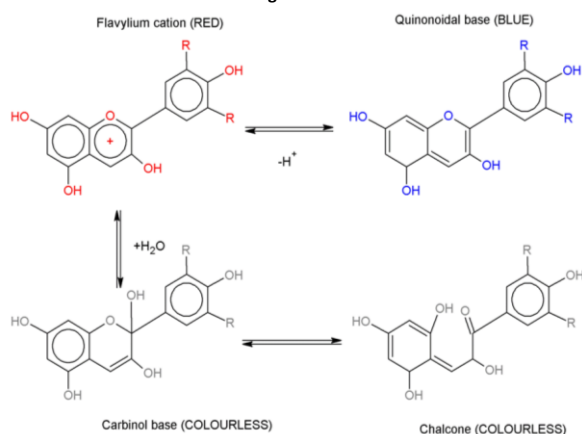
al., 2012, Grace et al., 2009). Several publications, including recent clinical trials (Stull et al., 2010), have shown evidenced on the benefits anthocyanins (ANCs) from fruits and vegetables in maintaining metabolic health. However, poor oral absorption and chemical instability of ANCs remain as major obstacle towards establishing reliable structure-activity relationships for different molecules of this family. Not only the alkaline environment of the GI tract contributes to degradation of ANCs prior to their systemic distribution, but also the biotransformations from gut microbioma –in first the place- lead to extensive *in vivo* metabolism of ANCs (Kong et al., 2003, Prior and Wu, 2006). Consequently, after 4 hours of acute oral ingestion of 100 g of freeze dried lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium*), equivalent to 1.2 g of total anthocyanins, only 5.43-16.9 ng/mL of total anthocyanins are detected in serum. The time to plasma peak of orally administered ANCs correlates well with a temporary increase in the post-prandial antioxidant capacity, in plasma, expressed as ORAC_{Total} and ORAC_{acetone} indexes (Mazza et al., 2002). This evidence suggests that ng/mL plasma levels of ANCs would be sufficient to reach systemic antioxidant effects. However, the reported health benefits of these molecules seemingly go far beyond antioxidant capacity, as chronic administration (8 weeks) of blueberries extract to aged rats significantly reversed the cognitive deficit compared to their vehicle-treated counterparts (Andres-Lacueva et al., 2005, Willis et al., 2009). Thus, it is plausible that not only the ANCs-induced antioxidant effect, but additional molecular/physiological events may explain the ANCs-induced neuroprotection against cognitive decline in aged rats. The evidence also shows that aged rats receiving blueberry extract display lower levels of NF- κ B in brain compared with a control group (Goyarzu et al., 2004) implying that ANCs would ameliorate inflammation in tissues different from blood. Similar findings were previously reported using a double-transgenic murine model of Alzheimer disease (AD), that overexpresses APP and presenilin 1, promoting the synthesis of high levels of A β peptide. In this model of AD, a diet supplemented with a 2% of blueberry extract for 12 months, significantly improved the animals performance in the Y maze without modifying the cerebral burden of senile plaques and A β peptide accumulation (Joseph et al., 2003). These latter pieces of evidence suggest that blueberry polyphenols would modify cerebral micro-inflammatory processes or prevent early pathological phosphorylation of tau protein in aged rodents. Similarly blueberry extract induced the expression of ERK in the hippocampus and PKCR in the striatum and hippocampus suggesting a disease modifying mechanism related with the activity of key kinases involved in memory processing (Micheau and Riedel, 1999). A recent study established that extracts rich in anthocyanins, proanthocyanidins, or other polyphenols from botanical sources suppress the neurotoxic effects of rotenone in a

primary cell culture model of Parkinson's Disease, and the extracts rich in anthocyanins and proanthocyanidins displayed the most potent neuroprotective effect against rotenone-induced neurotoxicity (Strathearn et al., 2014). Although limited in statistic strength, there is emerging evidence in humans, showing that age-related cognitive deficits can be ameliorated by consumption anthocyanin-rich blueberry juice, as the supplementation with blueberry juice during 12 weeks improved memory in older adults (Krikorian et al., 2010). In the same line, oral administration of pomegranate juice (*Punica granatum* L.) for 6-12.5 months to Tg2576 transgenic mice expressing APP695 human gene, improved performance in cue and spatial learning tasks (Hartman et al., 2006). This was the first published evidence suggesting a mechanism of neuroprotection for blueberry polyphenols correlated with modification of cerebral pathognomonic features of AD. Because orally administered pomegranate juice (rich in anthocyanins) lowered cerebral levels of soluble A β ₁₋₄₂ peptide, decreased the number of senile plaques in the hippocampus of Tg2576 mice. This finding should be considered a strong piece of evidence as the Tg2576 double transgenic develops cerebral inflammation, as well as tau and amyloid deposition in brain. This also brings the question as to which ANCs or metabolites are actually producing all the disease-modifying cerebral events.

Koli and coworkers studied the bioavailability of various polyphenols contained in berries (Koli et al., 2010). For this study, 72 middle-age volunteers were enrolled for an 8-weeks randomized, placebo-controlled dietary intervention trial. During this time, part of them consumed around 160 g/day of berries (bilberries, lingonberries, black currants, and chokeberries), further their urine and plasma were collected in order to analyze the presence of polyphenols and its metabolites. Only quercetin, p-coumaric acid and 3-hydroxyphenylacetic acid showed a positive correlation between plasmatic and urinary levels. Most recently, using LC/MS/MS, Nakamura and coworkers successfully quantified unaltered anthocyanidins in plasma of human subjects after the consumption of 253 mg of black currant extracts (equivalents to 58.8 mg of total anthocyanidins) (Nakamura et al., 2010). Epidemiological studies suggested that consumption of red wine has been associated to lower incidence of Alzheimer disease (Luchsinger et al., 2004), which was later supported by experimental data from the Tg2576 in transgenic mice, as the same polyphenols of red wine ameliorated *in vivo* amyloid deposition, and peptide aggregation this AD animal model (Wang et al., 2008). Further investigations on the mechanism established that grape polyphenols, mainly catechin, epicatechin, oligomeric and polymeric procyanidins, inhibited aggregation and cellular toxicity of amyloid peptides (Ono et al., 2008). This the authors followed up on the study reporting that myricetin and rosmarinic acid, common polyphenols in grape decrease the toxicity and early

assembly of amyloid peptides by interfering with specific binding sites of the amyloid peptide (Ono et al., 2012). However, the cerebral bioavailability of polyphenols is limited (Ichihara et al., 2004) and controversial (Kalt et al., 2008). Investigations on the compartmentalization of metabolites from anthocyanins, catechins and procyanidins are needed in light of the current data. The remarkable neuroprotective effect of grape juice polyphenols fed is another example worth mentioning in this review. As it was demonstrated that aged Fisher rats treated with a 10 or 50% grape juice until 12-21 months old, showed significant improvement in their performance in the rota-rod (motor activity) and Morris water maze (cognitive skills) (Shukitt-Hale et al., 2006). However, with all these neuroprotective evidence it is still not possible to link such effects with a specific molecule. Several published studies intend to correlate biological parameters with orally administered polyphenols. The anthocyanin pigments, for example, circulate in a neutral aqueous medium (blood); therefore their stability becomes a central issue. The influence of pH in the ANCs stability has been described early by various authors (Pina, 1998, Jordheim et al., 2006a, Jordheim et al., 2006b). All of these works established that in acid and neutral environment, anthocyanins could exist in four forms in equilibrium: the flavylium cation, the quinonoidal base, the pseudobase carbinol, and the chalcone. The predominant pigment will be defined by pH of the medium, concentration and the structure of the original compound. Thus, in strongly acidic solutions (below pH 2) the flavylium cation is predominant giving rise to anthocyanin solutions which are red in color. For instance if the cyanidin 3,5-diglucoside is maintained in a solution with neutral pH, the predominant form will be the pseudobase carbinol and in a lower extent the chalcone form.

Figure 2.



Structural forms of anthocyanidins at different pH (adapted from Jordheim et al., 2006).

On the other side, it has been observed that at neutral pH the colored quinonoidal base is the main form when in anthocyanins the substitution pattern changes, which is the case of 4-methyl-7-hydroxyflavylium and 4'-methoxy-4-carboxy-7-hydroxyflavylium chloride. Besides, it is not clear if the presence of metallic ions, oxygen, ascorbic acid, sugars, and other factors are relevant for the *in vivo* stability of these pigments. Moreover, the stability of such compounds in cell culture media regularly under estimated. For instance, in cell culture systems some anthocyanins only remain stable up to 2 hours (Prior et al., 2006).

As said above, the effects of anthocyanins metabolites and its different forms existing in biological fluids should be matter of investigation in future studies (Mazza and Miniati, 1993).

In order to shed light on this point, recently Milbury and Kalt have conducted a study aimed to detect the presence of anthocyanin metabolites in different zones of pig's brain after administration of a lyophilized powder of blueberries during eight weeks (Milbury and Kalt, 2010). They detected delphinidin and malvidin glucuronides in the cortex, cerebellum and mid-brain, and diencephalon. The relative levels of these metabolites were 6 to 48 times greater than those of peonidin, cyanidin and petunidin. Authors suggested that these metabolites are removed from brain slower than other anthocyanidins. Unfortunately, since the stable isotopically labeled anthocyanidin glucuronides are not currently available; this aspect still remains to be clarified.

4) EQUOL

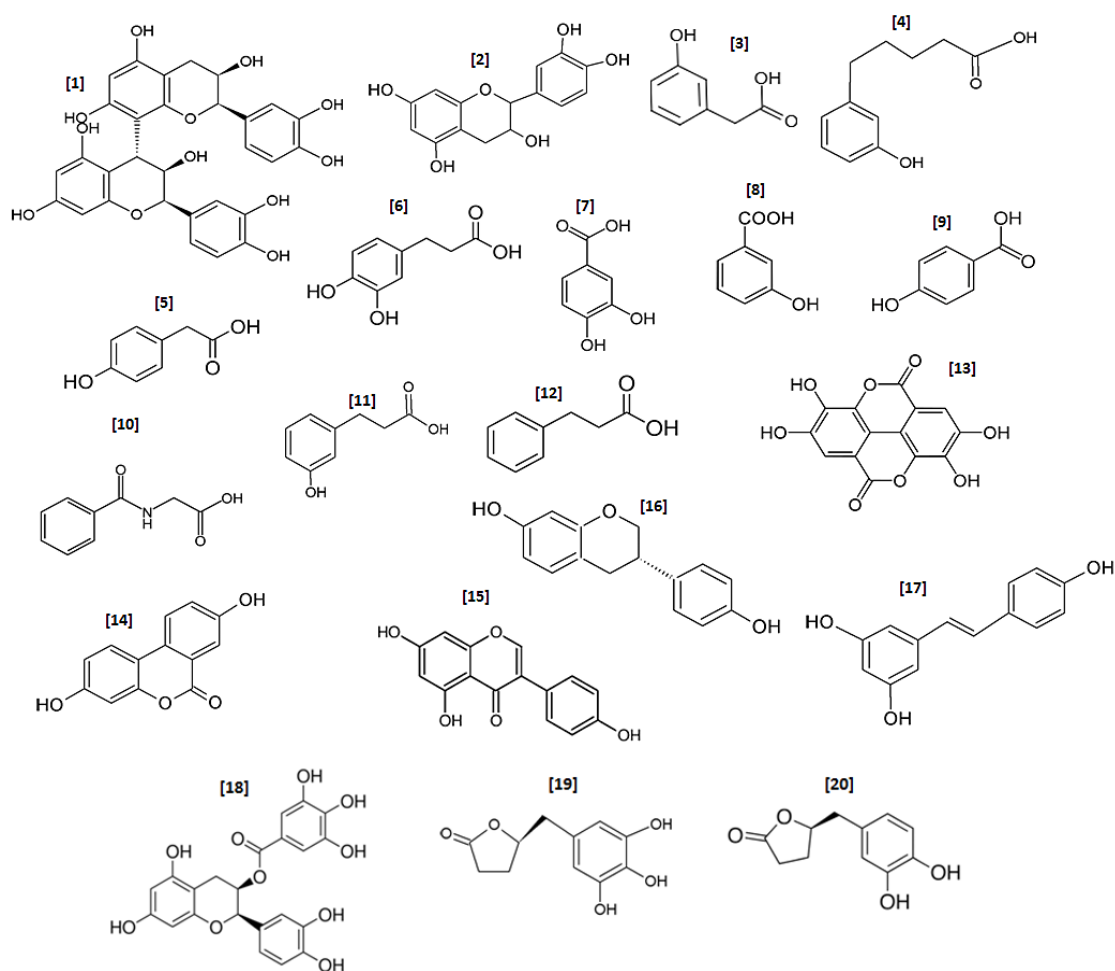
Soy foods are a rich source of phytoestrogens (isoflavones [Figure 3, structure 15]), which display several biological activities. Among them, genistein and daidzein have estrogenic activity, displaying protective effects in climacteric women, particularly against osteoporosis and cardiovascular health. Chemical structure of isoflavones is similar to that of estrogens. They bind to the estrogen receptors (ER α and ER β) with lower affinity than estrogens, and because of that were classified as selective estrogen receptor modulators (SERMs) (Messina, 2000). Such compounds exist as glycosides in soy foods and should be metabolized by intestinal bacteria, which hydrolyze the carbohydrate moiety, to the biologically active isoflavones. In fact, glycosylated isoflavonoids are not bio-available and need to be hydrolyzed by brush border membrane α -glucosidases prior to its absorption (Setchell et al., 2002).

Although the effects of isoflavones in menopause are widely studied, clinical trials have been shown highly variable –and contradictory– results. Regarding to this, only in the last decade scientific interest has turned to an active

intestinal metabolite of daidzein, equol [16] (7-hydroxy-3[49hydroxyphenyl]-chroman). This metabolite is more active than parental compounds and it discover raised the so-called "equol hypothesis". The main statement of this hypothesis is that health benefits associated to soy-base diets intake probably will be greater in equol-producers than in equol nonproducers (Atkinson et al., 2005). However, depending on the isoflavone intake, only 30-40 % of human beings could produce equol. Hitherto, around 20 intestinal bacteria that could convert daidzein to equol have been identified in humans. For instance, *Lactococcus garvieae* is very efficient to convert daidzein to S-(-)-equol. This property has been explored successfully for development of nutraceuticals (Ishiwata et al., 2009).

The role of isoflavones in neuroprotection has been recognized in several works (Zhao et al., 2002, Schreihöfer et al., 2010, Linford and Dorsa, 2002). In astrocytes genistein could limit the A β -induced production of iNOS, COX-2, TNF- α and IL-1 β . Such anti-inflammatory effects has been ascribed to the activation of PPARs (Valles et al., 2010). In another research, intraocular or subcutaneous administration of daidzein could promote axonal regeneration *in vivo* in an optical nerve crush model (Ma et al., 2010a). Authors suggested that daidzein effects are cAMP-independent, since it increases Arg1 without increasing CREB phosphorylation. The same author has reported the importance of equol in this field of investigation (Ma et al., 2010b). In this work, the antioxidant effect of genistein and equol was demonstrated in rats with focal ischemia.

Figure 3.



Polyphenol molecules and main metabolites discussed in this article.

