

Tesis de Posgrado

Mecanismo de acción de drogas tripanocidas

Moreno, Silvia N. J.

1981

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Moreno, Silvia N. J.. (1981). Mecanismo de acción de drogas tripanocidas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1678_Moreno.pdf

Cita tipo Chicago:

Moreno, Silvia N. J.. "Mecanismo de acción de drogas tripanocidas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1678_Moreno.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MECANISMO DE ACCION DE DROGAS TRIPANOCIDAS

Autor: Silvia N.J. Moreno

Director: Dr. Roberto Docampo

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones Bioenergéticas,
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas e Instituto de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN QUIMICA,
ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA.

- 1981 -

278

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. A.O.M. Stoppani por su constante apoyo y por haber hecho posible mi trabajo en el Centro de Investigaciones Bioenergéticas que dirige.

Al Dr. Roberto Docampo, con quien tuve el honor de iniciarme en el campo de la investigación bioquímica, por su ayuda en la planificación de las experiencias y por su amplio apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Carlos P. Lantos por su elevado espíritu científico y su interés en mi plan de investigación.

A la Dra. Eva Wider de Xifra por su apoyo para la realización de esta tesis.

A la Dra. Marta Dubin por su colaboración en las determinaciones de flujo biliar.

A la Dra. Elba Martino por su colaboración en las determinaciones de glutatión en bilis y actividades enzimáticas relacionadas.

Al Dr. Alberto Solari por su colaboración en la interpretación de las microfotografías electrónicas.

Al Dr. Ramiro P. A. Muniz por haber hecho posible las determinaciones de resonancia paramagnética electrónica.

Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados o enviados para su publicación según se detalla:

1. Estimulación de la peroxidación lipídica y alteraciones ultraestructurales inducidas por nifurtimox en tejidos de mamífero
Silvia N.J. Moreno, D.J. Palmero, Kumiko E. de Palmero, R. Docampo y A.O.M. Stoppani.
Medicina (Buenos Aires) 40, 553-559, 1980.
2. Intracellular production of nifurtimox anion radical, superoxide anion and hydrogen peroxide in Trypanosoma cruzi different stages.
R. Docampo, Silvia N.J. Moreno, A.O.M. Stoppani, W. Leon, F.S. Cruz y F. Villalta.
The Journal of Protozoology 27, 43A, 1980.
3. Nitrofurán enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation.
R. Docampo, Silvia N.J. Moreno y A. O.M. Stoppani.
Archives of Biochemistry and Biophysics 207, 316-324, 1981
4. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of Trypanosoma cruzi.
R. Docampo, Silvia N.J. Moreno, A.O.M. Stoppani, W. Leon, F.S. Cruz, F. Villalta y R.P.A. Muniz.
Biochemical Pharmacology 30, 1947-1951, 1981.
5. Bases bioquímicas de la terapéutica antichagásica
R. Docampo, Silvia N.J. Moreno y A.O.M. Stoppani.
Revista de la Asociación Médica Argentina, en prensa, 1981
6. Increased biliary GSSG-secretion and loss of hepatic glutathion in rat liver after nifurtimox treatment.
Marta Dubin, Silvia N. J. Moreno, Elba Martino, R. Docampo y A.O.M. Stoppani.
Enviado para su publicación.

7. Generation of free radicals by benznidazol

Silvia N.J. Moreno, R. Docampo, R.P. Mason y A.O.M. Stoppani

Enviado para su publicación.

INDICE

INTRODUCCION

- La enfermedad de Chagas, 1
- Ciclo biológico del Trypanosoma cruzi, 2
- El enfoque racional de la Quimioterapia, 3
- Toxicidad de los productos de la reducción parcial del oxígeno, 8
- La generación de derivados de la reducción parcial del oxígeno en el Trypanosoma cruzi, 15
- Generación de radicales libres por naftoquinonas en el Trypanosoma cruzi, 24
- Los nitroderivados como potenciales generadores de derivados de la reducción parcial del oxígeno, 29

MATERIAL Y METODOS

- Trypanosoma cruzi, 31
 - Forma de cultivo, 31
 - Formas intracelulares y sanguíneas, 31
 - Homoginización y fraccionamiento celulares, 31
- Ratas, 32
 - Tratamiento de los animales, 32
 - Fraccionamiento celular, 33
- Reactivos, 33
- Espectrometría de resonancia paramagnética electrónica, 34
- Determinación de la formación de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno, 35
- Consumo de oxígeno, 35
- Oxidación de NADPH, 35

Peroxidación lipídica, 36
Ensayos de glutatión, 36
Determinación de actividades enzimáticas, 37
Espectrofotometría de muestras de bilis y orina, 37
Microscopía electrónica, 37

RESULTADOS

Generación de radicales libres inducida por el nifurtimox en las diferentes formas del Trypanosoma cruzi, 38
 Generación del radical aniónico del nifurtimox, 38
 Estimulación del consumo de oxígeno cianuro insensible y de la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, 41
 Inhibición del crecimiento, 47
 Alteraciones ultraestructurales producidas por el nifurtimox, 48
Generación de radicales libres inducida por el nifurtimox en tejidos de mamífero, 50
 Formación del radical aniónico del nifurtimox, 50
 Estimulación del transporte de electrones y la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, 57
 Estimulación de la peroxidación lipídica, 69
 Alteraciones ultraestructurales en los órganos blanco de la toxicidad del nifurtimox, 72
Mecanismo de desintoxicación hepática del nifurtimox, 74
Generación de radicales libres inducida por el benznidazol en el Trypanosoma cruzi y en el huésped, 83
 Estimulación del transporte de electrones y la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, 85
 Inhibición del crecimiento del Trypanosoma cruzi, 92

DISCUSION

Mecanismo de toxicidad del nifurtimox en el T. cruzi y en el huésped, 93

Mecanismo de desintoxicación hepática del nifurtimox, 98

Mecanismo de toxicidad del benznidazol en el T. cruzi y en el huésped, 101

CONCLUSIONES FINALES, 103

BIBLIOGRAFIA, 106

INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas afecta a los habitantes de prácticamente todos los países del continente Americano desde el Sur de los Estados Unidos hasta la Argentina y Chile. La prevalencia de la enfermedad en los diferentes países ha sido estimada en el 20% del total de la población, lo que significa que al menos, 7 millones de personas están infectadas con el Trypanosoma cruzi (World Health Organization, 1960). Se han encontrado a los vectores en grandes áreas de la región neotropical desde el paralelo 43 Norte hasta el 49 Sur. Se han detectado tripanosomas del tipo T. cruzi en más de 100 especies de animales salvajes, pertenecientes a diferentes órdenes, en regiones endémicas y en áreas aparentemente libres de Enfermedad de Chagas humana. Alrededor de 35 millones de habitantes están probablemente expuestos a los riesgos de infección en todas las áreas endémicas.

Aunque no existen datos completos sobre su morbilidad y mortalidad, el impacto causado por la Enfermedad de Chagas puede ponerse en evidencia por su alta prevalencia en áreas rurales, la incapacidad física causada por sus formas clínicas cardíacas que afectan especialmente a gente joven en la segunda mitad de la vida, la ocurrencia de una relativamente alta proporción de muertes súbitas, el costo de hospitalización y el daño psicológico provocado por esta enfermedad potencialmente peligrosa en un gran número de pacientes asintomáticos.

El control de la Enfermedad de Chagas puede llevarse a cabo a través del mejoramiento de las viviendas (dependiente de factores económicos y sociales usualmente lentos) y la aplicación de insecticidas de acción residual en las viviendas humanas (un programa extenso y a largo plazo). Hasta la fecha, ninguna droga cura la Enfermedad de Chagas en forma efectiva. Una droga barata y no tóxica capaz de ser utilizada en casos individuales así como para prevenir la transmisión de la Enfermedad de Chagas es aún un sueño vago. Existe por lo tanto una gran necesidad de nuevos compuestos activos contra el Trypanosoma cruzi.

Ciclo biológico del Trypanosoma cruzi

El T. cruzi es transmitido usualmente por insectos hematófagos (Hemiptera, Reduviidae) que durante o después de la ingesta de sangre eliminan heces conteniendo tripomastigotes metacíclicos infectantes. Estas formas metacíclicas penetran al huésped vertebrado ya sea a través de lesiones en la piel o las membranas mucosas normales, y llevan a cabo una multiplicación discontinua: los parásitos luego de penetrar a una gran variedad de células, se transforman en la forma amastigote que se multiplica por fisión binaria y luego de 4 ó 5 días se diferencian en tripomastigotes. Estos flagelados recientemente formados son liberados de las células parasitadas hacia la sangre y luego de circular por un cierto período de tiempo sin multiplicarse penetran a diferentes células del huésped para llevar a cabo un nue

vo ciclo tisular. La fase aguda caracterizada por la presencia de un gran número de parásitos en los estadios tisular y sanguíneo es seguida comúnmente por una fase crónica con una parasitemia subpatente, escasas formas tisulares y un balance equilibrado entre huésped y parásito. La cura espontánea no ha sido reportada hasta ahora. Los vectores se infectan al ingerir las formas sanguíneas que evolucionan a través de su tracto digestivo. En el intestino medio se encuentran numerosos epimastigotes en división. La mayoría de las formas metacíclicas infectantes se forman aparentemente en el recto donde se tienden a acumular hasta su eliminación por las heces.

El T. cruzi crece en numerosos medios complejos (revisto por Taylor y Baker, 1968) pero hasta hora no ha sido cultivado en un medio completamente definido. La diferenciación de los epimastigotes en las formas tripomastigotes metacíclicas infectantes ocurre durante la fase estacionaria de los cultivos. Sólo las formas metacíclicas son infectantes para el huésped vertebrado y su infectividad parece depender de la cepa, el número de tripomastigotes inoculados y el tiempo de cultivo en un medio artificial (Chiari, 1971).

El enfoque racional de la quimioterapia

Hace más de 70 años, Paul Erlich estableció que la finalidad de una quimioterapia específica es la utilización de drogas que exterminen al organismo invasor sin perjudicar al huésped.

(Himmelweit, 1960). Ocasionalmente esta finalidad ha sido conseguida como resultado del ensayo empírico de drogas seleccionadas. En su mayor parte los compuestos más útiles fueron encontrados sin reparar en el rol de las estructuras afectadas por esos agentes inhibidores específicos. Esos estudios fueron desarrollados mucho después en el curso de investigaciones sobre el mecanismo de acción de estos antibióticos o sustancias sintéticas. El conocimiento ganado a través de tales estudios se encuentra ahora entre los más importantes que nos han permitido caracterizar las diferencias bioquímicas entre las distintas especies. Estas diferencias bioquímicas, que constituyen la base de la bioquímica comparada, son de dos clases. Una se relaciona con la diversidad de sistemas metabólicos en diferentes organismos y puede ser ejemplificada por diferencias en la biosíntesis de metabolitos esenciales o en otros caminos metabólicos. La segunda se relaciona con los nuevos conocimientos de la biología molecular que afirman que las diferencias en la composición y secuencia de los ácidos nucleicos entre los organismos determina diferencias en las estructuras de prácticamente todas las proteínas, y enzimas de los parásitos y sus huéspedes. El primer tipo de diferencia puede aportarnos información sobre lo esencial de un sistema metabólico para la multiplicación y supervivencia de tanto el parásito como el huésped. Para que ese sistema esencial pueda ser explotado debemos definirlo y preparar un reactivo selectivo en una forma que pueda penetrar e inhibir la reacción esencial específicamente en el huésped infectado (Co--

hen, 1977)].

En 1904, Erlich usó el azul tripán para curar ratones infectados por ciertos tripanosomas (Himmelweit, 1960). Sus observaciones lo convencieron de las posibilidades de una "quimioterapia específica", una convicción que inició una larga búsqueda que llevó al descubrimiento de la arsfenammina o Salvarsán, droga clínicamente útil (Albert, 1973). Muchos años después, en la década del 30, el descubrimiento de que el prontosil y la sulfanilamida derivada eran efectivos en la terapéutica de muchas infecciones bacterianas apoyaron la hipótesis de Erlich.

Sin embargo, la demostración de que en las bacterias las sulfodrogas afectaban la incorporación del ácido para-aminobenzoico necesario para la formación del ácido fólico, que los tejidos animales requerían ya formado, sugirió una vez más que las bacterias y el hombre no poseen grandes diferencias. Las diferencias parecieron mínimas: el hombre había perdido los primeros pasos en la biosíntesis de los folatos y muchas bacterias patógenas carecían del transportador para los folatos presentes en los tejidos animales. Así, una quimioterapia específica no necesitaba de las llamadas grandes diferencias bioquímicas evolutivas. Aunque la incapacidad de las bacterias patógenas para usar ácido fólico constituía un serio inconveniente para la bacteria, la mayoría de los bioquímicos no lo consideró como una gran diferencia evolutiva. Sin embargo, las diferencias menores en el metabolismo del ácido fólico en muchos organismos fueron explotadas y llevaron a la preparación de numerosas sustancias que

casi específicamente inhibían diferentes pasos de su metabolismo en bacterias, protozoarios y otras células (Hitchings y Burchall 1965, Bertino, 1979).

A pesar de todo, el paradigma de la "Unidad de la Bioquímica" que pudo ser postulado para minimizar la existencia de diversidad y su posible utilidad en el diseño de agentes terapéuticos no fue seriamente cuestionado hasta el descubrimiento de los antibióticos. La existencia de los antibióticos y el esclarecimiento de su mecanismo de acción en numerosos casos, por ejemplo la penicilina y el cloranfenicol, dividió el mundo biológico en organismos procariotes y eucariotes (Stanier y col. 1970). La acción terapéutica específica de la penicilina radicaba en la inhibición de una enzima esencial para la síntesis de los peptidoglicanos de las bacterias (procariotes), estructuras para las cuales no existían homólogas, es decir contraparte estructural descendientes de formas ancestrales comunes, en los eucariotes. La sensibilidad específica de los ribosomas bacterianos al cloranfenicol y muchos otros antibióticos llevó a creer que existen grandes diferencias bioquímicas cualitativas entre los procariotes patógenos y sus huéspedes eucariotes. Las células eucariotes poseen estructuras asociadas a su membrana y ribosomas citoplasmáticos que son análogos a estas estructuras de las bacterias. Sin embargo, estas estructuras de los eucariotes parecen haber evolucionado independientemente de las estructuras de los procariotes.

Aunque sabemos que existen sustancias específicas de los procariotes y caminos biosintéticos específicos característicos

de ciertas células eucariotes, muy poco se ha hecho para explotar estas diferencias conocidas de modo sistemático. Las razones más obvias de esta deficiencia son el continuo éxito terapéutico del viejo método de obtención de drogas por métodos empíricos y sus mejoras. Han sido encontradas importantes sustancias antibacterianas y se han hecho modificaciones de los antibióticos existentes por síntesis creativa para incrementar su estabilidad, distribución y espectro antibacteriano. Como los compuestos obtenidos de esta forma pueden controlar la mayor parte de las infecciones bacterianas en el mundo desarrollado, no se han iniciado nuevas formas de búsqueda de drogas.

En contraste con el éxito obtenido para la mayoría de las infecciones bacterianas, intentos similares para buscar compuestos sintéticos y productos naturales con actividad específica contra protozoarios parásitos no han llevado a la obtención de un número significativo de compuestos clínicamente útiles.

Aunque se conocen compuestos efectivos para algunas enfermedades tropicales las tripanosomiasis son claramente enfermedades para las cuales se necesitan nuevas y mejores drogas.

En el caso del Trypanosoma cruzi, poco se ha hecho para identificar reacciones metabólicas específicas y aprovecharlas con finalidad terapéutica y la causa de esta deficiencia ha sido la aplicación del método empírico para la obtención de drogas.

La obtención de fármacos utilizables en medicina humana implica las fases siguientes: a) la identificación del agente y

caracterización de su acción in vitro; b) la demostración de su acción in vivo, en el huésped infectado; c) ensayos de toxicidad aguda y crónica, metabolismo y farmacocinética y d) aplicación de la tecnología farmacéutica para su producción en escala industrial. La investigación básica tiene un papel muy importante en la primera etapa del proceso pues aporta la información inicial que permite el desarrollo de las etapas subsiguientes. Describiremos a continuación las diferencias metabólicas más importantes que se han encontrado entre el T. cruzi y su huésped mamífero que han permitido por una parte, concebir un interesante modelo quimioterápico, y por la otra, explicar la acción de nitrofuranos sobre el T. cruzi entre los cuales se encuentra el nifurtimox, el fármaco más frecuentemente empleado para tratar los chagásicos.

Toxicidad de los productos de la reducción parcial del O_2 :

A pesar de estar presentes en concentraciones muy bajas, el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son metabolitos intracelulares normales.

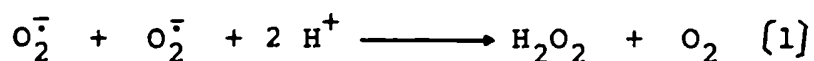
Varias enzimas citoplasmáticas del tipo de las flavoproteínas, tales como la xantino oxidasa y la aldehído oxidasa, producen O_2^- (Fridovich, 1974). Las mitocondrias parecen constituir el principal sitio celular de producción de O_2^- . En hígado de rata, hay una formación de cerca de 24 nmol O_2^- /min/g, lo que representa cerca del 75% de la producción total de O_2^- .