5) RESVERATROL

The stilbene resveratrol [17] is a phytoalexin found in *Vitis vinifera* and red wine (active form: *trans*-3,4,5-thihydroxystilbene). The antioxidant and antitumoral activities of resveratrol have been reported elsewhere (Caruso et al., 2004, Zbikowska and Olas, 2000). Antitumor activity has been demonstrated in several solid tumors like osteosarcoma, esophagic squamous carcinoma, breast cancer, colon cancer, uterine cancer, Burkitt lymphoma, multiple myeloma and pro-myelocytic leukemia. The observed effects were growth inhibition, induction of apoptosis and arrest of cell cycle in S-G₂ stages. Resveratrol showed low toxicity and it seems to be well tolerated *in vivo* at a dose of 20 mg/kg in mice for 4 weeks (Aggarwal et al., 2004, Emilia Juan et al., 2002). Resveratrol displays significant chemoprotective and antineoplastic activities in certain solid tumors. Recently, administration of 4.9 mg/kg/day of resveratrol to mice produce a genetic expression profile similar to those observed during caloric restriction regimes (Barger et al., 2008). These results suggested initially that this polyphenol could modulate the activity of the mammalian Target of Rapamycin (mTOR) acting as anti-ageing agent (Bonawitz et al., 2007). However, whereas rapamycin increase life-span in genetically heterogeneous mice, resveratrol did not (Miller et al., 2011).

Resveratrol is metabolized at 2 hours forming sulphate and glucuronide conjugates (Lastra and Villegas, 2005). Besides, two isomeric forms of resveratrol monoglucuronide, dihydroresveratrol monosulphate and dihydroresveratrol monoglucuronide also have been reported (Walle et al., 2004). In plasma, the glucuronide form is the main circulating metabolite. Brain distribution in rats is very low. Thus, when a dose of 50 mg/kg of [³H]- *trans*-resveratrol was orally administrated to rats, only 0.01-0.03 % reach the brain after 2-18 hours. So far, it is not known if the conjugated forms of resveratrol have some neuroprotective effect. Moreover, *trans*-resveratrol could be glucuronidated *in situ* as was observed in rat brain and astrocytes (Sabolovic et al., 2007).

After two weeks of resveratrol-supplemented diet, nmol/g wet weight of resveratrol in perfused brain of mice was detected around (Vingtdeux et al., 2010). The authors found that resveratrol lower A β accumulation by activating AMPK signaling in cell lines and in primary neuronal cultures. Moreover, resveratrol also induced degradation of A β by activating autophagy and lysosomal degradation. These results suggested that even after extensive metabolism, resveratrol and/or its metabolites could cross brain barrier and exert anti-amyloidogenic effects. In another work, resveratrol promoted ERK activation in PC12 cells and R6/2 mice used as model of Huntington disease

(Maher et al., 2010). As previously mentioned, the moderate wine consumption of wine by transgenic Tg2576 mice improves A β clearance (Wang et al., 2006). Importantly, in this study Cabernet Sauvignon wine was used, which contained very low amounts of resveratrol. So, the authors suggested that other polyphenols different from resveratrol (and probably some of its metabolites) could fight the accumulation of A β peptides in brain of patients with Alzheimer disease. We hypothesized that resveratrol enriched foods and nutraceuticals will probably fail to attain life-span extension and neuronal protection.

6) CATECHINS

After oral ingestion, up to 30% of ingested tea catechins [18] are metabolized to *O*-methylated by catechol-*O*-methyltransferases in the jejunum. A 20% is both *O*-methylated and glucuronidated (Kuhnle et al., 2000). Catechin glucuronidation in the intestine occur via UDP-glucuronosyl transferase. Such metabolism continues in the liver (phase II). Also, sulphate conjugates were found in plasma and urine. These metabolism determine that methylated catechins predominates over unbound and glucuronide metabolites (Pietta et al., 1998). After green tea ingestion some epigallocatechin gallate ring-fission metabolites were identified in human urine as (-)-5-(3',4',5'-trihydroxyphenyl)- γ -valerolactone [19] and (-)-5-(3',4',-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone [20] (Meng et al., 2002). Oligomeric and polymeric procyanidins [1] possess low oral absorption but could act as deposit of monomeric flavan-3-ols. These monomers could be released during the pass of procyanidins through the intestine. Using senescence-accelerated mouse (SAMP8) as murine model Lee and coworkers demonstrated that oligomeric proanthocyanidins improve memory and enhance phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2. They observed that the density of axon in hippocampal CA1 was significantly increased by procyanidins oligomers. Also, they reported that these compounds increased phosphorylation of VEGFR-2 in the hippocampal CA3, hypothalamus and choroid plexus (Lee et al., 2010). Moreover, there are evidence that (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin-3-gallate [18] (major components of green tea) reach brain structures and might exert antioxidant and metal-chelating activities (Mandel et al., 2008). Nevertheless, it is not clear whether flavan-3-ols from different resources are capable to cross blood brain barrier in concentrations sufficiently high to promote neuroprotection. All these properties have been reviewed in detail y some recent works (Weinreb et al., 2009, Singh et al., 2008, Weinreb et al., 2004).

Very low concentrations of methylated and glucuronidated catechins has been observed in the brain of rats.

Moreover, it is likely that these metabolites were formed *in situ*, since uridine diphosphate-glucuronyl transferase (UDPGT) activity is present in the central nervous system of rats (Gherzi-Egea et al., 1987). Schroeter and coworkers demonstrate that epicatechin and 3'-O-methyl-epicatechin protect neuron against oxidative injury via suppression of JNK and downstream partners, c-jun and pro-caspase-3 (Schroeter et al., 2001)

Recently, the antioxidant activity of two metabolites of luteolin and quercetin were investigated. Such compound named 3,4-DHPAA and 3,4-DHT are bioavailable and displayed *in vitro* protective activity against oxidative stress in PC12 cells treated with H₂O₂, FeSO₄, and t-BHP. 3,4-DHT shown better antioxidant activity than 3,4-DHPAA probably because its greater lipid solubility (Pavlica and Gebhardt, 2010). Regarding to the metabolites from tea catechins, It was recently reported that a green tea extract provide potential neuroprotection against H₂O₂ and Aβ₁₋₄₂ induced cytotoxicity in differentiated PC12 cells. Interestingly, this extract was used after being sequentially incubated in artificial gastric and intestinal environment (Okelloa et al., 2010). Before treatment of PC12 cells, extract was purified and analyzed by LC-MS. Authors observed that pre-incubation (0.03-2 µg/mL) for 24 h prior to Aβ addition attenuated Aβ-induced toxicity in PC12 cells at the lowest concentration. Although the results presented in this study are relevant, they only provide evidence of the potential effect of "digested" tea catechins. Due to the great impact of the microbiota on the metabolic fate of catechins, it would be prudent to consider this topic in the near future (Roowi et al., 2010).

7) CONCLUDING REMARKS

Recent data analyzed in this review indicate that the next frontier in this field of pharmacology is to understand which the chemical biotransformations occurred to polyphenols are as they pass through the different portions of intestine and even within the target organs. This knowledge will be instrumental in defining the "true" bioactive molecules and the role of metabolism in pharmacology of ingested polyphenols. The fact that only picomolar or nanomolar concentrations of intact polyphenols reach brain structures after oral administration remains as a major issue for these family of chemical compounds.

It is also important, in the light of a recent publication by Roopchand et al., (Roopchand et al., 2015), to study the effect of polyphenols on the microbiota residing within different regions of the intestine. According to this new data, polyphenols are able to induce major changes in the profile of intestinal bacteria living symbiosis with humans and other animals. Several publications from prestigious

journals like Nature or Science have highlighted the importance of the intestinal microbiota for metabolic/endocrine health and the fact that polyphenols are potent modifiers of this microbiome must not escape from our attention.

ACKNOWLEDGEMENTS

LER acknowledges Grant FONDECYT N° 11140915 for financial support. EP acknowledges Grant FONDECYT N° 1150948 for financial support.

REFERENCES:

- AGGARWAL, B. B., BHARDWAJ, A., AGGARWAL, R. S., SEERAM, N. P., SHISHODIA, S. & TAKADA, Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 24, 2783-2840.
- ANDRES-LACUEVA, C., SHUKITT-HALE, B., GALLI, R. L., JAUREGUI, O., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. & JOSEPH, J. A. 2005. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr. Neurosci.*, 8, 111-120.
- APPELDOORN, M.M., VINCKEN, J.P., AURA, A.M., HOLLMAN, P.C., GRUPPEN, H. 2009. Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 1084-92.
- ATKINSON, C., FRANKENFELD, C. L. & LAMPE, J. W. 2005. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230, 155-170.
- AURA, A. M., MATTILA, I., SEPPÄNEN-LAAKSO, T., MIETTINEN, J., OKSMAN-CALDENETEY, K. M., ORESIC, M. 2008. Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota: comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method. *Phytochem. Lett.*, 1, 18-22.
- BARGER, J. L., KAYO, T., PUGH, T. D., PROLLA, T. A. & WEINDRUCH, R. 2008. Short-term consumption of a resveratrol-containing nutraceutical mixture mimics gene expression of long-term caloric restriction in mouse heart. *Experimental Gerontology*, 43, 859-866.
- BONAWITZ, N. D., CHATENAY-LAPOINTE, M., PAN, Y. & SHADEL, G. S. 2007. Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metabolism*, 5, 265-277.
- CARRASCO-POZO, C., GOTTELAND, M., CASTILLO, R., CHEN, C. 2015. High cholesterol induces apoptosis, mitochondrial dysfunction, oxidative stress and impairment of insulin secretion in pancreatic β-cells; protection by 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin. *Exp. Cell Res.*, 334: 270-82.
- CARUSO, F., TANSKI, J., VILLEGAS-ESTRADA, A. & ROSSI, M. 2004. Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: Ab initio calculations and crystal and molecular structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7279-7285.
- DEPREZ, S., BREZILLON, C., RABOT, S., PHILIPPE, C., MILA, I., LAPIERRE, C., SCALBERT, A. 2000. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J. Nutr.*, 130, 2733-2738.

- DEPREZ, S., MILA, I., HUNEAU, J.F., TOMÉ, D., SCALBERT, A. 2001. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid. Redox Signal*, 3, 957-67.
- EMÍLIA JUAN, M., BUENAFUENTE, J., CASALS, I. & PLANAS, J. M. 2002. Plasmatic levels of trans-resveratrol in rats. *Food Research International*, 35, 195-199.
- ETXEBERRIA, U., FERNÁNDEZ-QUINTELA, A., MILAGRO, F.I., AGUIRRE, L., MARTÍNEZ, J.A., PORTILLO, M.P. 2013. Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 9517-33.
- FLANAGAN, R. J., AMIN, A. & SEINEN, W. 2003. Effect of post-mortem changes on peripheral and central whole blood and tissue clozapine and nortoclozapine concentrations in the domestic pig (*Sus scrofa*). *Forensic Sci Int*, 132, 9-17.
- GASPEROTTI, M., PASSAMONTI, S., TRAMER, F., MASUERO, D., GUELLA, G., MATTIVI, F., VRHOVSEK, U. 2015. Fate of microbial metabolites of dietary polyphenols in rats: is the brain target destination. *ACS Chem. Neurosci.* 19(6): 1341-1352.
- GHERSI-EGEA, J. F., WALTHER, B., DECOLIN, D., MINN, A. & SIEST, G. 1987. The activity of 1-naphthol-UDP-glucuronosyltransferase in the brain. *Neuropharmacology*, 26, 367-372.
- GOYARZU, P., MALIN, D. H., LAU, F. C., TAGLIALATELA, G., MOON, W. D., JENNINGS, R., MOY, E., MOY, D., LIPPOLD, S., SHUKITT-HALE, B. & JOSEPH, J. A. 2004. Blueberry supplemented diet: effects on object recognition memory and nuclear factor- κ B levels in aged rats. *Nutr. Neurosci.*, 7.
- GRACE, M. H., RIBNICKY, D. M., KUHN, P., POULEV, A., LOGENDRA, S., YOUSEF, G. G., RASKIN, I. & LILA, M. A. 2009. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*, 16, 406-15.
- HARTMAN, R. E., SHAH, A., FAGAN, A. M., SCHWETYE, K. E., PARSADANIAN, M., SCHULMAN, R. N., FINN, M. B. & HOLTZMAN, D. M. 2006. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.*, 24.
- HENNING, S.M., WANG, P., ABGARYAN, N., VICINANZA, R.; DE OLIVEIRA, D.M., ZHANG, Y., LEE, R.P., CARPENTER, C.L., ARONSON, W.J., HEBER, D. 2013. Phenolic acid concentrations in plasma and urine from men consuming green or black tea and potential chemopreventive properties for colon cancer. *Mol. Nutr. Food Res.*, 57: 483-93.
- ICHIYANAGI, T., RAHMAN, M. M., KASHIWADA, Y., IKESHIRO, Y., SHIDA, Y., HATANO, Y., MATSUMOTO, H., HIRAYAMA, M., TSUDA, T. & KONISHI, T. 2004. Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. *Free Radic Biol Med*, 36, 930-7.
- ISHIWATA, N., MELBY, M. K., MIZUNO, S. & WATANABE, S. 2009. New equol supplement for relieving menopausal symptoms: randomized, placebo-controlled trial of Japanese women. *Menopause*, 16, 141-148.
- JENNER, A.M., RAFTER, J., HALLIWELL, B. 2005. Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic. Biol. Med.*, 38, 763-72.
- JIN, J.S., TOUYAMA, M., HISADA, T., BENNO, Y. 2012. Effects of green tea consumption on human fecal microbiota with special reference to *Bifidobacterium* species. *Microbiol. Immunol.*, 56, 729-39.
- JORDHEIM, M., FOSSEN, T. & ANDERSEN, O. M. 2006a. Characterization of hemiacetal forms of anthocyanidin 3-O-beta-glycopyranosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9340-9346.
- JORDHEIM, M., FOSSEN, T. & ANDERSEN, O. M. 2006b. Preparative isolation and NMR characterization of carboxypyrananthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3572-3577.
- JOSEPH, J. A., DENISOVA, N. A., ARENDASH, G., GORDON, M., DIAMOND, D., SHUKITT-HALE, B. & D., M. 2003. Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. *Nutr. Neurosci.*, 6, 153-162.
- KALT, W., BLUMBERG, J., MCDONALD, J., VINQVIST-TYMCHUK, M., FILLMORE, S., GRAF, B., O'LEARY, J. & MILBURY, P. 2008 Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J Agric Food Chem.* , 56, 705-712.
- KARLSSON, P.C., HUSS, U., JENNER, A., HALLIWELL, B., BOHLIN, L., RAFTER, J.J. 2005. Human fecal water inhibits COX-2 in colonic HT-29 cells: role of phenolic compounds. *J. Nutr.*, 135(10), 2343-2349.
- KENNEDY D.O. 2014. Polyphenols and the Human Brain: Plant Secondary Metabolite" Ecologic Roles and Endogenous Signaling Functions Drive Benefits. *Adv. Ntr.*, 5: 515-533.
- KOLI, R., ERLUND, I., JULA, A., MARNIEMI, J., MATTILA, P. & ALFTHAN, G. 2010. Bioavailability of Various Polyphenols from a Diet Containing Moderate Amounts of Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3927-3932.
- KONG, J. M., CHIA, L. S., GOH, N. K., T.F. CHIA & BROUILLARD, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933.
- KRIKORIAN, R., SHIDLER, M. D., NASH, T. A., KALT, W., VINQVIST-TYMCHUK, M. R., SHUKITT-HALE, B. & JOSEPH, J. A. 2010. Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults. *J Agric Food Chem*, 58, 3996-4000.
- KUHNLE, G., SPENCE, J. D., SCHROETER, H., SHENOY, B., DEBNAM, E. & KAILA, S. 2000. Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun*, 277, 507-512.
- KULJIS, R. O., COLOM, L. V. & ROJO, L. E. 2013. Biological Basis for Cerebral Dysfunction in Schizophrenia in Contrast with Alzheimer's Disease. *Front Psychiatry*, 4, 119.
- LASTRA, C. A. D. L. & VILLEGAS, I. 2005. Resveratrol as an antiinflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 405-430.
- LEE, Y. A., CHO, E. J. & YOKOZAWA, T. 2010. Oligomeric proanthocyanidins improve memory and enhance phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 in senescence accelerated mouse prone/8. *Brit J Nutr*, 103, 479-489.
- LINFORD, N. J. & DORSA, D. M. 2002. 17 β -Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids*, 67, 1029-1040.
- LUCHSINGER, J. A., TANG, M. X., SIDDIQUI, M., SHEA, S. & MAYEUX, R. 2004. Alcohol intake and risk of dementia. *J. Am. Geriatr. Soc.* , 52: , 540-546.
- MA, T. C., CAMPANA, A., LANGE, P. S., LEE, H.-H., BANERJEE, K., BRYSON, J. B., MAHISHI, L., ALAM, S., GIGER, R. J., BARNES, S., JR, S. M. M., WILLIS, D. E., TWISS, J. L., FILBIN, M. T. & RATAN, R. R. 2010a. A Large-Scale Chemical Screen for Regulators of the Arginase 1 Promoter Identifies the Soy Isoflavone Daidzein as a Clinically Approved Small Molecule That Can Promote Neuronal Protection or Regeneration via a cAMP-Independent Pathway. *The Journal of Neuroscience*, 30, 739-748.