La enzima superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial mantiene una baja concentración de $O_2^{\bar{}}$ en estado de equilibrio, cuya concentración fue calculada en 8×10^{-12} M en el espacio de la matriz mitocondrial (Tyler, 1975). Por otra parte, la concentración citoplasmática de $O_2^{\bar{}}$ en estado estacionario es de 66×10^{-12} M (Tyler, 1975). Datos recientes de literatura indican que el retículo endoplásmico celular puede producir cantidades considerables de $O_2^{\bar{}}$ en condiciones fisiológicas (Mishine y col., 1976, Sliger y col., 1974, Bartoli y col., 1976).

En cuanto al H_2O_2 , se sabe que una serie de organelas y enzimas son fuentes de esta sustancia y que la velocidad de formación de H_2O_2 en estos sistemas depende de la provisión de sustratos y de O_2 . Estudios efectuados en hígado de rata perfundido han demostrado que la formación mitocondrial de peróxido de hidrógeno constituye un evento fisiológico en condiciones aeróbicas (Oshino y col., 1975). Estudios realizados con mitocondrias aisladas de diferentes orígenes han demostrado que en todos los casos estas organelas son un sistema generador de H_2O_2 . Estas determinaciones han sido realizadas con corazón de paloma (Boveris y Chance, 1973), rata y vaca (Loschen y col., 1974) hígado (Boveris y col., 1972) y riñón de rata, pulmón de paloma, músculo de Ascaris sp., Saccharomyces cerevisiae (Chance y col., 1979) y Crithidia fasciculata (Kusel y col., 1973). Se determinó que el anión superóxido es un precursor estequiométrico del peróxido de hidrógeno mitocondrial y microsomal (Loschen y col., 1974).

Los datos obtenidos con las fracciones aisladas de hígado de rata indican que las mitocondrias, los microsomas, los peroxisomas y las enzimas solubles son responsables por la formación del 14%, 47%, 34% y 5% respectivamente del H_2O_2 citoplasmático, en presencia de sustratos adecuados (Boveris y Chance, 1973). Considerando la velocidad de producción de H_2O_2 en el hígado de rata perfundido (Oshino y col. 1973, Oshino y col., 1975a), y en este mismo órgano in situ (Oshino y col., 1975b) y la cantidad de catalasa de hígado de rata (Oshino y col. 1975a), la concentración de H_2O_2 en estado de equilibrio puede ser estimada en cerca de 10^{-8} M (Oshino y col., 1973).

La Fig. 1 esquematiza el metabolismo del peróxido de hidrógeno. El anión superóxido es generado por las mitocondrias presentes en toda célula aeróbica y por algunas enzimas especializadas presentes en determinados tejidos diferenciados, como por ejemplo, la xantino oxidasa de hígado y la ferredoxina de las adrenales. La superóxido dismutasa (SOD) presente en las mitocondrias y en el citosol (Fridovich, 1974) asegura la dismutación del radical O_2^- en H_2O_2 y oxígeno de acuerdo con la reacción de Mc Cord y Fridovich (1969):



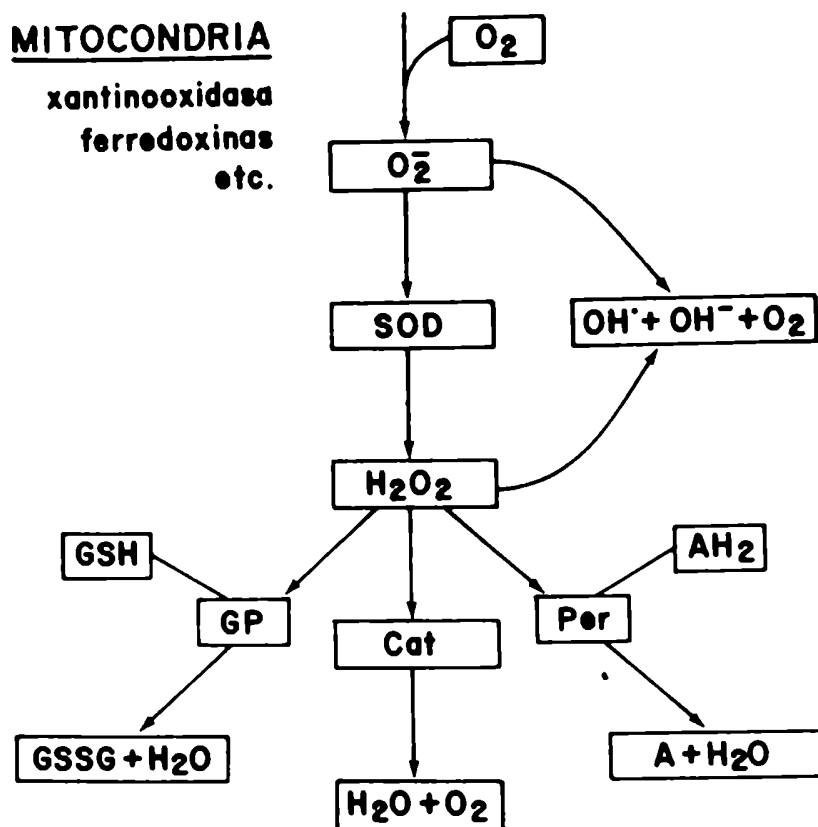
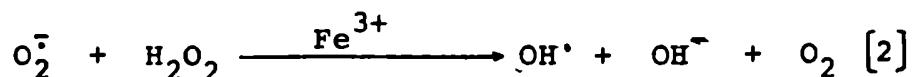


Fig. 1. Metabolismo celular del anión superóxido y del H_2O_2 .

El H_2O_2 es normalmente degradado por la catalasa, presente en los peroxisomas de hígado, corazón y riñón. En otros tejidos desprovistos de actividad catalásica, el H_2O_2 difunde a través de la corriente sanguínea hasta la catalasa de los eritrocitos, siendo éste el principal mecanismo de eliminación del H_2O_2 . En algunos tipos celulares especializados existen peroxidases como la glutatión peroxidasa (GP) de hígado o la citocromo c peroxidasa de levadura, o la peroxidasa de rábano, que conducen a la eliminación del H_2O_2 acoplada a la oxidación de ciertas sustancias (AH_2 en general) como el glutatión (GSH), el citocromo c reducido y fenolaminas aromáticas. Esta combinación de enzimas constituye en parte una defensa normal de los organismos

vivos contra la acumulación de H_2O_2 y O_2^- , los cuales pueden interactuar entre sí, de acuerdo con la reacción de Haber-Weiss (1934):



Esta reacción, que actualmente se piensa que es catalizada por Fe^{3+} (Mc Cord y Day, 1978), produce radical hidroxilo (OH^\cdot) muy tóxico y principal responsable del daño biológico causado por las radiaciones ionizantes (Fridovich, 1974). Estos tres productos de la reducción parcial del oxígeno son tóxicos. El H_2O_2 es capaz de actuar como oxidante y como reductor de hemoproteínas y de moléculas conteniendo grupos tioles. El O_2^- es también reductor y oxidante (por ejemplo, reduce al citocromo c y oxida la adrenalina) participando en reacciones que llevan a la peroxidación de lípidos (Fong y col., 1973). El radical hidroxilo reacciona indiscriminadamente con cualquier tipo de molécula atacando grupos metilénicos ($-\text{CH}_2$ de ácidos grasos o de ácidos nucleicos), con formación de grupos $-\text{CHOH}$ y H^+ y originando reacciones en cadena. Ciertos antioxidantes biológicos, como las vitaminas A y E, podrían actuar removiendo radicales libres y bloqueando estas reacciones en cadena.

La velocidad de la reacción no enzimática de Haber-Weiss (Reacción [2]) en el citoplasma de hígado de rata puede ser estimada conociendo las concentraciones en estado estacionario de O_2^- y de H_2O_2 . Asumiendo una constante de $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para la reacción de segundo orden, se puede concluir que se forman

cerca de 0.1 nmol OH[•]/min /g de hígado (Boveris, 1977).

Se ha postulado (Kellog y Frodovich, 1975) que la reacción de Haber-Weiss es también una fuente de oxígeno singulete (¹O₂) en lugar del oxígeno triplete normal:



Este oxígeno singulete podría formarse en medios biológicos (Allen y col., 1974) siendo muy tóxico, más aún que el radical superóxido.

A pesar de que su mecanismo no está perfectamente aclarado, existen evidencias de que tanto el ¹O₂ como el OH[•] pueden actuar como iniciadores del proceso de peroxidación lípida (Kellog y Fridovich, 1975, Fong y col., 1973). Considerando por ejemplo al OH[•] como el iniciador de la cadena de reacciones, podemos sugerir el siguiente mecanismo:



En la primera reacción, el OH[•] abstrae un átomo de hidrógeno de un carbono metilénico. El radical formado incorpora O₂ y regenera el radical (reacciones [5] y [6]) iniciando la cadena de reacciones que lleva a una extensa formación de peróxidos lipídicos.