- MA, Y. L., SULLIVAN, J. C. & SCHREIHOFFER, D. A. 2010b. Dietary genistein and equol (4', 7 isoflavandiol) reduce oxidative stress and protect rats against focal cerebral ischemia. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 299, R871-R877.
- MACCIONI, R. B., ROJO, L. E., FERNANDEZ, J. A. & KULJIS, R. O. 2009. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1153, 240-6.
- MAHER, P., DARGUSCH, R., BODAI, L., GERARD, P. E., PURCELL, J. M. & MARSH, J. L. 2010. ERK activation by the polyphenols fisetin and resveratrol provides neuroprotection in multiple models of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 1-10.
- MANDEL, S., AMIT, T., KALFON, L., REZNICHENKO, L., WEINREB, O. & YODIM, M. B. H. 2008. Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG). *J Alzheimers Dis*, 15, 211-222.
- MARIN, L., MIGUELEZ, E., VILLAR, C., LOMBO, F. 2015. Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *Biomed Research International*. doi: [10.1155/2015/905215](https://doi.org/10.1155/2015/905215).
- MASSOT-CLADERA, M., PÉREZ-BEREZO, T., FRANCH, A., CASTELL, M., PÉREZ-CANO, F. J. 2012. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Arch. Biochem. Biophys.*, 527, 105-12.
- MAZZA, G., KAY, C. D., COTTELL, T. & HOLUB, B. J. 2002. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7731-7737.
- MAZZA, G. & MINIATI, E. 1993. *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains* Boca raton, CRC Press.
- MENG, X., SANG, S., ZHU, N., LU, H., SHENG, S., JUNG-LEE, M., HO, C.-T. & YANG, C. S. 2002. Identification and Characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice and rats. *Chem Res Toxicol*, 15, 1042-1050.
- MESSINA, M. 2000. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). *Eur J Cancer*, 36, S71-S77.
- MICHEAU, J. & RIEDEL, G. 1999. Protein kinases: which one is the memory molecule? *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 534-548.
- MILBURY, P. E. & KALT, W. 2010. Xenobiotic Metabolism and Berry Flavonoid Transport across the Blood-Brain Barrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3950-3956.
- MILLER, R. A., HARRISON, D. E., ASTLE, C. M., BAUR, J. A., BOYD, A. R., R. D. C., FERNANDEZ, E., FLURKEY, K., JAVORS, M. A., NELSON, J. F., ORIHUELA, C. J., PLETCHER, S., SHARP, Z. D., SINCLAIR, D., STARNES, J. W., WILKINSON, J. E., NADON, N. L. & STRONG, R. 2011. Rapamycin, But Not Resveratrol or Simvastatin, Extends Life Span of Genetically Heterogeneous Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 66A, 191-201.
- MONAGAS, M., URPI-SARDA, M., SÁNCHEZ-PATÁN, F., LLORACH, R., GARRIDO, I., GÓMEZ-CORDOVÉS, C., ANDRES-LACUEVA, C., BARTOLOMÉ, B. 2010. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Funct.*, 1, 233-53.
- NAKAMURA, Y., MATSUMOTO, H., MORIFUJI, M., IIDA, H. & TAKEUCHI, Y. 2010. Development and Validation of a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Four Anthocyanins in Human Plasma after Black Currant Anthocyanins Ingestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1174-1179.
- NAJMANOVA I., POUROVA J., VOPRSALOVA M., PILAROVA V., SEMECKY V., NOVAKOVA L., MLADENKA P. 2016. The flavonoid metabolite 3-(-hydroxyphenyl) propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rat. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016: DOI: 10.1002/mnfr.201500761.
- NICHOLS, M., ZHANG, B. J., POLSTER, M., ELUSTONDO, P. A., THIRUMARAN, A., PAVLOV, E. V., ROBERTSON, G. S. 2015. Synergistic neuroprotection by epicatechin and quercetin: Activation of convergent mitochondrial signaling pathways, *Neuroscience*, 308, 75
- OKELLO, E. J., G. J. MCDUGALL, S. KUMARA & C. J. SEALA 2010. In vitro protective effects of colon-available extract of Camellia sinensis (tea) against hydrogenperoxide and beta-amyloid(Aβ(1-42)) induced cytotoxicity in differentiated PC12 cells. *Phytomedicine*, (In press).
- ONO, K., CONDRON, M. M., HO, L., WANG, J., ZHAO, W., PASINETTI, G. M. & TELOW, D. B. 2008. Effects of Grape Seed-derived Polyphenols on Amyloid beta-Protein Self-assembly and Cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 32176-32187.
- ONO, K., LI, L., TAKAMURA, Y., YOSHIIKE, Y., ZHU, L., HAN, F., MAO, X., IKEDA, T., TAKASAKI, J., H., N., TAKASHIMA, A., TELOW, D. B., ZAGORSKI, M. G. & M., Y. 2012 Phenolic Compounds Prevent Amyloid β-Protein Oligomerization and Synaptic Dysfunction by Site-specific Binding. *J. Biol. Chem.*, 287, 14631-14643
- PAVLICA, S. & GEBHARDT, R. 2010. Protective effects of flavonoids and two metabolites against stress in neuronal PC12 cells. *Life Sciences*, 86, 79-86.
- PIETTA, P. G., SIMONETTI, P., GARDANA, C., BRUSAMOLINO, A., MORAZZONI, P. & BOMBARDELLI, E. 1998. Catechin metabolites after intake of green tea. *Biofactors*, 8, 111-118.
- PINA, F. 1998. Thermodynamics and kinetics of flavylum salts - Malvin revisited. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, 94, 2109-2116.
- PRIOR, R. L. & WU, X. 2006. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic. Res.*, 40, 1014-1028.
- PRIOR, R. L., WU, X. & GU, L. 2006. Flavonoid metabolism and challenges to understanding mechanisms of health effects. *J Sci Food Agric* 86, 2487-2491.
- ROJO, L. E., FERNANDEZ, J. A., MACCIONI, A. A., JIMENEZ, J. M. & MACCIONI, R. B. 2008. Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Med Res*, 39, 1-16.
- ROJO, L. E., RIBNICKY, D., LOGENDRA, S., POULEV, A., ROJAS-SILVA, P., KUHN, P., DORN, R., GRACE, M. H., LILA, M. A. & RASKIN, I. 2012. In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chemistry*, 131, 387-396.
- ROOPCHAND, D., CARMODY, R., KUHN, P., MOSKAL, K., ROJAS-SILVA, P., TURNBAUGH, P. & I, R. 2015. Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium Akkermansia muciniphila and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Diabetes* 64, 2847-2858.
- ROOWI, S., STALMACH, A., MULLEN, W., LEAN, M. E., EDWARDS, C. A. & CROZIER, A. 2010. Green tea flavan-3-ols: colonic degradation and urinary excretion of catabolites by humans. *J. Agric. Food Chem*, 58, 1296-1304.
- SABOLOCIC, N., HEURTAUX, T., HUMBERT, A. C., KRISA, S. & MAGDALOU, J. 2007. cis- and trans-Resveratrol are glucuronidated in rat brain, olfactory mucosa and cultured astrocytes. *Pharmacology*, 80, 185-192.

- SÁNCHEZ-PATÁN, F., Cueva, C., Monagas, M., Walton, G.E., Gibson, G.R., Quintanilla-López, J.E., Lebrón-Aguilar, R., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., Bartolomé, B. 2012. In vitro fermentation of a red wine extract by human gut microbiota: changes in microbial groups and formation of phenolic metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 2136-47.
- SCHREIHOFFER, D. A., DEUTSCH, C., LOVEKAMP-SWAN, T., SULLIVAN, J. C. & DORRANCE, A. M. 2010. Effect of high soy diet on the cerebrovasculature and endothelial nitric oxide synthase in the ovariectomized rat. *Vascular Pharmacology*, 52, 236-242.
- SCHROETER, H., SPENCER, J. P. E., RICE-EVANS, C. & WILLIAMS, R. J. 2001. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J*, 358, 547-557.
- SETCHELL, K. D. R., BROWN, N. M., ZIMMER-NECHEMIAS, L., BRASHEAR, W. T., B. WOLFE, B., KIRSCHER, A. S. & HEUBI, J. E. 2002. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 76, 447-453.
- SHINOHARA, K., Ohashi, Y., Kawasumi, K., Terada, A., Fujisawa, T. 2010. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe*, 16, 510-5.
- SHUKITT-HALE, B., CAREY, A., SIMON, L., MARK, D. A. & JOSEPH, J. A. 2006. Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition*, 22, 295-302.
- SINGH, M., ARSENEAULT, M., SANDERSON, T., MURTHY, V. & RAMASSAMY, C. 2008. Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer's Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms. *J Agric Food Chem*, 56, 4855-4873.
- STRATHEARN, K. E., YOUSEF, G. G., GRACE, M. H., ROY, S. L., TAMBE, M. A., FERRUZZI, M. G., WU, Q. L., SIMON, J. E., LILA, M. A. & ROCHET, J. C. 2014. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinsons disease. *Brain Res*, 1555, 60-77.
- STULL, A. J., CASH, K. C., JOHNSON, W. D., CHAMPAGNE, C. M. & CEFALU, W. T. 2010. Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. *The Journal of nutrition*, 140, 1764-1768.
- TSUDA, T., HORIO, F. & OSAWA, T. 1998. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids*, 33, 583-8.
- TSUDA, T., HORIO, F., UCHIDA, K., AOKI, H. & OSAWA, T. 2003. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr*, 133, 2125-30.
- VALLES, S. L., DOLZ-GAITON, P., GAMBINI, J., BORRAS, C., LLORET, A., PALLARDO, F. V. & VINA, J. 2010. Estradiol or genistein Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPARγ expression in cultured astrocytes. *Brain Res*, 1312, 138.
- VINGTDEUX, V., GILIBERTO, L., ZHAO, H., CHANDAKKAR, P., WU, Q., SIMON, J. E., JANLE, E. M., LOBO, J., FERRUZZI, M. G., DAVIES, P. & MARAMBAUD, P. 2010. AMP-activated Protein Kinase Signaling Activation by Resveratrol Modulates Amyloid-β Peptide Metabolism. *J Biol Chem*, 285, 9100-9113.
- WALDECKER, M., KAUTENBURGER, T., DAUMANN, H., BUSCH, C., SCHRENK, D. 2008. Inhibition of histone-deacetylase activity by shortchain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J. Nutr. Biochem.*, 19(9), 587-593.
- WALLE, T., HSIEH, F., DELEGGE, M. H., OATIS, J. E. & WALLE, U. K. 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*, 32, 1377-1382.
- WANG, D., HO, L., FAITH, J., ONO, K., JANLE, E.M., LACHCIK, P., COOPER, B., JANNASCH, A., D'ARCY, B., WILLIAMS, B., FERRUZZI, M., LEVINE, S., ZHAO, W., DUBNER, L., PASINETTI, G. 2015. Role of intestinal microbiota in the generation of polyphenol-derived phenolic acid mediated attenuation of Alzheimer's disease β-amyloid oligomerization. *Molec. Nutr. Food Res*. 59(6): 1025-1040.
- WANG, J., HO, L., ZHAO, W., ONO, K., ROSENSWEIG, C., CHEN, L. H., HUMALA, N., TELOW, D. B. & PASINETTI, G. M. 2008. Grape-derived polyphenols prevent Aβ oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 28, 6388-6392.
- WANG, J., HO, L., ZHAO, Z., SEROR, I., HUMALA, N., DICKSTEIN, D. L., THIYAGARAJAN, M., PERCIVAL, S. S., TALCOTT, S. T. & PASINETTI, G. M. 2006. Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Aβ neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*, 20, 2313-2320.
- WEINREB, O., MANDEL, S., AMIT, T. & YODIM, M. B. H. 2004. Neurological mechanism of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 506-516.
- WEINREB, O., TAMAR, A., MANDEL, S. & YODIM, M. B. H. 2009. Neuroprotective molecular mechanisms of (2)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neurotrophic properties. *Genes Nutr*, 4, 283-296.
- WILLIS, L. M., SHUKLITT-HALE, B. & JOSEPH, J. A. 2009. Recent advances in berry supplementation and age-related cognitive decline. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 12, 91-94.
- WU, X., BEECHER, G. R., HOLDEN, J. M. & HAYTOWITZ, D. B. 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J. Agric. Food Chem*, 54, 4069-4075.
- YUAN, T., Ma, H., Liu W., Niesen, D., Shah, N., Crews, R., Rose, K., Vatter, D., Seeram, N. 2016. Pomegranate's Neuroprotective Effects against Alzheimer's Disease Are Mediated by Urolithins, Its Ellagitannin-Gut Microbial Derived Metabolites. *ACS Chem. Neurosci.*, 7(1): 26-33.
- ZBIKOWSKA, H. & OLAS, B. 2000. Antioxidants with carcinostatic activity (resveratrol, vitamin E and selenium) in modulation of blood platelet adhesion. *J Physiol Pharmacol*, 51, 513-520.
- ZHAO, L. X., CHEN, Q. & BRINTON, R. D. 2002. Neuroprotective and neurotrophic efficacy of phytoestrogens in cultured hippocampal neurons. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 509-519.

RESUMEN

Los polifenoles son metabolitos secundarios comunes en el reino vegetal; la farmacología de esta diversa familia de compuestos químicos ha sido ampliamente estudiada debido a su alto potencial biomédico y la abundancia de verduras y frutas. Entre las actividades farmacológicas atribuidas a los polifenoles naturales está la de ser: antioxidantes, anti-inflamatorios, antibacterianos, antihelmínticos, antidiabéticos, antienviejecimiento y neuroprotectores. Interesantemente, los recientes ensayos clínicos han confirmado, algunos de los sorprendentes -y a veces contradictorios- estudios farmacológicos realizados in vitro, especialmente los que se describen en polifenoles administrados por vía oral con efecto protector contra enfermedades metabólicas y neurológicas. En este artículo, también se centró la atención en un grupo de polifenoles racionalmente seleccionados reportados como moléculas preventivas contra Alzheimer prevalente y la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto, las relaciones mecanísticas y de estructura-actividad se analizan para antocianinas, equol, catequinas y el resveratrol. También nos hemos centrado en las limitaciones de los polifenoles naturales para ser absorbidos y alcanzar niveles plasmáticos significativos. En este artículo también se resume los últimos estudios sobre las transformaciones bioquímicas que sufren los polifenoles en el tracto intestinal inducidas por la microbiota intestinal. Pensamos que los futuros estudios sobre este último aspecto son la próxima frontera hacia la ampliación de los conocimientos actuales sobre el modo de acción de los compuestos derivados de plantas, y sus metabolitos, en la salud humana.

Palabras Claves: Polifenoles, Alzheimer, microbioma, metaboloma.