A pesar de que faltan evidencias definitivas de la forma-

ción de cantidades significativas de peróxidos lipídicos en condiciones fisiológicas, datos recientes sobre la liberación de glutatión (GSSG) en hígado perfundido, constituyen una importante contribución al tema. El hígado de rata perfundido libera 2-4 nmol GSSG/min/g de tejido (Sies y Summer, 1975). Considerando que la liberación de GSSG refleje la actividad de la glutatión peroxidasa (Sies y Summer, 1975), este valor correspondería a 100 nmol de radicales peróxido (ROOH)/min/g de hígado. Aparentemente, la cadena de formación de radicales actúa como un factor de amplificación que lleva a la formación de cerca de 1000 nmol ROOH por OH[·] (y/o ¹O₂) generado (Boveris, 1977).

La peroxidación lipídica es tóxica debido a las reacciones generadas por los radicales libres, principalmente radicales peróxido (ROOH) que son producidos. Debido a sus electrones no apareados, los radicales libres reaccionan muy energicamente e inician sustracciones de hidrógeno inespecíficas y reacciones químicas de adición (Tappel, 1973). Las Biomembranas y las organelas subcelulares son los sitios más susceptibles a la peroxidación lipídica. De hecho, las membranas mitocondriales y microsomales contienen cantidades relativamente grandes de ácidos grasos poliinsaturados en sus fosfolípidos. Pueden existir ácidos grasos de 2, 4, 5 y 6 dobles ligaduras, para las cuales las velocidades relativas de peroxidación in vitro son de 1, 4, 6 y 8 respectivamente (Tappel 1973). Por otro lado, el daño provocado por estas reacciones en cadena lleva a la formación de uniones cruzadas de proteínas, conduciendo a

una pérdida de actividad enzimática y alteraciones estructurales en las membranas celulares (Tappel, 1973).

Pequeñas variaciones en el delicado equilibrio entre los procesos de generación y eliminación de los productos de la reducción parcial del oxígeno producen dramáticos resultados del punto de vista biológico. Un aumento de la concentración de oxígeno a la que están expuestos fisiológicamente los organismos vivos lleva a la puesta en evidencia de la toxicidad del mismo, lo que es interpretado como un aumento de los productos de su reducción parcial (Mc Cord y Fridovich 1969, Fong y col., 1973).

La generación de derivados de la reducción parcial del oxígeno en el Trypanosoma cruzi.

La habilidad de los diferentes organismos para prevenir la acción letal de los derivados de la reducción parcial del O_2 depende de su contenido en superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1.), catalasa (EC 1.11.1.6) y peroxidasas (EC 1.11.1.7). Una deficiencia en estas enzimas pueden definir un blanco adecuado para el diseño de drogas tripanocidas que actúen incrementando la producción de esos agentes tóxicos.

La forma de cultivo (epimastigote) del T. cruzi incubada con citocromo c peroxidasa (CCP) como indicador externo no muestra difusión de H_2O_2 fuera de las células (Fig. 2). En contraste con este resultado negativo con los epimastigotes intactos, se puede

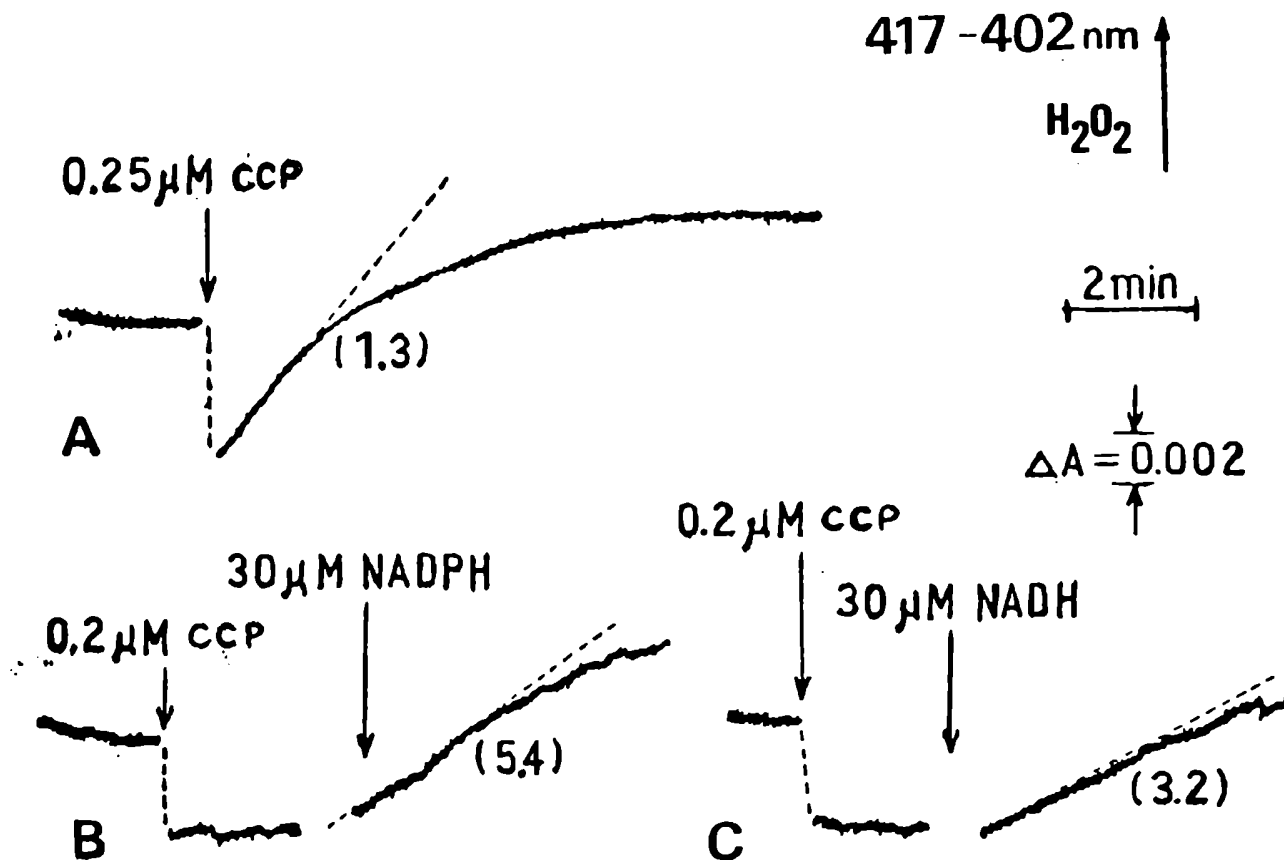


Fig. 2. Generación de H_2O_2 por epimastigotes de T. cruzi. A: Homogenado de epimastigotes² (0.5 mg de proteína/ml) en KCl 130 mM, amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.2, CCP (citocromo c peroxidasa) 0.35 μ M. B y C: Homogenado (0.16 mg proteína/ml) donde se indica se adicionaron CCP, 0.25 μ M, NADPH ó NADH. Otras condiciones como en A. Los números adyacentes a los trazados indican la producción de H_2O_2 en pmol/min por 10^6 células (A) o en nmol/min por mg proteína (B) y (C). Tomado de Boveris y Stoppani, 1977.

demostrar la formación de H_2O_2 por una cantidad equivalente de células rotas (Boveris y Stoppani, 1977, Fig. 2). Se puede calcular una velocidad de producción de $1.0 \text{ pmol } H_2O_2/\text{min}$ por 10^6 células. Esta velocidad se incrementa en presencia de NADPH o NADH

En la Tabla 1 se muestra la producción de H_2O_2 por las

TABLA 1. GENERACION DE H_2O_2 POR FRACCIONES DE T. cruzi

Fracción (% de proteína del homogenado)	Sustrato	Generación de H_2O_2 (nmoles/min por mg de prot.)	
		Sin antimicina	Con antimicina
Nuclear (20)	NADH	0.77	-
	NADPH	0.14	-
Mitocondrial (40)	NADH	2.35	2.30
	NADPH	0.75	0.70
	Succinato	0.00	0.00
Microsomal (7)	NADH	1.18	-
	NADPH	2.30	-
Sobrenadante (33)	NADH	4.70	-
	NADPH	6.00	-

Todas las muestras fueron incubadas en un medio conteniendo: KCl 130 mM, amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.2, CCP $0.6 \mu\text{M}$ y $0.2-1.0 \text{ mg}$ de proteína/ml. Donde se indica fueron añadidos $40 \mu\text{M}$ NADH (6 NADPH), 7 mM succinato y $1-2 \mu\text{M}$ antimicina. Tomado de Boveris y Stoppani, 1977.

fracciones subcelulares. Con la fracción mitocondrial es necesaria la adición de NADH ó NADPH para obtener cantidades medibles de H_2O_2 , siendo el NADH 3 veces más efectivo que el NADPH. Ni el succinato ni la antimicina estimulan la producción de H_2O_2 a pesar de que los epimastigotes poseen una succinato deshidrogenasa y una cadena respiratoria sensible a antimicina (Docampo y col. 1978C).

Con la fracción microsomal se obtienen resultados similares aunque la velocidad de producción de H_2O_2 es más alta con NADPH que con NADH. Los valores más altos de producción de H_2O_2 son observados con el sobrenadante, siendo el NADPH el más efectivo dador de electrones. La alta velocidad de producción de H_2O_2 con la fracción soluble sugiere la presencia de flavoproteínas autooxidables del tipo de la flavodoxina en esta fracción (Misra y Fridovich, 1972).

La velocidad de producción de H_2O_2 por los homogenados de T. cruzi representa alrededor del 3% del consumo endógeno de O_2 de los epimastigotes. Este podría ser el valor mínimo considerando la disolución de sustratos endógenos y coenzimas presumiblemente involucrados en la generación de H_2O_2 bajo condiciones fisiológicas. Por otra parte la respiración insensible a cianuro y antimicina de los epimastigotes es de alrededor del 15-20% del total del consumo de O_2 de estas células (Stoppani y col., 1980) un valor del cual se puede inferir que una gran parte de la respiración insensible a cianuro y antimicina se debe a la formación de H_2O_2 . En este sentido vale la pena mencionar que Mesch-

nick y col., (1977) detectaron una concentración alta de H_2O_2 en otros tripanosomatídeos (T. brucei). La distribución de proteínas en las fracciones subcelulares descritas en la Tabla 1 así como los valores específicos para la generación del H_2O_2 por esas fracciones permiten calcular la contribución relativa de las fracciones a la generación celular total de H_2O_2 . Esta contribución es: sobrenadante 63%, membranas mitocondriales 31% y retículo endoplásmico 6%. Se debe notar, sin embargo, que este cálculo está basado en la afirmación de que bajo condiciones fisiológicas los generadores de H_2O_2 están completamente saturados con sustratos.

La falta de liberación de H_2O_2 de células enteras a pesar de su activa generación por los epimastigotes implica la operación de un sistema detoxificante de H_2O_2 . Sin embargo, en los homogenados de epimastigotes no se detecta actividad de catalasa (Docampo y col. 1976).

En contraste con estos resultados negativos, se puede demostrar una actividad de ascorbato peroxidasa en los homogenados y en las fracciones subcelulares provenientes de ellos (Docampo y col., 1976).

La actividad peroxidásica está asociada con las fracciones que sedimentan a 480 g y 680 g, que incluyen microcuerpos. La fracción soluble muestra una actividad específica baja aunque significativa. En ausencia de ascorbato la velocidad de descomposición de H_2O_2 por las fracciones conteniendo microcuerpos no es significativa (0-3% de la velocidad en presencia de ascor

bato).

La presencia de peroxidasa en los microcuerpos de los epimastigotes coincide con a) la preferente distribución de actividad peroxidásica en las fracciones de alta densidad; b) el hecho de que las peroxidasas oxidan selectivamente donadores conteniendo la estructura enediol y c) la demostración citoquímica por Kallínikova (1968) de peroxidasa (Docampo y col., 1976). La ausencia aparente de catalasa en los microcuerpos de los epimastigotes coincide con observaciones negativas similares en otros protozoarios. El T. brucei, por ejemplo, tampoco posee catalasa y posee en cambio una actividad peroxidásica (Muller, 1965).

TABLA 2. ENZIMAS METABOLIZADORAS DE H_2O_2 EN T. cruzi

Reacción enzimática	Sustrato (μ M) e inhibidor (mM)	Actividad (mU/ 10^8 células)
Peroxidasa	H_2O_2 (100); ascorbato (50)	7.5 ± 1.2 (4) ^a
	igual + KCN (1)	5.0 (2)
	igual + KCN (3)	3.0 (2)
	igual + KCN (7)	1.0 (2)
	H_2O_2 (100); guayacol (30)	0 (4)
	H_2O_2 (100); pirogalol (50)	0 (4)
	H_2O_2 (100); citocromo c^{2+} (50)	0 (4)
Catalasa	H_2O_2 (1000)	0 (6)
Superóxido dismutasa (SOD)	O_2^-	68 ± 7 (4)

Datos tomados de Boveris y col. 1980.

^aNúmero de experimentos.

Los resultados de la Tabla 2 muestran que utilizando diferentes dadores de electrones (pirogalol, guayacol y citocromo c reducido) solo puede detectarse una actividad peroxidásica a altas concentraciones de ascorbato. El KCN inhibe la actividad ascorbato peroxidasa pero a concentraciones relativamente altas en comparación con peroxidases típicas. Esta ascorbato peroxidasa es termolábil ya que se obtiene una completa inactivación a 100 °C durante 5 min y se pierde actividad luego de la diálisis de los extractos de epimastigotes (Boveris y col., 1980).

Entre las peroxidases, el rol de la glutatión peroxidasa (E.C.1.11.1.9) ha sido recientemente reconocido ya que en células como los hepatocitos de rata, esta enzima es la principal responsable de la descomposición del H_2O_2 generado en el citosol y en la mitocondria (Chance y col., 1979).

La medida del glutatión total (Tietze, 1969) en diferentes extractos de epimastigotes permite calcular un valor de 4.9 ± 0.7 nmoles de GSH/ 10^8 epimastigotes. Este valor es de alrededor de 1/10 del contenido de glutatión en células de hígado de rata (Burk y col., 1978) cuando se expresan los valores por g de tejido húmedo (Boveris y col., 1980).

Como se ve en la Tabla 3 existe una actividad de glutatión reductasa en los extractos libres de células. El contenido de esta enzima en los epimastigotes es de alrededor de 1/30 del de las células de hígado de rata (Nishiki y col., 1976) calculado por g de tejido húmedo (Boveris y col., 1980).

TABLA 3. GLUTATION REDUCTASA, GLUTATION PEROXIDASA Y OTRAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN T. cruzi

Reacción enzimática	Oxidante	Actividad (mU/10 ⁸ células)
Glutati6n reductasa	GSSG	5.3 ± 0.4 (8)
Glutati6n peroxidasa	H ₂ O ₂	0 (8)
	hidroper6xido de ter-butilo	0.4 ± 0.09 (22)
	hidroper6xido de cumeno	0.5 ± 0.3 (6)
NADPH oxidasa	O ₂	3.8 ± 5 (8)

Tomado de Boveris y col. 1980.

En la Tabla 3 se muestra que con H₂O₂ no se puede demostrar actividad de glutati6n peroxidasa. Con hidroper6xido de ter-butilo el valor promedio de la actividad peroxid6sica aparente es muy bajo, alrededor de 1/2500 de la actividad en hepatocitos de rata (Burk y col. 1978). Por otra parte la relaci6n de la actividad en presencia de hidroper6xido de ter-butilo con respecto a la actividad de glutati6n reductasa en los extractos es 0.1 mientras que la misma relaci6n en hepatocitos de rata es de 1.95 (Sies y col. 1979).

La super6xido dismutasa tiene un importante rol en la generaci6n de H₂O₂ (Reacci6n [1]) (Fridovich, 1974):



Los homogenados de T. cruzi muestran un contenido de SOD de 1/20 del presente en los hepatocitos de rata (Tyler, 1975, Tabla 3).

Estas observaciones permiten afirmar que el Trypanosoma cruzi es un organismo pobremente dotado para detoxificar H_2O_2 ya que no posee actividad de catalasa ni de glutatión peroxidasa dependiente de H_2O_2 . Con respecto a la débil actividad de glutatión peroxidasa medida con peróxidos orgánicos, ésta puede reflejar una reacción relativamente no específica como la que es catalizada por la glutatión S-transferasa B (Burk y col., 1978) en la que la oxidación del glutatión reducido por hidroperóxidos ocurre en áreas hidrofóbicas de la proteína. Aparentemente, la ascorbato peroxidasa es el único mecanismo bioquímico capaz de metabolizar el H_2O_2 del que dispone el T. cruzi. Sin embargo la inactividad observada con sustratos utilizados por peroxidases típicas como el pirogalol y el guayacol ponen en duda el significado fisiológico de la actividad ascorbato peroxidasa y lleva a considerar la posibilidad de que la oxidación de ascorbato pueda deberse a una actividad pseudo-enzimática debida a la formación de un complejo de un metal unido laxamente a una proteína de los epimastigotes. La inhibición de la actividad ascorbato peroxidasa por cianuro (Tabla 2) así como la termolabilidad del factor involucrado provee sustento experimental a esta hipótesis.

Mc Cord y col., (1971) ha señalado que los organismos aeróbicos contienen tanto superóxido dismutasa como catalasa, los anaerobios aerotolerantes poseen una buena actividad de superóxido dismutasa y una baja actividad de catalasa y los organismos anaerobios parecen ser deficientes en ambas enzimas. Considerando esta clasificación podríamos decir que los epimastigotes de T. cruzi

son particularmente vulnerables a la acción tóxica del H_2O_2 . La posibilidad de aprovechar este metabolismo anormal del H_2O_2 por los tripanosomas parásitos a fin de obtener una aplicación en la quimioterapia constituye, por lo tanto, una importante y novedosa alternativa bioquímica.