Rev. Farmacol. Chile (2016) 9 (1) 29-39

Recibido 14-03-2016; Revisado 15-04-2016; Aceptado 24-04-2016

ARTÍCULO ORIGINAL

**PROFILAXIS ANTIBIOTICA EN CIRUGIA ORAL. EXPERIENCIA EN LA CLINICA ODONTOLOGICA
UNIVERSIDAD DEL DESARROLLO-LA FLORIDA. PARTE I.**

(Antibiotic prophylaxis in patients undergoing oral surgery at the Clínica Universidad del
Desarrollo-La Florida. Part I).

**Verónica Schulte-Herbrüggen K.¹, Stefania Pedemonte V.¹, Fernando Gallardo R.², Marta Morales D.¹,
Teresa Pelissier S.^{1,2,*}**

¹Facultad de Medicina, Clínica Alemana Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile; ²Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM,
Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

RESUMEN

Es ampliamente aceptado el uso de una profilaxis antibiótica, ya sea con fines de prevenir una enfermedad (profilaxis médica) o infecciones postoperatorias después de ciertos procedimientos quirúrgicos (profilaxis quirúrgica), y cada cierto tiempo se imparten guías al respecto con el propósito de prevenir la creciente resistencia microbiana a los agentes quimioterapéuticos. En odontología existe una amplia gama de opiniones en relación a las indicaciones y la necesidad de la administración de profilaxis antibiótica.

El objetivo de este trabajo fue describir el uso de profilaxis antibiótica en una muestra de pacientes sometidos a exodoncias en el año 2013 en la Clínica UDD-La Florida, Santiago, Chile para evaluar si la profilaxis utilizada en dicha clínica coincide con los criterios internacionales y nacionales. Se analizaron 898 fichas clínicas electrónicas de pacientes sometidos a exodoncias para describir el uso o no de profilaxis antibiótica según criterios de indicación.

En un 76% se cumplió con los criterios internacionales y nacionales, sin embargo en un 14% de los pacientes hubo una innecesaria profilaxis, y en un 10% de los pacientes se efectuaron las atenciones sin una terapia antibiótica previa, aunque de acuerdo a estas normas debieron haberla recibido. La mayoría de las indicaciones cumple con los criterios de indicación de profilaxis antibiótica recomendados a nivel internacional y nacional, aunque se observa una leve tendencia a la sobreutilización.

Palabras Claves: profilaxis antibiótica; exodoncias; revisión de fichas; criterios de indicación

Rev. Farmacol. Chile (2016) 9 (1) 40-47

Recibido 09-05-2016; Revisado 09-05-2016; Aceptado 10-05-2016

1) INTRODUCCION

Clásicamente se ha considerado la profilaxis quirúrgica como la administración pre o perioperatoria de un antibiótico para la prevención de una complicación infecciosa local y/o sistémica y sus correspondientes consecuencias clínicas (Gutiérrez et al., 2006). Se usa con la finalidad de prevenir la posible aparición de infección a nivel de la herida quirúrgica, utilizando concentraciones antibióticas en sangre que impidan que los microorganismos proliferen y se diseminen a partir de la puerta de entrada que representa la herida quirúrgica

(Salmerón-Escobar y Del Amo-Fernández de Velasco, 2006). La profilaxis está indicada si existe un riesgo importante de infección, ya sea por las características mismas de la intervención quirúrgica o por las condiciones locales o generales del paciente. Entre los factores que van a determinar la posible aparición de la misma, destacan el tipo y tiempo de cirugía y el riesgo quirúrgico del paciente por su comorbilidad (Salmerón-Escobar y Del Amo-Fernández de Velasco, 2006).

Correspondencia a: Dra. Teresa Pelissier. UDD Santiago, (+56-2) 2327 9110 - Av. La Plaza 700, San Carlos de Apoquindo, Las Condes. Correo Electrónico: tpelissier@udd.cl

Existe una amplia gama de opiniones en relación a qué pacientes deben recibir profilaxis antibiótica antes de someterse a procedimientos dentales y esto conduce a que los odontólogos perciban la necesidad de contactarse con médicos para ser asesorados en este asunto (Lockhart et al., 2007). A pesar de numerosas directrices y años de recopilación de datos, el uso de la profilaxis antibiótica antes de procedimientos dentales sigue siendo controversial. Continúa existiendo desacuerdo sobre las indicaciones, la justificación, y el resultado de la utilización de diversos regímenes de profilaxis antibiótica. Esto se complica por la falta de datos que demuestran un impacto positivo o negativo en el cuidado de los pacientes. La comunidad odontológica se ha distanciado de un papel de liderazgo en esta controversia, basada en múltiples preocupaciones que incluyen temor a un litigio y a una incierta relación causa-efecto (Hossaini-Zadeh, 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) define que la mitad de los medicamentos se prescriben de forma inapropiada y que uno de los problemas frecuentes es el uso excesivo de antibióticos (OMS, 2010).

Debido al gran problema de la resistencia antimicrobiana, se está tratando de regular más el uso de los antibióticos. En este contexto se estudia la indicación adecuada de profilaxis antibiótica para los pacientes sometidos a procedimientos invasivos dentales (Lockhart et al., 2002). En 1998, el Standing Medical Advisory Committee (SMAC) publicó The Path of Least Resistance, un reporte sobre la resistencia antimicrobiana, en el que declaró que los dentistas representan el 7% de todas las prescripciones de los antimicrobianos. Esto significa que cada odontólogo podría prescribir 159 antibióticos al año, un promedio de tres recetas a la semana, lo que implica un mayor uso de antibióticos por los dentistas de lo que se podría pensar inicialmente (Sweeney et al., 2004). Dentistas alemanes en promedio prescribieron dos antibióticos por semana (Löffler et al., 2014). La relación entre el uso de antibióticos y la resistencia microbiana es compleja. Una reducción de la resistencia antimicrobiana sólo se puede lograr reduciendo significativamente el uso de antibióticos (Sweeney et al., 2004).

2) MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión de la literatura en la base de datos de la Biblioteca Facultad de Medicina Clínica Alemana Universidad del Desarrollo, Medline (PubMed y MeSH), Scielo y Google Académico utilizando las siguientes palabras claves: profilaxis antibiótica (antibiotic prophylaxis), indicación profilaxis antibiótica (prophylaxis indications), guías profilaxis antibiótica odontología (prophylactic guidelines dentistry), profilaxis en cirugía oral (prophylaxis in oral surgery). Se aplicaron los siguientes criterios de inclusión: artículos de tipo descriptivo, analítico

y experimental, revisiones sistemáticas y meta-análisis publicados a nivel internacional y nacional entre los años 2000-2014, realizados en humanos. Con los datos obtenidos de la revisión bibliográfica se establecieron los criterios de indicación profiláctica (Tabla 1).

Tabla 1

Inmunosupresión por enfermedad (VIH, SIDA), fármacos, trasplante o radioterapia
Artropatías inflamatorias: lúpus eritematoso, artritis reumatoidea
Hepatitis, TBC y otras enfermedades infectocontagiosas y portadores de ellas
Diabetes Tipo 1 y Tipo 2 descompensado
Alto riesgo de generar
1. Endocarditis infecciosa
- Válvulas protésicas o material protésico usado en válvulas cardíacas
- Historia previa de endocarditis infecciosa
- Condiciones cardíacas congénitas
- Trasplantados cardíacos que desarrollan una valvulopatía cardíaca
2. Infección de prótesis osteoarticular
Insuficiencias renal o hepática no controladas
Hemofílicos
Pacientes ASA I, II, III sometidos a exodoncias complejas

Criterios de Indicación de profilaxis

Los criterios de indicación de profilaxis antibiótica en pacientes sometidos a exodoncias de este estudio se basan en las pautas de la American Dental Association (ADA), American Heart Association (AHA), European Society of Cardiology (ESC), la Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, el "Documento de consenso sobre la utilización de profilaxis antibiótica en cirugía y procedimientos dentales" (Gutiérrez et al., 2006), publicado en España en el año 2006 y la Norma Técnica De Urgencia Odontológica, 2003 del MINSAL.

Se consideró correcta la administración de una dosis única preoperatoria con una de las posologías recomendadas por el MINSAL (Norma Técnica De Urgencia Odontológica, 2003) enumeradas en la Tabla 2.

Se realizó una revisión y un análisis de fichas clínicas de pacientes de la Clínica Universidad del Desarrollo (UDD)-La Florida para poder comparar si las prescripciones realizadas en este establecimiento coincidían con los criterios establecidos. Las fichas clínicas proporcionadas por la Clínica UDD-La Florida fueron de todas las asignaturas impartidas en la Clínica UDD La Florida durante

el año 2013, obteniendo un total de 36.770 fichas clínicas guardadas en el sistema computacional SMILE, que es un software especializado de fichas clínicas electrónicas para clínicas odontológicas universitarias. Se sometieron las 36.770 fichas clínicas a los siguientes criterios de inclusión: fichas clínicas de Pregrado Cirugía de 4to y 5to año y de Servicio Pabellón, pacientes entre 18 y 60 años. Aplicando los criterios de inclusión se obtuvo un total de 2.988 fichas clínicas. Estas fichas se revisaron ingresando en el sistema computacional SMILE, el código SMILE de la planilla proporcionada por la Clínica UDD-La Florida. Estas fichas a su vez se sometieron a criterios de exclusión. Se excluyeron las fichas clínicas que presentaban una o más de las siguientes características: fichas clínicas con información incompleta en la parte de la ficha electrónica, de notas de evolución, de la receta electrónica. Además se excluyeron fichas clínicas repetidas en la planilla proporcionada por la Clínica UDD-La Florida y pacientes atendidos en Servicio Pabellón, que no se sometieron a exodoncias, sino a otros procedimientos quirúrgicos (cirugías de implantes, biopsias, frenectomías etc.). Aplicando estos criterios de exclusión de las 2.988 revisadas se obtuvo un total de 898 fichas clínicas.

Tabla 2

Situación	Fármaco	Régimen
Profilaxis estándar general	Amoxicilina	Adultos 2,0 g; Niños 50 mg/Kg Oral, 1 hora antes del procedimiento
Imposibilidad de tratamiento oral	Ampicilina	Adultos 2,0 g; Niños 50 mg/Kg Intramuscular o intravenoso, 30 minutos antes del procedimiento
Alérgico a Penicilinas	Clindamicina	Adultos 600 mg.; Niños 20 mg/Kg (máximo 600 mg). Oral, 1 hora antes del procedimiento
	Azitromicina o Claritromicina	Adultos 500 mg.; Niños 15 mg/Kg Oral, 1 hora antes del procedimiento
Alérgico a penicilinas e imposibilidad de tratamiento oral	Clindamicina	Adultos 600 mg.; Niños 20 mg/Kg (máximo 600 mg). Intravenoso 30 min. antes del procedimiento

Antibiótico y Posología Correctas para Profilaxis según MINSAL

Se determinó la cantidad de pacientes que fueron sometidos a exodoncias con profilaxis antibiótica y si estaba indicada o no la profilaxis, pudiéndose evaluar de esta manera si la indicación estaba justificada o sobreindicada. Se entendió como sobreindicación la presencia de prescripción de antibióticos en ausencia de criterios establecidos y/o no cumplimiento de la dosis única preoperatoria recomendada por el MINSAL. Luego se determinó la cantidad de pacientes con exodoncias sin

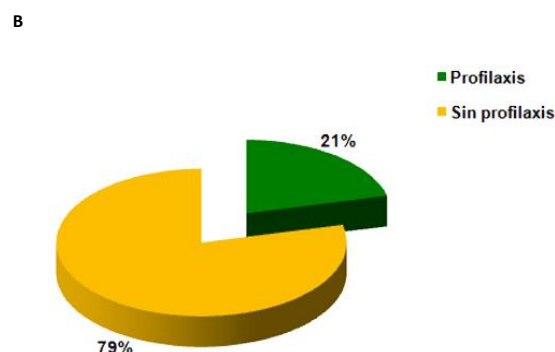
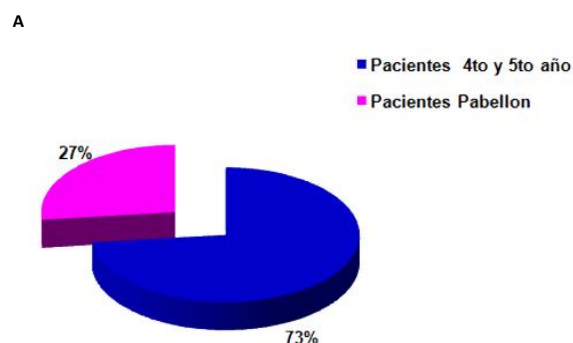
profilaxis antibiótica y se evaluó según criterios establecidos si correspondía administrar profilaxis, determinando una subindicación. Se entendió como subindicación la ausencia de prescripción de antibióticos en presencia de criterios establecidos. Finalmente se determinó el tipo de antibiótico que se prescribió y su posología para poder evaluar si las posologías coincidían con las recomendaciones internacionales y nacionales. Se realizó estadística descriptiva para variables cualitativas con tabulación y distribución de frecuencias absolutas y relativas. Los resultados se obtuvieron mediante el sistema computacional Excel (Microsoft 2013).

3) RESULTADOS

3.1) Cantidad de prescripciones

La muestra consistió en 898 pacientes, de los cuales en 4to y 5to año se atendieron 657 y en Servicio Pabellón 241 (Fig. 1A). Del total de pacientes, 190 recibieron prescripción profiláctica, concentrándose la mayor proporción en el tratante Servicio Pabellón (164). A 708 pacientes no se les hizo profilaxis antibiótica (Fig. 1B).

Figura 1



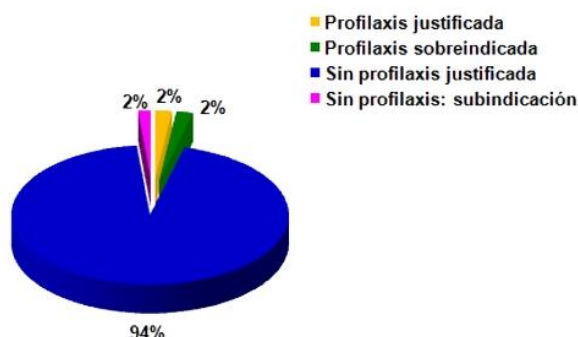
A: Distribución de los pacientes B: Total de pacientes atendidos

3.2) Profilaxis antibiótica y criterios de: sobre y subindicaciones

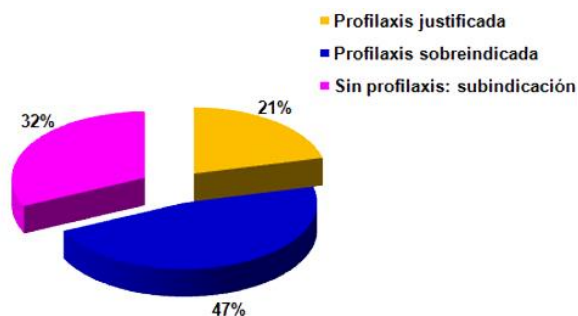
En 4to y 5to año de Pregrado Cirugía se atendieron 657 pacientes a los que se les realizó una exodoncia simple y 26 de ellos recibieron profilaxis antibiótica. La profilaxis estuvo indicada según criterios, en 13 pacientes mientras que en los otros 13 no se justificaba la administración de antibióticos profilácticos, por lo que un 50% de las prescripciones corresponden a sobreindicación. Los 631 pacientes restantes no recibieron profilaxis. Entre estos pacientes, 10 de ellos deberían haber recibido profilaxis por sus condiciones sistémicas según criterios, por lo que este grupo corresponde a subindicación (Fig 2A). Como resumen, del total de los pacientes atendidos en Cirugía 4to y 5to año a los que se les realizó exodoncias, un 96.5% de ellos cumplió con los criterios establecidos de administrar o no profilaxis antibiótica y sólo el 3.5% no lo cumplió.