Generación de radicales libres por naftoquinonas en el T. cruzi

Entre las sustancias que pueden participar en la generación de derivados de la reducción parcial del O_2 , algunos como los *o*- y *p*-quinoles son capaces de ser oxidados por el oxígeno molecular con formación de anión superóxido. A su vez la forma oxidada de estos quinoles hidrosolubles (quinonas) interactuarían con la cadena respiratoria regenerando el quinol (Boveris y col., 1972) o formando una semiquinona (Misra y Fridovich, 1972).

Las quinonas son dicetonas que derivan de compuestos aromáticos de tal forma que los dos grupos carbonilos pueden estar en el mismo o en diferentes anillos. Compuestos de naturaleza quinónica funcionan catalíticamente en animales, plantas y microorganismos. Estas sustancias se encuentran en las organelas subcelulares que contienen los complejos respiratorios multienzimáticos responsables por la formación de uniones de fosfato de alta energía a través del metabolismo oxidativo. Estas estructuras presentan alta concentración de lípidos cuya naturaleza y función aún está siendo investigada. Las quinonas parecen estar orientadas espacialmente en los complejos respiratorios y funcionan como trans

portadores de electrones entre otras enzimas respiratorias. Tales cofactores líposolubles parecen tener un papel importante en la fosforilación oxidativa (Brodie, 1965).

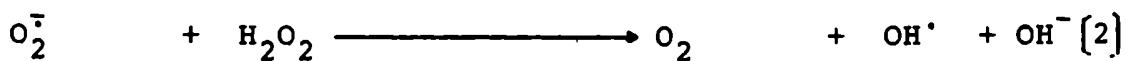
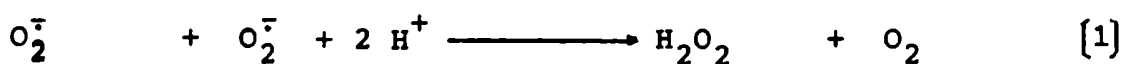
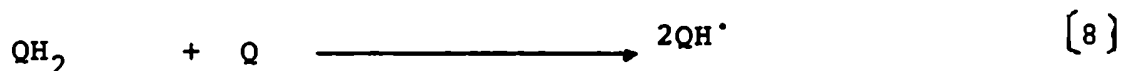
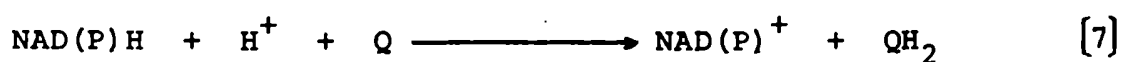
Varios tipos de quinonas existentes en la naturaleza son activas en sistemas biológicos. A pesar de que estas quinonas son estructuralmente diferentes, su actividad biológica se relaciona a través de algunas propiedades químicas comunes. La estructura química, responsable por las reacciones de oxidación y reducción es la base de su función catalítica en el transporte de electrones. Además de esto, las quinonas biológicamente activas tienen potenciales de oxido-reducción compatibles con su posición en la cadena de transporte de electrones (Brodie, 1965).

En síntesis, las quinonas están vastamente distribuidas en la naturaleza, y las benzoquinonas, al contrario de las naftoquinonas, se encuentran en todos los tipos celulares.

En el T. cruzi, se ha descrito la actividad letal in vitro de algunas naftoquinonas como la menadiona (Lopeteguí y Sosa Miatello, 1961). Una naftoquinona interesante del punto de vista biológico es el lapachol (2-hidroxi-3(metil-2butenil)-1,4-naftoquinona). Esta sustancia es una 2-OH-naftoquinona con cadena lateral insaturada que permite transformaciones químicas dando origen a la α -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto [2,3-b] pirano-5,10-diona) y la β -lapachona (3,4-dihidro-2,2 dimetil-2H-nafto [1,2-b] pirano-5,6-diona).

La adición de naftoquinonas a las diferentes formas del T. cruzi incrementa la velocidad intracelular de generación de $O_2^{\cdot -}$ y

H_2O_2 y libera derivados de la reducción parcial del O_2 al medio de suspensión (Docampo y col., 1978 b). La respuesta inmediata indica una rápida permeación de la quinona a través de la membrana de la células. Las reacciones químicas que explican la acción tripanocida de la β -lapachona (Q) (Docampo y col., 1978 a) son las siguientes:

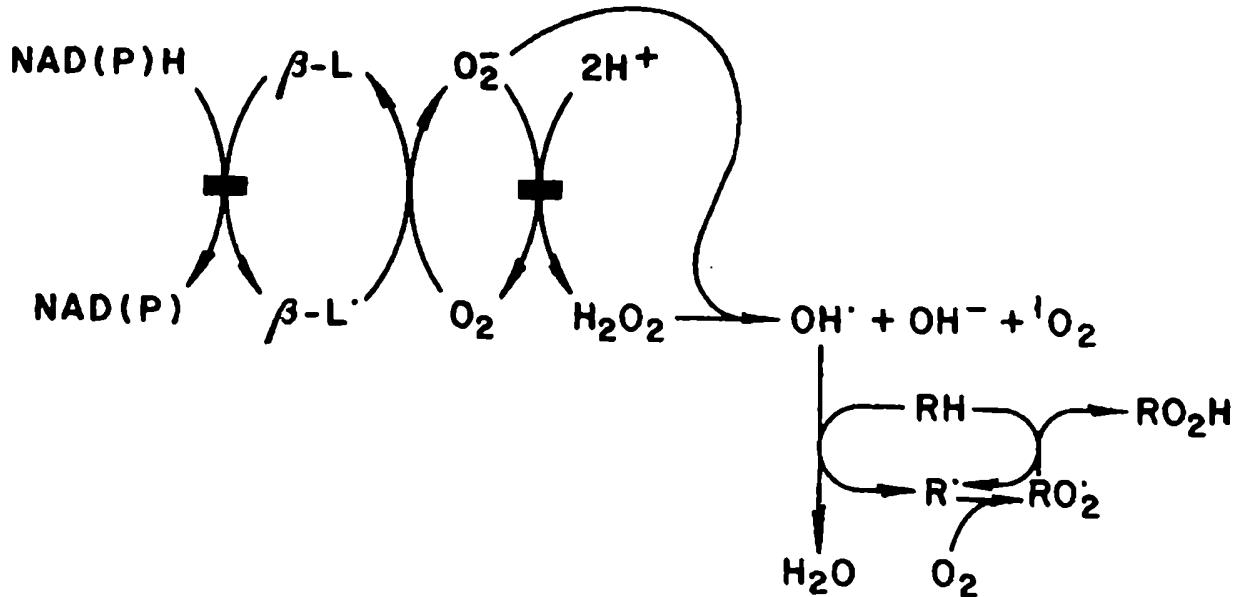


La reacción [7] es la bien conocida reacción de la quinona reductasa (Crane, 1961, Slater y col., 1961, Brodie, 1965, Ruzicka y Crane, 1971) que tiene lugar en las membranas mitocondriales y del retículo endoplásmico donde el carácter lipofílico de las moléculas de β -lapachona juega seguramente un papel importante. Las membranas mitocondriales y el NADH son mucho más importantes que el retículo endoplásmico y el NADPH como sistema reductor de la β -lapachona en el T. cruzi considerando (a) la similitud del efecto de la β -lapachona sobre la producción de H_2O_2 por el homogenado y por la fracción mitocondrial y (b) la distribución de proteínas y la actividad específica de las res--

pectivas fracciones subcelulares (Boyeris y col., 1978). Las formas reducidas de las quinonas son enzimáticamente oxidadas por el oxígeno molecular obteniéndose H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ (reacciones [9] y [10]). Con la β -lapachona y las fracciones subcelulares de T. cruzi la reducción de la quinona (reacción [7]) es más lenta que la oxidación de la quinona reducida (reacciones [9-11]) quedando usualmente la β -lapachona predominantemente en un estado oxidado (+ del 98% (Boyeris y col., 1978)). La formación de la semiquinona (reacción [8]) es un proceso muy rápido en mezclas quinol/quinona (Michaelis 1951, Yamazaki y Ohnishi, 1966) y puede serlo más aún si las moléculas están unidas a membranas. Las fracciones subcelulares de T. cruzi producen y liberan $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en cantidades similares, implicando el funcionamiento de las reacciones [9] y [10] (Boyeris y col., 1978). La auto-oxidación de la semiquinona (reacción [11]) parece ser el principal paso limitante de este grupo de reacciones como lo indica: (a) el hecho de que el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 sean producidos en cantidades similares en las fracciones mitocondriales a pesar de que la β -lapachona totalmente reducida genera principalmente H_2O_2 y (b) la detección del radical semiquinona en los epimastigotes de T. cruzi tratados con β -lapachona (Docampo y col., 1978a). La dismutación del anión superóxido (reacción [1]) lleva la formación de H_2O_2 . La reacción de Haber-Weiss (reacción [2]) que genera radical OH^{\cdot} (Fong y col., 1973, Zimmerman y col., 1973) y oxígeno singulete (Kellog y Fridovich, 1975) parece ser el mecanismo más razonable para explicar las complejas reacciones en cadena que llevan a la formación

de peróxidos lipídicos y orgánicos y a los daños ultraestructurales observados (Docampo y col. 1976).