Figura 2

A



B



A: Pacientes atendidos en 4to y 5to año B: Pacientes atendidos en Servicio Pabellón

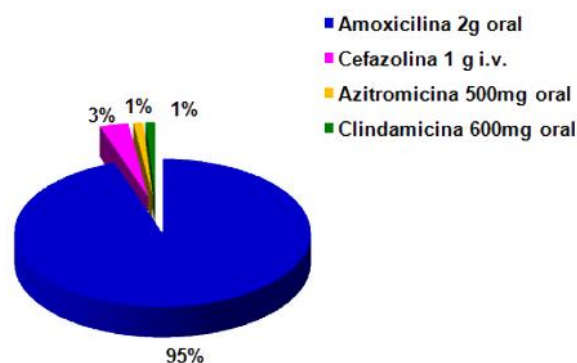
En Servicio Pabellón se atendieron 241 pacientes de los cuales 164 recibieron profilaxis antibiótica para exodoncias complejas: 51 de ellos recibieron una dosis única preoperatoria de antibióticos lo que se considera profilaxis correcta y 113 recibieron una dosis única preoperatoria más un tratamiento antibiótico de 7 días, lo que se consideró sobreindicación. Los 77 pacientes restantes, atendidos en Servicio Pabellón, necesitaban profilaxis de acuerdo a los criterios establecidos, y esta profilaxis antibiótica no se les indicó, por lo tanto se trató de subindicación de profilaxis (Fig. 2B). De esta manera de los 241 pacientes con exodoncias complejas, sólo un 21% de indicación de profilaxis cumplieron con los criterios establecidos y en un 79% estuvo sobre o subindicada.

Cuando se analiza el total de fichas, tomando en cuenta 4to y 5to año de Pregrado Cirugía más Servicio Pabellón, 76.3% de las indicaciones cumplieron con los criterios establecidos y 23.7% no lo hicieron.

3.3) Tipo de antibiótico prescrito

El antibiótico más utilizado fue la Amoxicilina con una posología de 2gr oral 1 hora antes del procedimiento, la que fue recetada en un 95% de los casos, seguida en un 3% por la cefazolina con una posología de 1gr endovenoso en el intraoperatorio. La azitromicina con una posología de 500mg oral 1h antes y la clindamicina con una posología de 600mg oral 1h antes se recetaron en un 1% respectivamente (Fig.3). Se prescribieron en total 180 recetas que coinciden con las recomendaciones del MINSAL lo que equivale a que un 94.7% de recetas fueron correctamente prescritas.

Figura 3



Antibiótico, y posología indicada como profilaxis

4) DISCUSIÓN

En la mayoría de las publicaciones se recomienda la antibioterapia pre- y postoperatoria solo en aquellos casos en que haya alto riesgo de infección o signos clínicos evidentes de infección (ADA, 2014; Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, 2001; Gould et al., 2006; Gutiérrez et al., 2006; Habib et al., 2009; Halling, 2014; Naber et al., 2007; Salmerón Escobar y Del Amo-Fernández de Velasco, 2006). En pacientes sanos la mayoría de los procedimientos en cirugía oral no requieren antibioterapia (Calvo et al., 2012; Marghalani, 2014; Siddiqi et al., 2010) y solo se debe emplear antibiótico profiláctico en casos de infección activa, pacientes con comorbilidad o inmunocomprometidos (Salmerón Escobar y Del Amo-Fernández de Velasco, 2006). Poeschl et al., (2004) concluyeron que el tratamiento profiláctico posterior a la remoción de los terceros molares inferiores no contribuye a un proceso de cicatrización mejor, a menos dolor o trismus y que no se pudieron prevenir problemas inflamatorios posteriores a la cirugía, por lo que no se recomienda el uso rutinario de profilaxis.

La evidencia disponible referida a que la profilaxis antibiótica parenteral, previene las infecciones en cirugía oral es escasa o inexistente. En consecuencia, una profilaxis antibiótica previa a la cirugía de terceros molares incluidos o semi incluidos en pacientes sanos es injustificada (Dar-Odeh et al., 2010), y es una medida bastante frecuente que puede contribuir a generar resistencia microbiana a los antibióticos. Incluso existe una publicación en el ámbito de la medicina que concluye que en pacientes a los que se les instala una prótesis articular no es necesaria la profilaxis antibiótica y que ésta sólo se deja a juicio del cirujano dependiendo de las circunstancias clínicas en las que se desarrolle la cirugía (Sollecito et al., 2015).

A favor de indicar profilaxis, existe una publicación que comparó la eficacia de la antibioterapia pre- y postoperatoria con placebo y que concluyó que la prevalencia de infección postquirúrgica fue mayor en el grupo de pacientes tratados con placebo que en el grupo de pacientes que recibió profilaxis pre- o postoperatoria (Gutiérrez et al., 2006). Un meta-análisis que solo consideró estudios randomizados y controlados sobre el uso de profilaxis antibiótica en la cirugía de tercer molar concluyó que la administración sistémica de antibióticos fue efectiva en reducir la frecuencia de alveolitis, sin embargo este estudio describe esta efectividad en base a la administración de antibióticos durante 2 a 7 días y cuando analiza una sola dosis antes a la cirugía esta profilaxis no fue diferente de los estudios sin profilaxis antibiótica (Reny Malmstrom, 2007).

Se puede decir en base a lo analizado que hay limitada evidencia que apoye la eficacia del uso habitual de antibióticos para prevenir complicaciones después de una exodoncia. Se necesitan estudios randomizados, controlados y doble-ciego, que tomen en cuenta los factores de riesgo conocidos y los resultados clínicos para llegar a un consenso final sobre la eficacia de los antibióticos administrados en forma profiláctica (Oomens y Forouzanfar, 2012).

Las opiniones de administrar o no profilaxis antibiótica no difieren solamente en el ámbito de la cirugía sino que también en otras especialidades como la implantología. Nolan et al. (2014) señalan que la administración de profilaxis antibiótica se vería justificada previamente a la cirugía de implantes, mientras que Tan et al. (2014) concluyen que la administración preoperatoria o postoperatoria de antibióticos no influye en menos complicaciones postoperatorias.

Lockhart et al. (2015) publicaron una carta al editor en la que indican que una solución a la disyuntiva de la eficacia de la profilaxis antibiótica para la prevención de la endocarditis infecciosa aún parece muy lejos y que se requiere más investigación y reflexión.

Se observó que un 76% de las decisiones tomadas por los tratantes de prescribir o no prescribir profilaxis antibiótica fueron justificadas; es decir que la mayoría de los tratantes indicaron de manera adecuada la profilaxis antibiótica y también supieron cuando no indicarla. Las indicaciones que no cumplen con los criterios establecidos corresponden a un 24% de los pacientes, concentrándose la mayor proporción de indicaciones incorrectas en la sobreindicación y en el Servicio Pabellón. Este resultado se explica porque en Servicio Pabellón 113 pacientes además de recibir el antibiótico en forma profiláctica recibieron tratamiento antibiótico de 7 días que se consideró como incumplimiento de los criterios establecidos. El tipo de procedimiento más complejo justifica el uso de profilaxis antibiótica según la literatura, el uso de profilaxis y tratamiento en conjunto no se ve justificado. Debido a que el tratamiento antibiótico se consideró como incorrecto, se llegó al resultado de tener del total de prescripciones realizadas (164) un 69% de sobreindicaciones en Servicio Pabellón. Según los criterios establecidos previamente también se consideró como incorrecta la no prescripción de profilaxis antibiótica, ya que la exodoncia compleja es un procedimiento de mayor dificultad en el cual la profilaxis antibiótica estaría justificada, sin embargo esta aseveración es discutible, ya que dependiendo del autor se justifica la utilización y también la no utilización de antibióticos profilácticos en pacientes ASA I.

En este estudio se observó que en Servicio Pabellón se indicaron profilaxis antibiótica sola, profilaxis antibiótica en conjunto con tratamiento antibiótico y únicamente tratamiento antibiótico. Se consideró como indicación correcta el uso de profilaxis antibiótica en una dosis única preoperatoria por lo que una gran cantidad de prescripciones quedaron clasificadas como incorrectas.

En un 95% de los casos el antibiótico prescrito fue la amoxicilina con una posología de 2gr, una hora antes del procedimiento que cumple con los criterios establecidos previamente. El MINSAL recomienda como profilaxis general estándar este antibiótico y esta posología. La cefazolina no está recomendada por el MINSAL, pero si se menciona en la literatura internacional como alternativa a la ampicilina (Naber et al., 2007).

Al analizar la literatura hay una mayor tendencia a recomendar la administración de profilaxis antibiótica preoperatoria que profilaxis o tratamiento postoperatorio, aunque no hay una tendencia clara. No se encontró evidencia que justifique la administración de profilaxis preoperatoria en conjunto con un tratamiento antibiótico de 7 días como se realizó en Servicio Pabellón.

El estudio realizado demostró que la mayor parte de las indicaciones incorrectas se debían a un sobreuso. La literatura proporciona evidencia de que se realizan prescripciones inadecuadas por los cirujano-dentistas. Esto se debe a una serie de factores que van desde el desconocimiento del profesional hasta factores sociales. Un estudio realizado en 2010 en Jordania investigó el patrón de uso de antibióticos por los dentistas en todo el mundo, llegando a la conclusión de que, las prácticas de prescripción de los dentistas, son inadecuadas reflejándose en una sobreutilización (Gour et al., 2013). Un estudio realizado en Australia concluyó que los dentistas en general tienen conocimientos adecuados con respecto a la prescripción de antibióticos, sin embargo al mismo tiempo tienen una tendencia hacia la prescripción excesiva de ellos (Jaunay et al., 2000). Los pocos estudios realizados en países desarrollados informaron de un abuso de antibióticos profilácticos con el fin de prevenir la infección postoperatoria tras procedimientos dentales quirúrgicos, para cubrir defectos de la técnica aséptica o por equipos mal esterilizados. Por lo tanto se practica un principio "antibióticos por si acaso" (Dar-Odeh et al., 2010). La prescripción excesiva de antibióticos frecuentemente se basa en factores no clínicos: la expectativa del paciente, la conveniencia y la demanda legal, que obviamente se consideran razones no científicas para la prescripción de antibióticos (Dar-Odeh et al., 2010).

La administración profiláctica de antibióticos debe ser lo más racional posible. Se vería justificada cuando existe un compromiso sistémico del paciente que amerite su uso o cuando la complejidad del procedimiento sea mayor. Se

recomienda la administración de un antibiótico preoperatorio en dosis única. Los organismos más reconocidos a nivel internacional siguen siendo la AHA y la ADA, por lo que se sugiere seguir sus indicaciones. Debido al problema de la resistencia antibiótica se sugiere restringir el uso de antibióticos en la práctica odontológica al mínimo posible (Dar-Odeh et al., 2010).

5) CONCLUSIONES

Las prescripciones de profilaxis antibiótica en la Clínica UDD-La Florida en el año 2013 cumplen en la mayoría con los criterios de indicación, aunque se observa un leve sobreuso. La sobreutilización de antibióticos en odontología es una tendencia que se observa a nivel mundial y que necesita ser estudiada ya que tiene un impacto que excede el ámbito de la salud dental. Los últimos estudios parecen evitar el uso de antibióticos profilácticos en odontología a no ser que haya una indicación precisa. Aparentemente el uso inapropiado de antibióticos y la resistencia antibiótica son de mayor relevancia que los beneficios que podría otorgar la profilaxis. Se necesitan estudios randomizados, bien diseñados y de alta calidad, que tomen en cuenta los factores de riesgo conocidos y los resultados clínicos para llegar a un consenso final sobre la eficacia de los antibióticos administrados en forma profiláctica.

AGRADECIMIENTOS:

A la Clínica UDD-La Florida por brindarnos las fichas clínicas del año 2013 para la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA:

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. 2001. Prescription des antibiotiques en odontologie et stomatologie : recommandations et argumentaire. <http://afssaps.sante.fr/>.
- American Dental Association. 2014. Antibiotic Prophylaxis. <http://www.ada.org/en/member-center/oral-health-topics/antibiotic-prophylaxis>.
- Calvo A.M., Brozoski D.T., Giglio F.P., Gonçalves P.Z., Sant'ana E., Dionísio T.J., Lauris J.R., Santos C.F. (2012) Are antibiotics necessary after lower third molar removal? Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. 114(5 Suppl), S199-208.
- Dar-Odeh N.S., Abu-Hammad O.A., Al-Omri M.K., Khraisat A. S., Shehabi A.A. (2010) Antibiotic prescribing practices by dentists: a review. Ther Clin Risk Manag, 21, 301-306.
- Gould F.K, Elliot T.S.J., Foweraker J., Fulford M., Perry J.D., Roberts G.J., Sandoe J.A.T., Watkin R.W. (2006) Guidelines for the prevention of endocarditis: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. J Antimicrob Chemother. 57, 1035-1042.

- Gour P.R., Kohli S., Advani U., Kulshreshtha S., Jain A., Parakh R. (2013) Prescription pattern of antimicrobial agents by dental practitioners: a questionnaire based study. *Int J Basic Clin Pharmacol.* 2, 311-314.
- Gutiérrez J.L., Bagán J.V., Bascones A., Llamas R., Llena J., Morales A. et al. (2006) Consensus document on the use of antibiotic prophylaxis in dental surgery and procedures. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 11, E188- E205.
- Habib G., Hoen B., Tornos P., Thuny F., Prendergast B., Vilacosta I., Moreillon P., Antunes M., Thilen U., Lekakis J., Lengyel M., Muller L., Naber C.K., Nihoyannopoulos P., Moritz A., Zamorano J.L. (2009) Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur Heart J.* 30, 1-45.
- Halling F. (2014) Antibiotika in der Zahnmedizin, *Zahnmedizin up2date*, 8, 67-82.
- Hossaini-Zadeh M. (2016) Current Concepts of Prophylactic Antibiotics for Dental Patients. *Dent Clin North Am.* 60:473-82.
- Jaunay T., Sambrook P., Gos A. (2000) Antibiotic prescribing practices by South Australian general dental practitioners. *Aust Dent J.* 45, 179-186.
- Lockhart P.B., Bahrani Mougeot FK, Saunders SE, Brennan MT. (2015) The effectiveness of antibiotic prophylaxis in preventing infective endocarditis is not easily dismissed. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 5, 661-662
- Lockhart P.B., Brennan M.T., Fox P.C., Norton H.J., Jernigan D.B., Strausbaugh L.J. and Infectious Diseases Society of America Emerging Infections Network. (2002) Decision-Making on the Use of Antimicrobial Prophylaxis for Dental Procedures: A Survey of Infectious Disease Consultants and Review. *Clin Infect Dis.* 34, 1621-1626.
- Lockhart P.B., Loven B., Brennan M.T., Fox P.C. (2007) The evidence base for the efficacy of antibiotic prophylaxis in dental practice. *J Am Dent Assoc.* 138, 458-474.
- Löffler C., Böhmer F., Hornung A., Lang H., Burmeister U., Podbielski A., Wollny A., Kundt G., Altner A. (2014) Dental care resistance prevention and antibiotic prescribing modification-the cluster-randomised controlled DREAM trial. *Implement Sci.* 9, 27.
- Marghalani A. (2014) Antibiotic prophylaxis reduces infectious complications but increases adverse effects after third-molar extraction in healthy patients. *J Am Dent Assoc.* 145, 476-478.
- MINSAL. Norma Técnica De Urgencia Odontológica. 2003. <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7f2a6ebf9b5c1580e04001011e014d0e.pdf>
- Naber C.K., Al-Nawas B., Baumgartner H., Becker H.J., Block M., Erbel R., Ertl G., Flückinger U., Franzen D., Gohlke- Bärwolf C., Gattringer R., Handrick W., Herrmann M., Heyding R., Horskotte D., Jaussi A., Kern P., Kramer H.H., Kühl et al. (2007) Prophylaxe der infektiös en Endokarditis. *Der Kardiologe* 1, 243-250.
- Nolan R., Kemmoona M., Polyzos I., Claffey N. (2014) The influence of prophylactic antibiotic administration on postoperative morbidity in dental implant surgery. A prospective double blind randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 25, 252-259.
- Oomens M.A., Forouzanfar T. (2012) Antibiotic prophylaxis in third molar surgery: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 114, e5-12.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). Medicamentos: uso racional de los medicamentos. Nota descriptiva N.º 338. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs338/es/>
- Poeschl P.W., Eckel D., Poeschl E. (2004) Postoperative prophylactic antibiotic treatment in third molar surgery--a necessity? *Int J Oral Maxillofac Surg.* 62, 3-8.
- Ren Y.F., Malmstrom H.S. (2007) Effectiveness of antibiotic prophylaxis in third molar surgery: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 65, 1909-1921.
- Salmerón- Escobar J.I., Del Amo-Fernández de Velasco A. (2006) Antibiotic prophylaxis in Oral and Maxillofacial Surgery. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 11, E292-296.
- Siddiqi A., Morkel J.A., Zafar S. (2010) Antibiotic prophylaxis in third molar surgery: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial using split-mouth technique. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 39, 107-114.
- Sollecito T.P., Abt E., Lockhart P.B., Truelove E., Paumier T.M., Tracy S.L., Tampi M., Beltrán-Aguilar E.D., Frantsve-Hawley J. (2015) The use of prophylactic antibiotics prior to dental procedures in patients with prosthetic joints: Evidence-based clinical practice guideline for dental practitioners--a report of the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc.* 146, 11-16.e8
- Sweeney L., Dave J., Chambers P., Heritage J. (2004) Antibiotic resistance in genera dental practice-a cause for concern? *J Antimicrob Chemother.* 53, 567-576.
- Tan W.C., Ong M., Han J., Mattheos N., Pjetursson B., Tsai A.Y., Sanz I., Lang N. P. (2014) Effect of systemic antibiotics on clinical and patient-reported outcomes of implant therapy- a multicentre randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 25, 185-193.

ABSTRACT

There is a wide range of opinions regarding the indications and the need for antibiotic prophylaxis in dentistry. In the last years different guidelines regarding antibiotic prophylaxis were published to prevent the growing antimicrobial resistance. The aim of this study was to describe the use of antibiotic prophylaxis in a sample of patients undergoing tooth extractions in 2013 at Clínica Universidad del Desarrollo-La Florida, Santiago, Chile to evaluate if prophylaxis used in this clinic matches international and national standards. 898 electronic medical records of patients undergoing tooth extractions were analyzed to describe the use or not of antibiotic prophylaxis. 76% matched international and national standards, however 14% of patients received an unnecessary prophylaxis, and 10 % of the patients were treated without prior antibiotic therapy, although according to the international and national standards they should have received it. Most indications matched the international and national criteria, although a slight tendency to overuse was observed.

Keywords: Antibiotic prophylaxis, tooth extractions, medical records, indication criteria

Rev. Farmacol. Chile (2016) 9 (1) 40-47

Received 09-05-2016; Revised 09-05-2016; Accepted 10-05-2016

ARTÍCULO ORIGINAL

**PRESCRIPCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN CIRUGÍA ORAL. EXPERIENCIA EN LA CLÍNICA ODONTOLÓGICA
UNIVERSIDAD DEL DESARROLLO-LA FLORIDA. PARTE II.**

(Antibiotic prescription in oral surgery patients at the Universidad del Desarrollo-La Florida Clinic.
Part II)

**Stefania Pedemonte V.¹, Verónica Schulte-Herbrüggen K.¹, Fernando Gallardo R.², Teresa Pelissier S.^{1,2},
Marta Morales D.^{1,*}**

¹Facultad de Medicina, Clínica Alemana Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile; ²Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue analizar la prescripción de antibióticos en pacientes con infecciones odontogénicas sometidos a exodoncias, en la Clínica Universidad del Desarrollo-La Florida durante el año 2013, y comparar la indicación de antibioterapia con normas internacionales y nacionales. En un estudio observacional, descriptivo y longitudinal, se examinaron un total de 655 fichas clínicas de los pacientes atendidos en Cirugía de cuarto y quinto año de Odontología. Los datos recolectados se analizaron según: sexo, clínica de atención, estado sistémico de los pacientes, presencia o ausencia de infección odontogénica, tipo de infección odontogénica, prescripción o no de antibióticos frente a una infección odontogénica, tipo de antibiótico y posología prescrita en pacientes sometidos a exodoncias. A partir de esta muestra inicial de 655 fichas, un total de 50 pacientes solicitaron tratamiento debido a infecciones dentales, y la exodoncia se efectuó bajo anestesia local, como parte del tratamiento. De esta muestra de 50 pacientes, se indicó una terapia antimicrobiana en 10 de ellos. El esquema antibiótico más prescrito fue amoxicilina 1000 mg cada 12 horas, durante 7 días. Se demostró un cuidadoso uso de antibióticos en los pacientes atendidos, y el esquema utilizado concuerda con las recomendaciones emanadas del Ministerio de Salud (MINSAL), aunque no concuerda en su totalidad con aquellos propuestos por entidades internacionales.

Palabras Claves: Infección Odontogénica, Exodoncias, Antibióticos, Amoxicilina.

Rev. Farmacol. Chile (2016) 9 (1) 48-53

Recibido 09-05-2016; Revisado 09-05-2016; Aceptado 10-05-2016

1) INTRODUCCIÓN

Los antibióticos han sido de gran utilidad para disminuir la morbilidad y mortalidad de las infecciones bacterianas. Según los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2007), las infecciones odontogénicas (IOs) son las más prevalentes a nivel mundial y constituyen el primer motivo de consulta en la atención dental (Moreno Villagrana y Gómez Clavel, 2012), siendo una de las principales razones por las que se prescribe antibióticos en odontología.

A nivel mundial existe conciencia sobre el uso de antibióticos en la práctica odontológica. Se estima que en España las IOs representan alrededor del 10 a un 12% de las prescripciones de antibióticos (González-Martínez et al., 2012; Robles Raya et al., 2013; Gallego Rodríguez, 2015). En Alemania, al comparar las cifras absolutas de las prescripciones de antibióticos en la atención primaria, los odontólogos generales se encuentran en el cuarto lugar, después los médicos generales, internistas y pediatras (Löffler et al., 2014). Según la Asociación Dental Británica (British Dental Association, 2004), el número de

prescripciones realizadas, correspondería a un promedio de tres recetas a la semana por odontólogo británico, lo que implica un mayor uso de antibióticos de lo que se pensaba inicialmente (Sweeney et al., 2004).

Las IOs son cuadros infecciosos que se originan en las estructuras dentarias y periodontales, y son la principal causa de atención de urgencia en la consulta dental. Las IOs más comunes son: absceso periapical (25%), pericoronaritis (11%) y absceso periodontal (7 a 14%) (López-Píriz et al., 2007; Rodríguez-Alonso y Rodríguez-Monje, 2009).

El tratamiento de las IOs se basa en eliminar la causa, a través de un tratamiento mecánico-quirúrgico. La antibioterapia que tiene por objetivo reducir la inoculación bacteriana y evitar la diseminación de la infección (Robles Raya et al., 2013), es utilizada como coadyuvante en el tratamiento de las infecciones, y no siempre está indicado su uso.

Correspondencia a: Dra. Marta Morales. UDD Santiago, (+56-2) 2327 9110 - Av. La Plaza 700, San Carlos de Apoquindo, Las Condes. Correo Electrónico: martamorales@udd.cl

La elección del antibiótico se basa en su actividad sobre las bacterias causantes de tales infecciones, y habitualmente se efectúa un tratamiento empírico basado en criterios epidemiológicos.

Aún no existe un consenso en el tratamiento de las infecciones odontológicas agudas (Rastenié R. et al., 2015; Robles Raya et al., 2013). Los antibióticos deberían prescribirse como tratamiento complementario y en situaciones particulares. En general las IOs más comunes tales como pulpitis y periodontitis apical, sólo requieren un tratamiento mecánico-quirúrgico, sin embargo, existen pocos estudios basados en la evidencia que indiquen en que situación clínica deberían prescribirse estos fármacos, a que dosis y cuánto tiempo debería durar el tratamiento. Por otra parte, la sobreutilización de antibióticos tiene un impacto que excede el ámbito de salud dental, ya que las bacterias intercambian mecanismos de resistencia (Barrientos Sánchez et al., 2015; Granizo et al., 2006; Macías et al., 2012) y se ha demostrado, por ejemplo, que la detección de *streptococcus pneumoniae* resistente, aumenta en las personas que han recibido recientemente un tratamiento antimicrobiano (Macías et al., 2012). En el presente trabajo, se describe la utilización de antibióticos frente a infecciones odontogénicas en pacientes sometidos a exodoncias en la Clínica Universidad del Desarrollo (UDD)-La Florida durante el año 2013.

2) MATERIALES Y METODOS

Se realizó una revisión de la literatura en la base de datos de la Biblioteca Facultad de Medicina Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo, Medline (PubMed y MeSH), Scielo y Google Académico utilizando las siguientes palabras claves: Infección odontogénica (Odontogenic infection, Dental infection), Microbiología Oral (Oral Microbiology), Prescripción antibiótica (Antibiotic prescription) y Resistencia antibiótica (Antibiotic resistance). Los artículos obtenidos se sometieron a un análisis crítico aplicando los criterios de inclusión y exclusión establecidos.

Los criterios de inclusión fueron: artículos de tipo experimental, descriptivo y analítico tanto como revisiones sistemáticas y meta-análisis publicados a nivel internacional entre el año 2000 y 2016, y a nivel nacional entre los años 1990 y 2016 (se incluyó desde 1990 ya que hay escasas publicaciones nacionales) realizados en humanos. Se excluyeron aquellas publicaciones que impliquen estudios en animales, estudios publicados antes de las fechas citadas y que involucren la práctica endodóntica y periodóntica en odontología. De los artículos analizados se evaluaron una serie de datos relevantes para la revisión, tales como: infección odontogénica, indicación y tipo de antibiótico, dosis y

duración del tratamiento y cepas bacterianas presentes y resistentes.

Luego se realizó la revisión y análisis de fichas clínicas de pacientes de la Clínica UDD-La Florida atendidos en el año 2013 para poder comparar si las prescripciones realizadas en este establecimiento coinciden con las indicaciones recomendadas por los protocolos farmacológicos internacionales y por la guía nacional (guía MINSAL, 2011). Se realizó un estudio observacional, descriptivo y longitudinal. La información se obtuvo a partir de las fichas clínicas de estos pacientes, previa autorización de la institución.

La información fue entregada en una planilla Excel en la que se especifican: nombre del paciente, código SMILE (software para crear y almacenar fichas clínicas electrónicas de pacientes atendidos en la UDD, el que presenta un código único), edad, clínica de atención, fecha de atención y tratante del paciente. Se obtuvo un total de 36.770 fichas clínicas de pacientes guardadas en el sistema computacional SMILE en el año 2013 para su análisis.

Con este total de fichas, debido a la gran utilización de antibióticos en la práctica quirúrgica se establecieron ciertos criterios de inclusión que fueron: fichas clínicas de la asignatura de Cirugía de Pre Grado de cuarto y quinto año 2013, asignatura de carácter docente asistencial, donde los alumnos realizan los tratamientos; y solo se incluyeron pacientes entre 18 y 60 años. Aplicando los criterios de inclusión, del total de fichas revisadas se mantuvieron para el trabajo un total de 1.510 fichas clínicas.

De estas 1.510 fichas clínicas, se excluyeron aquellas con información incompleta en la ficha electrónica en datos como diagnóstico, estado sistémico del paciente (ASA) y tratamiento indicado; fichas clínicas con información incompleta en la parte de las notas de evolución; fichas de pacientes con estado sistémico ASA III y pacientes que no se realizaron las exodoncias porque no aceptaron tratamiento y/o presupuesto.

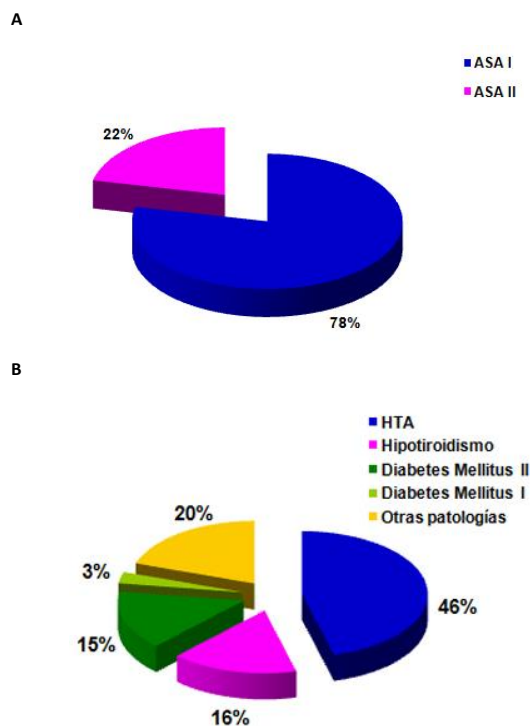
Aplicando estos criterios se conservó un total de 655 fichas clínicas, las que fueron analizadas. Los datos recolectados se analizaron según: sexo, clínica de atención, estado sistémico de pacientes: ASA I y ASA II (MINSAL, 2010), presencia o ausencia de infección odontogénica, tipo de infección odontogénica, si el odontólogo prescribe o no tratamiento antibiótico frente a una IO, tipo de antibiótico y posología prescrita. Los resultados se recopilaron y analizaron en una planilla Excel (Microsoft Office 2013).

3) RESULTADOS

De las 655 fichas clínicas analizadas, 457 fichas correspondieron a la clínica de Pre Grado de Cirugía de Cuarto año (70%) y 198 fichas a la de Quinto año (30%). Un total de 240 fichas correspondieron a pacientes de sexo masculino (37%) y 415 fichas a pacientes de sexo femenino (63%).

En relación al estado sistémico de los 655 pacientes atendidos, 514 pacientes fueron ASA I y 141 pacientes ASA II (Fig. 1A). En los pacientes ASA II, la enfermedad sistémica más frecuente fue la Hipertensión Arterial (79 pacientes, de los cuales 55 tenían sólo HTA y 24 pacientes con otra patología asociada), seguida de Diabetes (31 pacientes, 5 con Tipo I: 3 pacientes sólo diabetes Tipo I y 2 pacientes asociada a otra patología, y 26 con Tipo II: 13 sólo diabetes Tipo II y 13 con otra patología) y de Hipotiroidismo (28 pacientes: 18 sólo hipotiroidismo y 10 con otra patología asociada). Las otras enfermedades que no incluyen ninguna de las anteriores representan el 20% del total y entre ellas se encontró Hipertiroidismo, Artritis Reumatoide, Osteoartritis, Valvulopatía Congénita, Trombosis, Gastritis Crónica, Pre Infarto, Síndrome de Down, Epilepsia, Anemia, Depresión y Obesidad (Fig. 1B).