En la Fig. 3 se muestra un esquema de las reacciones que hemos mencionado:



El mismo mecanismo de acción de la β-lapachona fue determinado en las tres formas del T. cruzi (epi-, trip- y amastigote; Docampo y col. 1978b), en bacterias (Cruz y col. 1978) y en células tumorales (Docampo y col. 1979a). Un derivado de la β-lapachona (3-alil-β-lapachona) es estable en presencia de proteínas séricas, posee baja toxicidad y es eficiente en suprimir la infectividad de la forma sanguínea de T. cruzi. Por todo ello se lo considera como potencialmente útil para esterilizar sangre destinada a transfusión (Gonçalves y col. 1979).

El mecanismo de acción tripanocida de las quinonas, en particular de la β-lapachona, constituye un mecanismo novedoso e importante para explicar la acción de quimioterápicos tripanocidas (The Lancet, editorial, 1978) y según Gutteridge (1980) constituye

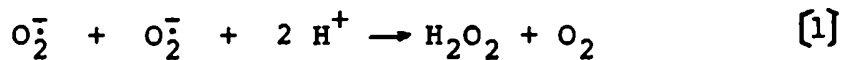
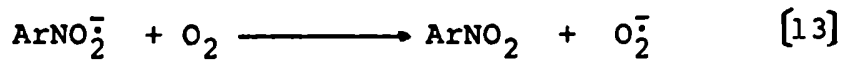
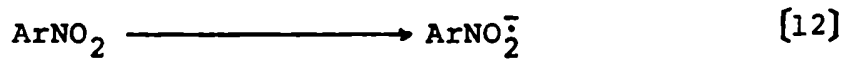
un adelanto significativo en el enfoque racional de la terapéutica antichagásica.

Los nitroderivados como potenciales generadores de derivados de la reducción parcial del oxígeno

A pesar de las objeciones que se pueden formular (Cançado y col. 1976), los nitroderivados, en particular el nifurtimox y el benznidazol, constituyen los quimioterápicos más eficaces en el tratamiento de la forma aguda de la enfermedad de Chagas (Van den Bossche, 1978).

La citotoxicidad de los nitroderivados se conoce desde hace tiempo. Se sabe que los nitrocompuestos alteran la velocidad de consumo de oxígeno de las células (Biaglow y col. 1976) y se ha de mostrado un continuo interés por conocer su mecanismo de acción (Mason y Holtzman, 1975).

Los nitroderivados son reducidos in vitro por enzimas solu bles como la aldehído oxidasa (Wolpert y col. 1973) y la xantino oxidasa (Thayer y col. 1951) o por enzimas microsomales que contie nen flavinas como la citocromo c reductasa (Wang y col. 1974). El primer paso de la reducción enzimática de los nitrocompuestos consi te en la transferencia de un electrón con generación del radical aniónico nitroaromático (Mason y Holtzman, 1975). Ciertos radicales aniónicos nitroaromáticos pueden reaccionar con el O_2 y producir anión superóxido regenerando el compuesto original (reacción [13]). E anión superóxido se convierte a su vez en H_2O_2 , ya sea espontáneame te o por acción de la superóxido dismutasa (reacción [1]). Se ha



postulado que la generación de O_2^- y H_2O_2 explicaría la efectividad de estas drogas en el tratamiento de infecciones microbianas anaeróbicas (Grunberg y Titsworth, 1973).

La presente investigación fue emprendida para determinar: 1) si el nifurtimox y otros nitroderivados utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, son convertidos enzimáticamente en sus radicales aniónicos nitroaromáticos capaces de participar en ciclos de oxidación y reducción tanto en el T. cruzi como en tejidos de mamíferos y 2) si la generación de derivados de la reducción parcial del oxígeno como consecuencia de esas transformaciones de los nitroderivados, está involucrada en el mecanismo de acción de estas drogas sobre el parásito y en la producción de efectos tóxicos colaterales en el huésped.

MATERIALES Y METODOS

Trypanosoma cruzi

Forma de cultivo: Los epimastigotes (cepa Tulahuén) fueron cultivados a 28 °C en el medio líquido de Warren (1960) excepto por el uso de suero bovino al 4 % en lugar de al 10 %. Seis días después de la inoculación, las células fueron recolectadas por centrifugación a 3000 g durante 10 min a 4 °C y lavadas con NaCl 0.15 M. La concentración final de epimastigotes se estimó midiendo la absorbancia de las suspensiones en un fotocolorímetro Crudo Camaño con un filtro de 670 nm, precalibrado con suspensiones de epimastigotes de concentración conocida por recuento en cámara cuentaglobulos. Con este método se encontró una relación lineal entre los valores de absorbancia y de concentración celulares (Docampo y col. 1978c).

Formas intracelulares y sanguíneas: El aislamiento de las formas intracelulares (León y col. 1979) y sanguíneas (Villalta y León, 1979) se hizo a partir de ratones infectados según se describe en las referencias respectivas. La concentración final de células se determinó por recuento en cámara cuentaglobulos.

Homogeinización y fraccionamiento celulares: Para los experimentos en los que se compararon las actividades de las diferentes formas del T. cruzi, las células fueron rotas por congelamiento (a -20 °C) y descongelamiento (2-4 °C) tres veces. La homogeinización se completó pasando las suspensiones tres veces a través de una aguja hipodérmica (calibre 24). En los demás experimentos donde se usó sólo la forma de cultivo, los epimastigotes se mezclaron con perlas de vidrio (de 150-200 µ de diámetro) en la proporción de 5.0 g por g de células (peso húmedo) y luego se rompieron en un mortero durante 5 min a 4 °C. En todos los casos prácticamente la totalidad de las células se rompió, según fue obser

vado al microscopio de contraste de fase. La pasta resultante de la rotura en mortero fue suspendida en sacarosa 0.25 M, KCl 5 mM (10 ml/g de célula, peso húmedo). La mayor parte de las perlas de vidrio fue separada por decantación y la suspensión fue sometida a centrifugación diferencial. Las fracciones obtenidas fueron: a) una fracción nuclear-flagelar (sedimentada a 680 g durante 10 min); b) la fracción mitocondrial (sedimentada a 30000 g durante 30 min; c) la fracción microsomal (sedimentada a 105000 g durante 60 min) y d) el sobrenadante.

Ratas

Tratamiento de los animales. Se usaron ratas macho Wistar, del Instituto de Farmacología, de 200-250 g de peso que fueron alimentados con alimentos Purina y agua y no fueron ayunados previamente a su utilización. Los animales fueron sacrificados por decapitación en una guillotina Harvard y posteriormente el hígado, cerebro y testículos fueron procesados. Los testículos y el riñón fueron desprovistos de sus cápsulas conectivas antes de su procesamiento.

En los experimentos destinados a medir flujo biliar y contenido de glutatión en bilis, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal) intraperitoneal y luego de abrir la cavidad peritoneal, el conducto biliar común fue canulado con un catéter PE-1 (Biotrol, Pharma, París, Francia) justo antes del hilio hepático para evitar la contaminación con el jugo pancreático. La temperatura rectal, controlada durante todo el período experimental, se mantuvo entre 37.5 y 38.5 °C utilizando una tabla de calentamiento. La arteria carótida y la vena yugular se canularon con catéteres de polietileno y fueron utilizadas para extraer muestras de sangre o para hacer infusiones. Para medir el flujo basal, la bilis se recolectó durante tres períodos de 15 min inmediatamente después de la canalización (período basal) y fue luego congelada a -20 °C para su posterior estudio. El flujo biliar se midió por pesada de los tubos y los valores tomados de cada rata representan la media de tres medidas.

No se hicieron correcciones por el peso específico. Durante este período basal fue administrada por la vena yugular una infusión de NaCl 0.15 M a la velocidad de 7.5 μ l/min, para compensar la pérdida de agua y electrolitos. Para los ensayos de glutatión se tomó especial cuidado en transferir las muestras directamente a tubos a 0 °C y en realizar los ensayos inmediatamente. Luego de este período basal, se administró nifurtimox en una sola dosis. El flujo biliar fue medido cada 15 min durante dos horas y media. La infusión de NaCl 0.15 M se mantuvo durante este período de recolección. Luego de los experimentos los hígados se removieron y pesaron. El nifurtimox se disolvió en Tween 80: NaCl 0.15 M (1:24 V/V). Se verificó que el solvente no afectaba el flujo biliar y la ultraestructura de los hepatocitos.