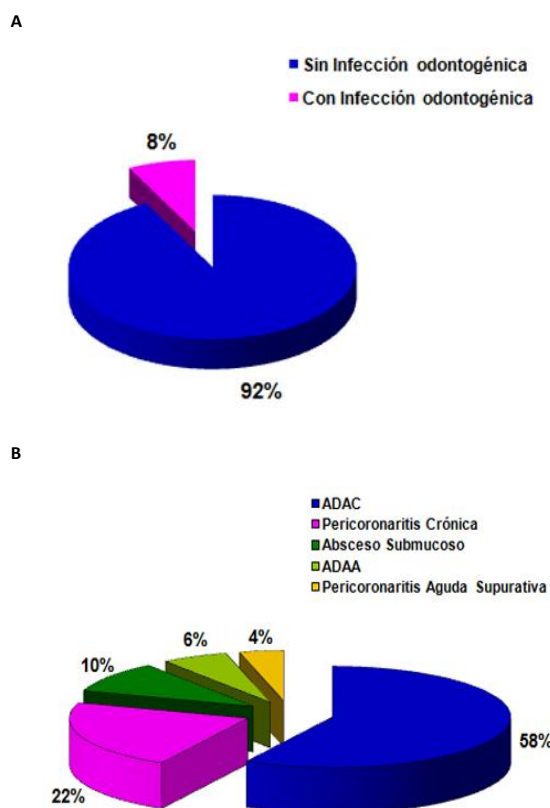
Figura 1



A: Estado sistémico de los 655 pacientes atendidos sometidos a exodoncia.
B: Patologías presentes en los 141 pacientes con estado sistémico ASA II

Del total de las fichas revisadas, sólo 50 pacientes presentaron infecciones odontogénicas (Fig. 2A), las que correspondieron en 29 pacientes a Absceso Dentoalveolar Crónico (ADAC), patología más frecuente. La segunda infección más frecuente fue la Pericoronaritis Crónica en 11 pacientes, seguida del Absceso Submucoso en 5, Absceso Dentoalveolar Agudo (ADAA) en 3 pacientes y la Pericoronaritis Aguda con 2 casos (Fig. 2B).

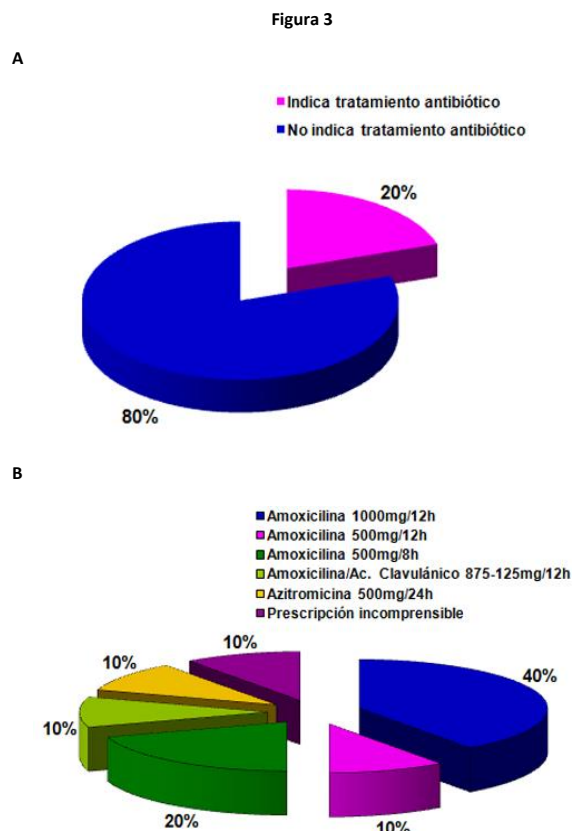
Figura 2



A: Presencia de infección odontogénica en los pacientes sometidos a exodoncia. B: Tipo de infecciones presentes

De los 50 pacientes con IOs, en 10 pacientes el tratante indicó tratamiento antibiótico y en 40 no se indicó luego de realizar la exodoncia (Fig. 3A). Del total de 10 prescripciones de tratamiento antibiótico, 4 prescripciones fueron de amoxicilina comprimidos 1000mg cada 12 horas, 2 prescripciones de amoxicilina comprimidos 500mg cada 8 horas, 1 prescripción para amoxicilina comprimidos 500mg cada 12 horas, 1 para amoxicilina/ácido clavulánico comprimidos 875/125mg cada 12 horas, 1 para azitromicina comprimidos 500mg cada 24 horas (paciente alérgico a penicilinas), y por último, 1 prescripción con error de escritura (Fig 3B). En relación a la duración del

tratamiento antibiótico, 9 tratamientos fueron indicados por 7 días (90%) y 1 tratamiento por 6 días (10%).



A: Indicación de antibióticos en las infecciones odontogénicas. B: Tipo de antibióticos prescritos.

4) DISCUSIÓN

El presente estudio comprendió una muestra final de 655 fichas clínicas de pacientes sometidos a exodoncia, atendidos en cirugía de pregrado; donde 50 de ellos presentaron infección odontogénica y sólo a 10 de ellos se les prescribió tratamiento antibiótico.

En la literatura, se han publicado varios trabajos en relación a la prescripción de antibióticos frente a una infección odontogénica y al uso racional de estos. El tratamiento de las IOs se basa en eliminar el factor etiológico a través de un tratamiento mecánico-quirúrgico, sin embargo, en algunas ocasiones es necesario utilizar tratamiento antibiótico como tratamiento complementario (MINSAL, 2011). Se sostiene que las indicaciones para la prescripción de antibióticos frente a una infección odontogénica son: signos y síntomas de compromiso sistémico, compromiso de espacios anatómicos profundos

y enfermedades sistémicas que afecten al sistema inmune (Ellison, 2009; López-Píriz et al., 2007; MINSAL, 2011).

Usualmente el odontólogo prescribe de forma empírica, basándose en datos epidemiológicos clínicos y bacterianos, de los microorganismos responsables del proceso infeccioso que sospecha, y el tratamiento se decide sobre una base presuntiva (Gallego Rodríguez, 2015; Poveda Roda et al., 2007). La indicación incorrecta y el uso de dosis y/o duración inadecuada de antibioterapia, contribuye directamente en el aumento de la resistencia de antibióticos. Ya se ha visto que algunos microorganismos son resistentes a antibióticos que comúnmente utilizamos en nuestra práctica odontológica. Este es el caso de antibióticos del grupo betalactámicos y macrólidos (Granizo et al., 2006; Poveda Roda et al., 2007; Prieto Prieto y Calvo, 2004; Robertson y Smith, 2009; Sweeney et al., 2004) y clindamicina (Granizo et al., 2006; Prieto Prieto y Calvo, 2004).

Al analizar los resultados obtenidos se observó una correcta utilización en cuanto al tipo de antibiótico, dosis y duración. El antibiótico de primera elección fue la amoxicilina, lo que concuerda con lo sugerido en la guía clínica nacional MINSAL, 2011. Sin embargo, la guía nacional sugiere utilizar comprimidos de 500mg cada 8 horas y la dosis más utilizada por los tratantes fue comprimidos de 1000mg cada 12 horas, esto puede deberse a que esta posología es más cómoda para los pacientes y previene la omisión del tratamiento. La duración del tratamiento más indicada fue la de 7 días, lo que concuerda con la guía nacional. (MINSAL, 2011)

Al evaluar estos resultados con las recomendaciones internacionales, estos difieren en el antibiótico de primera elección y en la duración del tratamiento. Las guías farmacológicas internacionales sugieren el uso de amoxicilina/ácido clavulánico como primera elección frente a IOs (Bascones et al., 2004; Isla et al., 2004; López-Píriz et al., 2007; Murillo, 2003), en base al incremento en la prevalencia de microorganismos productores de betalactamasas (Bascones et al., 2004). La asociación de amoxicilina/ácido clavulánico aumenta el espectro, siendo efectiva también frente a bacilos Gram negativo (Lodi et al., 2009). Por otra parte, Velasco y Soto (2012) sugieren la clindamicina, el metronidazol, la eritromicina o la claritromicina, en pacientes alérgicos a la penicilina. En cuanto a la duración del tratamiento antibiótico no se ha llegado a un consenso. Ellison (2009), Matijević et al. (2009) y Vicari et al. (2014) sugieren discontinuar el tratamiento luego de que desaparezcan los signos de infección, por lo tanto, el tratamiento antimicrobiano puede durar entre dos a tres días. Se ha demostrado que tratamientos prolongados pueden destruir la homeostasis de la micro flora oral y provocar un crecimiento excesivo de microorganismos resistentes (Ellison, 2009; Palmer et al., 2000).

En general, este estudio demostró que los alumnos de pregrado de odontología y odontólogos de Clínica UDD-La Florida son conscientes de las indicaciones y han utilizado prudentemente los antibióticos como tratamiento complementario para las IOs. Asimismo, se demostró que utilizan el antibiótico y su posología de manera similar a lo indicado en la guía nacional MINSAL y menos a las recomendaciones internacionales.

La limitante más importante fue la falta de información en las fichas clínicas, lo que contribuyó a que se tuviera que excluir más de la mitad de las fichas. No obstante, estos resultados nos informan sobre la situación actual de la prescripción de tratamiento antibiótico frente a IOs por estudiantes de pregrado de Odontología y odontólogos de la Clínica UDD-La Florida. Otra limitante fue que en las fichas clínicas no se proporcionaba información sobre el estado bucal del paciente y si este había utilizado antibióticos previo a la consulta. Esta información podría haber ayudado a la comprensión de por qué algunos odontólogos indicaban tratamiento antibiótico frente a IOs.

El presente trabajo muestra la utilización del tratamiento antibiótico frente a una IO. Esta información sirve como referencia para futuros estudios. A nivel nacional es necesario desarrollar nuevos estudios sobre bacterias odontogénicas predominantes en las IOs, aparición de bacterias odontogénicas resistentes a antibióticos y efectividad de los antibióticos.

AGRADECIMIENTOS

A la Clínica UDD-La Florida por brindarnos las fichas clínicas del año 2013 para la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA:

- Barrientos Sánchez S., Serna Varona F.S., Díez Ortega H. y Rodríguez Cíodaro A. (2015) Resistencia a la amoxicilina de cepas *Streptococcus mutans* aisladas de individuos con antibioterapia previa y sin esta. *Universitas Odontologica* 34, 101-106.
- Bascones A., Aguirre J.M., Bermejo A., Blanco A., Gay-Escoda, C., González-Moles, M.A. et al. (2004) Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogénicas. *Med Oral Patol Oral Cir. Bucal* 9, 363-376.
- Ellison S.J. (2009) The role of phenoxymethylpenicillin, amoxicillin, metronidazole and clindamycin in the management of acute dentoalveolar abscesses - a review. *Br Dent J* 206, 357-362.
- Gallego Rodríguez C.R. (2015) Preferencias de prescripción de antibióticos ante infecciones odontológicas bacterianas por estomatólogos. *Rev Ciencias Médicas* 21, 599-605.
- González-Martínez R., Cortell-Ballester I., Herráez-Villas J.M., Arnau-de Bolós J.M., y Gay-Escoda C. (2012) Antibiotic prescription in the treatment of odontogenic infection by health professionals: A factor to consensus. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 17, e452-456.

- Granizo J.J., Giménez M.J., Bascones A., y Aguilar L. (2006) Impacto ecológico del tratamiento antibiótico de las infecciones odontológicas. *Rev Esp Quimioter* 19, 14-20.
- Isla A., Canut A., Rodríguez-Gascón A., Labora A., Ardanza-Trevijano B., Solinis M., et al. (2005) Análisis farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) de la antibioterapia en odontoestomatología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23, 116-21.
- Lodi K.B., Carvalho L.F., Koga-Ito C.Y., Carvalho V.A. y Rocha R.F. (2009) Rational use of antimicrobials in dentistry during pregnancy. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 14, E15-19.
- Löffler C., Böhmer F., Hornung A., Lang H., Burmeister U., Podbielski A., et al. (2014) Dental care resistance prevention and antibiotic prescribing modification--the cluster-randomised controlled DREAM trial. *Implement Sci* 9, 27.
- López-Piriz R., Aguilar L., y Giménez M. (2007) Management of odontogenic infection of pulpal and periodontal origin. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 12, E154-59.
- Macías M., Gentile A., Tregnaghi M., Ruvinsky R., Falleiros L. H., Santolaya M. E., et al. (2012) Consenso de la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica (SLIPE) sobre Epidemiología del Neumococo en Latinoamérica. *Rev Enfer Infec Pediatr* 1-26.
- Matijević S., Lazić Z., Kuljić-Kapulica N. y Nonković Z. (2009, July) Empirical antimicrobial therapy of acute dentoalveolar abscess. *Vojnosanit. Pregl* 66, 544-550.
- MINSAL. Salud oral integral para adultos de 60 años, pág. 99. (2010). Disponible en: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7221747c2c9484b7e04001011f0141a4.pdf>
- MINSAL. Urgencias Odontológicas Ambulatorias, págs.12-46 (Diciembre, 2011). Disponible en: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7222b6448161ecb1e04001011f013f94.pdf>
- Moreno Villagrana A.P., y Gómez Clavel J.F. (2012) Terapia antibiótica en odontología de práctica general. *Rev. ADM* 69, 168-175.
- Murillo J. (2003) Terapéutica de las infecciones bacterianas orofaciales. *Med. Oral* 8, 154.
- Palmer N.A., Pealing R., Ireland R.S. y Martin M.V. (2000) A study of therapeutic antibiotic prescribing in National Health Service general dental practice in England. *Br Dent J* 188, 554-558.
- Poveda Roda R., Bagán J.V., Sanchis Bielsa J.M., y Carbonell Pastor E. (2007) Antibiotic use in dental practice. A review. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 12, E186-192.
- Prieto Prieto J. y Calvo A. (2004) Bases microbiológicas en las infecciones bucales y sensibilidad en los antibióticos. *Med Oral Patol Oral Cir. Bucal* 9, S11-18.
- Rastienienė R., Pūrienė A., Aleksejūnienė J., Peciulienė V. y Zalwckas L. (2015). Odontogenic Maxillofacial Infections: A Ten-Year Retrospective Analysis. *Surg Infect* 16, 305-312.
- Robertson D. y Smith A.J. (2009) The microbiology of the acute dental abscess. *J Med Microbiol* 58, 155-162.
- Robles Raya P., De Frutos Echaniz E., Moreno Millán N., Mas Casals A., Sánchez Callejas A. y Morató Agustí M.L. (2013) Me voy al dentista: ¿antibiótico como prevención o como tratamiento?. *Aten Primaria* 45, 216-221.
- Rodríguez-Alonso E., y Rodríguez-Monge M. (2009) Tratamiento antibiótico de la infección odontogénica. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 33, 67-79.

Sweeney L., Dave J., Chambers P. y Heritage J. (2004) Antibiotic resistance in genera dental practice-a cause for concern?. J Antimicrob Chemother 53, 567-576.

Vicari T., Donaduzzi L. Rui G., Villareal Rodríguez L.J., Barboza D'Ávila Jr V. y De Conto F. (2014) Visión contemporánea de las infecciones odontogénicas. Rev Costarr Salud Pública 23, 80-86.

Velasco I. y Soto R. (2012) Principios para el tratamiento de infecciones odontogénicas con distintos niveles de complejidad. Rev Chil Cir 64, 586-598.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the use of antibiotics in patients with odontogenic infections undergoing tooth extractions at the Clínica Universidad del Desarrollo-La Florida during the year 2013 and compare the use of antibiotics with the national and international standards. In this observational, longitudinal and descriptive study, 655 clinical records were analyzed. 50 patients had the diagnosis of dental infection and tooth extractions were performed under local anesthesia as part of their treatment, 10 of them received antimicrobial therapy: Amoxicillin 1000 mg every 12 hours for 7 days was the most usual schedule employed in those patients. It was shown a careful use of antimicrobial therapy at the Dental Clinic, Clínica Universidad del Desarrollo-La Florida. The criteria for their use was in accordance with the recommendations from the Chilean Health Ministry (MINSAL) and in disaccordance with some international guidelines for antimicrobial use which prefer clindamycin or amoxicillin + clavulanic acid as drugs of first choice in the treatment of dental infections.

Keywords: Odontogenic Infections, Dental extraction, Antibiotic therapy, Amoxicillin.

Rev. Farmacol. Chile (2016) 9 (1) 48-53

Received 09-05-2016; Revised 09-05-2016; Accepted 10-05-2016

INTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

i) Tipos de Manuscritos:

- (a) Investigaciones Originales (Full papers): Trabajos que reportan investigaciones originales realizadas con procedimientos experimentales adecuados y según las guías nacionales e internacionales para el uso de sujetos de experimentación serán revisados para eventual publicación en la revista (ver preparación del manuscrito).
- (b) Comunicaciones Cortas (Short Communications): Reportes científicos originales cuyo tamaño debe ser de 1000 a 4000 palabras como máximo de extensión, incluyendo la leyenda de la figura (no se incluyen las referencias). Estos trabajos solo pueden incluir 1 figura y 1 tabla de resultados. En situaciones especiales se consideraran 2 figuras o 2 tablas. No deben ser usadas más de 15 referencias en el manuscrito.
- (c) Revisiones (Reviews): Revisiones sobre temas relevantes de la Farmacología serán solicitados por el Editor en jefe o el comité editorial, a través de invitación escrita. Estas revisiones no requerirán una exhaustiva revisión editorial y serán publicadas en volúmenes temáticos de la Revista de Farmacología de Chile.
- (d) Columnas de Opinión u otras Publicaciones: Columnas de opinión sobre temas de contingencia nacional que involucren políticas públicas de medicamentos, correcto uso de medicamentos por parte de la población o la aparición y/o retirada de medicamentos en el mercado nacional, serán solicitadas por el Editor en jefe o el comité editorial, a través de invitación escrita.

ii) Detalles para el envío de Manuscritos:

El envío de manuscritos a la Revista de Farmacología de Chile para revisión (*Full papers, Short Communications o Reviews*) o solicitudes de columnas de opinión deben ser enviados a los siguientes correos electrónicos (ramon.sotomayor@uv.cl cc: pablo.iara@uv.cl cc: georgina.renard@uv.cl). Se solicita colocar en el asunto del correo electrónico la siguiente frase: [Manuscrito para Rev.Farmacol.Chile](#)

iii) Preparación del Manuscrito:

- * Se recomienda el uso del programa para procesar texto Word de Microsoft Office. Cuando guarde el manuscrito que ha elaborado se solicita que la opción de guardado sea: Guardar como: "Documento de Word 97-2003".
- * El manuscrito debe ser escrito en formato "Times New Roman" tamaño 12, doble espacio y a una columna. Las páginas del manuscrito deben ser enumeradas en el borde inferior derecho con números arábigos.
- * Cualquier figura inserta en el manuscrito debe ser en formato TIFF, JPEG o BMP de alta resolución (600 dpi) y en caso de usar tablas se debe usar la opción insertar tablas de Word. No se recomiendan tablas hechas con la opción de insertar líneas.
- * Fotografías y gráficos a color son aceptadas para la versión digital, sin embargo en la versión impresa de la revista se utilizará la impresión en escala de grises. Además se recomienda verificar la calidad de la figura reduciéndola al tamaño de 1 columna de ancho, es decir 8 cm.
- * La Revista de Farmacología de Chile acepta trabajos en español, sin embargo previa autorización del comité editorial se podrán revisar trabajos en inglés o portugués.

iv) Estructura del Artículo:

iv.1) Investigaciones Originales y Comunicaciones Cortas:

Cada una de las secciones del manuscrito debe ser enumerada con números arábigos y cada subdivisión con la nomenclatura (X.1). No se considera en la enumeración el resumen (abstract).

Primera página:

- Título: El título del trabajo debe ser conciso e informativo. No se recomiendan abreviaciones de palabras en el título. Se debe incluir el título del trabajo en inglés.
- Nombre de los autores y Filiación: Se solicita indicar el nombre de cada autor y su apellido. Se acepta incluir la inicial del segundo nombre, aunque no es obligatorio. Al término de cada apellido se solicita colocar un número arábigo en superíndice que relacionará al autor con su respectiva filiación.
- Autor Correspondiente: Se debe indicar claramente al autor correspondiente del trabajo, incluyendo: Nombre, Dirección Postal, Teléfono, Fax y Correo Electrónico.

Segunda página:

- Resumen (Abstract): La extensión máxima del resumen es de 300 palabras y debe describir claramente el propósito de la investigación, los principales resultados y principal conclusión del trabajo. El resumen debe ser escrito en español e inglés.
- Palabras Claves: Se deben incluir palabras claves que permitan identificar los aspectos más importantes del trabajo. No incluir más de 10 palabras claves. Las palabras claves deben ser escritas en español e inglés.

Tercera y más páginas:

- Introducción: La introducción al tema a discutir en el trabajo no debe tener una extensión superior a las 750 palabras.
- Materiales y Métodos: Se debe detallar claramente todos los materiales y metodologías utilizadas en el desarrollo del trabajo. Además se debe explicitar en consentimiento bioético de la institución donde fue realizada la investigación. Los trabajos realizados en humanos deben incluir el apego experimental a la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, considerando consentiendo informado y aprobación de comité de ética.
- Resultados: Se debe incluir en detalle los principales resultados obtenidos, con sus respectivos análisis estadísticos. No se aceptarán trabajos para publicar que no tengan un adecuado tratamiento estadístico. La expresión gráfica de resultados puede ser realizada a través

de gráficos de 1 columna de ancho (8 cm) o agrupaciones de gráficos con un ancho máximo de dos columnas (16 cm). También se pueden incluir tablas que detallen resultados relevantes para el trabajo, incluyendo número de casos y valor de la significancia *p*.

- **Discusión de los Resultados:** La discusión de resultados debe ser objetiva y se debe evitar una excesiva discusión bibliográfica que reste valor a los resultados presentados en el manuscrito. Es recomendado una conclusión final que indique las proyecciones de la investigación.
- **Agradecimientos:** Se pueden incluir las fuentes de financiamiento que permitieron el desarrollo del trabajo, indicando claramente a que autor corresponde la fuente de financiamiento. También se pueden incluir agradecimientos a personas que prestaron ayuda técnica o de revisión del manuscrito. En esta sección se debe declarar si existió conflicto de interés. En caso de no haber conflicto de interés se debe mencionar esta situación. Se recomienda consultar la siguiente dirección URL <http://zl.elsevier.es/es/revista/neurologia-295/conflicto-intereses-publicaciones-cientificas-90101004-editorial-2012> para aclarar en concepto y situaciones de conflicto de interés.
- **Referencias:** En el texto se deben citar las referencias con el apellido del primer autor, sus iniciales y el año de la publicación. En la sección de referencias se deben ordenar las mismas por orden alfabético. Se recomienda utilizar algún programa de manejo de referencias como EndNote con el formato de referencias de Journal of Neurochemistry.

Ejemplos:

Semenova M. M., Maki-Hokkonen A. M., Cao J., Komarovski V., Forsberg K. M., Koistinaho M., Coffey E. T. and Courtney M. J. (2007) Rho mediates calcium-dependent activation of p38alpha and subsequent excitotoxic cell death. *Nat. Neurosci.* 10, 436-443.

La abreviación de los títulos de las revistas debe de acuerdo a el listado de revistas indexadas en *Index Medicus* (Superintendent of Documents, US Government Printing Office, Washington, DC 20402, USA, DHEW Publication No. 95-267). Ejemplo: *Acta Neurol. Scand.*, *Acta Physiol. Scand.*, *Anal. Biochem.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, *Biochem. J.*, *Biochem. Pharmacol.*, *Biochim. Biophys. Acta Biol. Chem.*, *Hoppe Seyler Br. J. Pharmacol.*, *Eur. J. Pharmacol.*, *Experientia J. Biol. Chem. J. Cell Biol. J. Mol. Biol. J. Pharmacol. Exp. Ther. J. Physiol. (Lond.) Mol. Pharmacol.*, *Nature Proc. Natl Acad. Sci. USA Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Science*

iv.2) Revisiones:

Las revisiones de unidades temáticas serán solicitadas por el editor en jefe o por el co-editor, sin embargo para aquellas unidades temáticas específicas oficiara como co-editor algún miembro del comité editorial que sea especialista en el tema

Primera página:

- **Título:** El título del trabajo debe ser conciso e informativo. No se recomiendan abreviaciones de palabras en el título. Se debe incluir el título del trabajo en inglés.
- **Nombre de los autores y Filiación:** Se solicita indicar el nombre de cada autor y su apellido. Se acepta incluir la inicial del segundo nombre, aunque no es obligatorio. Al término de cada apellido se solicita colocar un número arábigo en superíndice que relacionará al autor con su respectiva filiación.
- **Autor Correspondiente:** Se debe indicar claramente al autor correspondiente del trabajo, incluyendo: Nombre, Dirección Postal, Teléfono, Fax y Correo Electrónico.

Segunda página:

- **Resumen (Abstract):** La extensión máxima del resumen es de 300 palabras y debe describir claramente el propósito de la investigación, los principales resultados y principal conclusión del trabajo.
- **Palabras Claves:** Se deben incluir palabras claves que permitan identificar los aspectos más importantes del trabajo. No incluir más de 10 palabras claves.

Tercera y más páginas:

- **Introducción:** La introducción al tema a discutir en el trabajo no debe tener una extensión superior a las 750 palabras.
- **Temas a Desarrollar:** Por cada tema que se pretenda desarrollar se debe entregar una visión objetiva que destaque los avances más importantes en la investigación científica. Se pueden desarrollar subtemas, destacando claramente a que unidad temática corresponde. Se recomienda si se revisa algún procedimiento experimental mencionar las ventajas y desventajas de su aplicación. Es recomendado una conclusión final que integre la información entregada en la revisión.
- **Agradecimientos:** Se pueden incluir las fuentes de financiamiento que permitieron el desarrollo del trabajo, indicando claramente a que autor corresponde la fuente de financiamiento. También se pueden incluir agradecimientos a personas que prestaron ayuda técnica o de revisión del manuscrito. En esta sección se debe declarar si existió conflicto de interés. En caso de no haber conflicto de interés se debe mencionar esta situación. Se recomienda consultar la siguiente dirección URL <http://zl.elsevier.es/es/revista/neurologia-295/conflicto-intereses-publicaciones-cientificas-90101004-editorial-2012> para aclarar en concepto y situaciones de conflicto de interés.
- **Referencias:** En el texto se deben citar las referencias con el apellido del primer autor, sus iniciales y el año de la publicación. En la sección de referencias se deben ordenar las mismas por orden alfabético. Se recomienda utilizar algún programa de manejo de referencias como EndNote con el formato de referencias de Journal of Neurochemistry.

Ejemplos:

Semenova M. M., Maki-Hokkonen A. M., Cao J., Komarovski V., Forsberg K. M., Koistinaho M., Coffey E. T. and Courtney M. J. (2007) Rho mediates calcium-dependent activation of p38alpha and subsequent excitotoxic cell death. *Nat. Neurosci.* 10, 436-443.

La abreviación de los títulos de las revistas debe de acuerdo a el listado de revistas indexadas en *Index Medicus* (Superintendent of Documents, US Government Printing Office, Washington, DC 20402, USA, DHEW Publication No. 95-267). Ejemplo: *Acta Neurol. Scand. Acta Physiol. Scand. Anal. Biochem. Arch. Biochem. Biophys. Biochem. J. Biochem. Pharmacol. Biochim. Biophys. Acta Biol. Chem. Hoppe Seyler Br. J. Pharmacol. Eur. J. Pharmacol. Experientia J. Biol. Chem. J. Cell Biol. J. Mol. Biol. J. Pharmacol. Exp. Ther. J. Physiol. (Lond.) Mol. Pharmacol. Nature Proc. Natl Acad. Sci. USA Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Science*

Leyendas para las Figuras

Los títulos y leyendas de las Figuras deben presentarse en forma clara y corta. Se debe identificar y explicar todo símbolo, como flecha, número o letra que haya empleado para señalar alguna parte de las ilustraciones. En la reproducción de preparaciones microscópicas, explícite la ampliación y los métodos de tinción empleados.

Unidades de Medida y Nomenclaturas.

Use unidades correspondientes al sistema métrico decimal. Las abreviaturas deben ser definidas la primera vez que aparecen en el texto. El listado de abreviaturas debe ser de acuerdo a la siguiente publicación Biochem. J. (1978) 169, 1-27. Al finalizar este instructivo se mencionan las abreviaturas que no deberían ser definidas (el listado esta en idioma inglés).

La nomenclatura que se refiere a drogas y sustancias químicas no terapéuticas deben nombrarse de acuerdo a la nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Mientras que para fármacos solo se acepta el nombre genérico INN (DCI). Respecto a los nombres de fantasía solo pueden ser nombrados entre paréntesis con el signo ® siempre que esté registrada la patente y que no exista un conflicto de interés evidente con el laboratorio fabricante del fármaco.

Publicación de Artículos:

- Los artículos originales de investigación o de revisión serán evaluados por un comité especializado. Sin embargo para aquellos trabajos de revisión agrupados por unidades temáticas específicas, el editor en jefe de la revista y el co-editor del número, antes de aceptar los manuscritos revisarán que se cumplan a cabalidad las instrucciones antes detalladas.
- Los artículos originales de investigación que no se agrupen en unidades temáticas específicas y que sean aceptados para publicación, serán publicados en el volumen y número del congreso anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. La fecha aproximada de publicación será comunicada a los autores con suficiente antelación.
- Respecto a la revisión de artículos originales los revisores enviarán al Editor en Jefe, los cambios propuestos, sus opiniones, sus proposiciones, rechazos, etcétera, las cuales serán comunicadas a los autores con absoluta confidencia.
- Las publicaciones de artículos originales tendrán un costo de UF 0,3 por página que servirán para la manutención de la Revista.

Abreviaciones Permitidas sin necesidad de definición en el texto:

ADP, CDP, GDP, IDP, UDP, 5(pyro)-diphosphates of adenosine, cytidine, guanosine, inosine, and uridine AMP, etc.-5-phosphates of adenosine, etc. ANOVA, analysis of variance ATP, etc.-5'(pyro)-triphosphates of adenosine, etc. ATPase, adenosine triphosphatase bp, base pair Ci, curie CoA and acyl-CoA-coenzyme A and its acyl derivatives (e.g., acetyl-CoA) cpm, counts per minute CNS, central nervous system CSF, cerebrospinal fluid Cyclic AMP, 3,5-cyclic adenosine monophosphate Cyclic GMP-3,5-cyclic guanosine monophosphate DNA, deoxyribonucleic acid DNase, deoxyribonuclease DOPA, 3,4-dihydroxyphenylalanine dpm, dps-disintegrations per minute, disintegrations per second EDTA, ethylene-diaminetetraacetate EEG, electroencephalogram EGTA, ethyleneglycol bis(aminoethylether)tetraacetate ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay FAD, FADH₂, flavin-adenine dinucleotide and its reduced form FMN, flavin mononucleotide g, average gravity GABA, gamma-aminobutyric acid (not Gaba) GLC, gas-liquid chromatography GSSG, GSH, glutathione, oxidized and reduced forms h, hour HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid HPLC, high performance liquid chromatography Ig, immunoglobulin IR, infrared kb, kilobase kDa, kilodalton μ m, micron min, minute MPP⁺, 1-methyl-4-phenylpyridinium MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine NAD⁺, NADH-oxidized and reduced forms of nicotin-amide-adenine dinucleotide NADP⁺, NADPH-oxidized and reduced forms of nicotin-amide-adenine dinucleotide phosphate NAD, NADP may be used when the oxidation state need not be indicated NMDA, N-methyl-D-aspartate NMN, nicotinamide mononucleotide NMR, nuclear magnetic resonance PCR, polymerase chain reaction Pi, orthophosphate (inorganic) PNS, peripheral nervous system PPI, pyrophosphate (inorganic) rpm, revolutions per minute RNA, ribonucleic acid RNase, ribonuclease RT, reverse transcription s, second SEM, standard error of mean SD, standard deviation TLC, thin-layer chromatography Tris, 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol UV, ultraviolet