Fraccionamiento celular. Los tejidos fueron suspendidos en un medio constituido por manitol 0.23 M, sacarosa 0.07 M, EDTA 1 mM y Tris-HCl 5 mM (pH 7.4). La desintegración celular se llevó a cabo en un homogeneizador tipo Potter con vástago de teflón. Los homogenados fueron sometidos a centrifugación diferencial a 4 °C. Los núcleos y restos celulares fueron precipitados a 680 g durante 10 min. El sobrenadante fue centrifugado a 12000 g durante 10 min para separar la fracción mitocondrial y el sobrenadante resultante fue centrifugado a 105000 g durante 60 min, para separar la fracción microsomal. Esta última fracción fue luego lavada con KCl 0.15 M y centrifugada nuevamente a 105000 g durante 60 min.

Reactivos

Fueron todos de grado analítico. La L-epinefrina, superóxido dismutasa de eritrocitos (Tipo I), peroxidasa de rábano (Tipo VI), p-cloromercuribenzoato, xantina, xantina oxidasa (Grado I), NADPH, NADH, NADP, FMN, glucosa 6-fosfato, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, L-histidina, azida sódica, glutatión (formas oxidada y reducida), Tritón X-100, 5,5'-ditionitrobenzoico, hidroperóxido de terbutilo y las perlas de vidrio fueron obtenidos de Sigma Chemical

Co., St Louis, Missouri, USA. El manitol fue de Merck A.G. El nifurtimox (4-[(5-nitrofurfurilideno)amino]-3-metiltiomorfolino-1,1'-dióxido) fue de Bayer A.G. por cortesía del Dr. A. Haberkorn. El benznidazol (N-bencil-2-nitro-1-imidazol) y el Ro 5-9963 (1(2,3-dihidroxipropil)-2-nitroimidazol) fueron de Hoffman-La Roche & Co., Basilea, Suiza. El MK 436 (3-(1-metil-5-nitroimidazol-2-il)3a,4,5,6,7,7a-hexahidro 1,2-benzoxazol) fue de Merck Institute for Therapeutic Research por cortesía del Dr. B.M. Miller. El Hoe 293 (1-metil-2-(4-metiltiofenoximetil)-5-nitroimidazol) fue de Hoechst A.G. por cortesía del Dr. M. Schorr. La metopirona (2-metil-1,2-piridil-1-propano) de Ciba Pharmaceutica Co. y el SKF-525-A (β -dimetilaminoetil difenilpropil acetato) de Smith, Klein & French Laboratories fueron gentilmente cedidos por el Dr. J.A. Castro (CITEFA). El DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolino-1-óxido) fue obtenido de Aldrich Chemical Co. Milwaukee, Wisconsin, USA. El desferal (desferroxiamina B metanosulfonato) de Ciba Laboratories, Horsham, Sussex, United Kingdom, fue amablemente cedido por el Dr. R. Richmond (King's College, Londres). La nitrofuran toína (N-[5-nitro-2-furfurfurilideno]-1-aminohidantoina) fue obtenido de Eaton Vemaco Ltda, São Paulo, Brasil.

Espectrometría de resonancia paramagnética electrónica

Las observaciones se hicieron a temperatura ambiente (22-24°C) con un espectrómetro Varian E-109 equipado con una cavidad TM_{110} o con espectrómetros Varian E-4 y Varian E-9, utilizando una modulación de 100 KHz bajo las condiciones que se describen en las leyendas de las figuras. La mezcla de reacción (3 ml) contenía: el sustrato (1-3 mM), NADH (0.7 mM) o un sistema generador de NADPH consistente en $NADP^+$ (0.4 mM), glucosa 6-fosfato (5.5 mM), y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (0.67 unidades/ml) en KCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7.4 y Mg_2Cl 20 mM. El nifurtimox y el benznidazol se disolvieron primero en etilenglicol monometileter (2-5 % del volumen final, respectivamente). Las mezclas de incubación se gasearon durante 5 min antes de iniciar la reacción con $NADP^+$

o NADH. Todos los experimentos se hicieron con microsomas o preparaciones de T. cruzi frescos, con menos de 9 horas de preparados y conservados en hielo. La determinación del valor g se realizó por comparación directa con standards conocidos (Mason y Holtzman, 1975). La simulación por computadora de los espectros se realizó utilizando un equipo Varian 620-i conectado al espectrómetro.

Determinación de la formación de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno.

La producción de anión superóxido fue determinada por el ensayo del adrenocromo (Misra y Fridovich, 1977) midiendo la absorbancia a 480 menos 575 nm y utilizando un coeficiente de absorción (ϵ) de $2.96 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La mezcla de reacción contenía epinefrina 1 mM, NADH ó NADPH y la solución amortiguadora en las concentraciones que se indican en las leyendas de las figuras.

La generación de H_2O_2 fue determinada por el ensayo de la peroxidasa de rábano rusticano (Boveris y col. 1977), midiendo la absorbancia a 417 menos 402 nm ($\epsilon = 50 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía 0.3-0.8 μM de peroxidasa (HRP), NADH ó NADPH y la solución amortiguadora que se indica en las leyendas de las figuras. Se utilizó un espectrofotómetro Aminco-Chance (American Instruments Company, Silver Springs, Maryland, USA). Todas las determinaciones se hicieron a 30 °C. Las proteínas se determinaron por el método de biuret (Gornall y col. 1949).

Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió en un polarógrafo Gilson, utilizando un electrodo de Clark o un electrodo de platino, utilizando las soluciones que se indican en las leyendas de las figuras. Los ensayos se hicieron a 30 °C.

Oxidación de NADPH

La oxidación de NADPH en presencia de nifurtimox se midió a 340 nm en un espectrofotómetro Gilford 2000 a 30 °C. La fracción microsomal (0.4 mg de proteína/ml) se suspendió en una solución de amortiguador fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$), pH 7.4 y KCl 130 mM y las adiciones que se indican en las Tablas correspondientes.

Los radicales superóxido fueron generados por el sistema de la xantino oxidasa (Fridovich, 1970). Los radicales oxhidrilo fueron generados en presencia de quelatos de hierro (Halliwell, 1978) o por el reactivo de Fenton (Buettner y Oberley, 1979) como se describe en Resultados. La reducción anaeróbica del nifurtimox en presencia de NADPH fue medida espectrofotométricamente a 400 nm ($\epsilon = 16 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) utilizando cubetas anaeróbicas Aminco.

Peroxidación lipídica

El método del ácido tiobarbitúrico de determinación de malondialdehído, producto derivado de la peroxidación lipídica, se realizó según Placer y col. (1966). La peroxidación lipídica in vivo se determinó midiendo conjugados dieno por absorción ultra violeta de los extractos lipídicos de los homogenados de hígado de rata por el método de Klaassen y Plaa (1969).

Ensayos de glutatión

El glutatión fue determinado en los homogenados de hígado por el método de Ellman (1959) según la modificación de Sedlack y Lindsay (1968). Con este método se determina principalmente GSH ya que no se han observado diferencias entre los niveles de GSH determinados enzimáticamente y los determinados utilizando el reactivo de Ellman (Morón y col. 1979). El GSSG se determinó en las muestras de bilis siguiendo la utilización de NADPH a 340 nm luego de la adición de glutatión reductasa (0.1 U/ml) a una solución conteniendo amortiguador fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KHPO}_4$) 50 mM, pH 7.0 y EDTA 1 mM. El glutatión total, es decir GSH más 2 GSSG, fue determinado por el método catalítico utilizando glutatión reductasa y 5,5'-ditiobis-(nitrobenzoico) (Owens y Belcher, 1965; Tietze, 1969). Los re-

sultados de GSH son los que resultan de sustraer los valores de GSSG obtenidos por el ensayo de GSSG de los valores de glutatión total.

Determinación de actividades enzimáticas.

Las actividades de GSSG reductasa y de GSH peroxidasa se determinaron a 30 °C en extractos provenientes de homogenados de hígado de rata hechos en amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1 % en la relación de 10 ml/g de hígado, luego de centrifugar a 105000 g durante 60 min. Los ensayos se realizaron en el mismo amortiguador. Para la GSSG reductasa, la oxidación de NADPH se siguió a 340 nm en presencia de GSSG 0.5-1.0 mM. Para el ensayo de la glutatión peroxidasa, la oxidación de NADPH se siguió en presencia de GSH 1 mM y 0.1 U/ml de glutatión reductasa de levadura y 0.5 mM de hidroperóxido de ter-butilo. Se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer 550-S.

Espectrofotometría de muestras de bilis y orina.

La bilis y la orina provenientes de las ratas tratadas con nifurtimox se diluyeron en 100 volúmenes de amortiguador KCl-Tris (150 mM, 50 mM, pH 7.4) y el espectro diferencial se registró contra bilis y orina de ratas controles. Una solución de nifurtimox en dimetilsulfóxido-etanol (50 % V/V) fue diluida en el mismo amortiguador y su espectro fue registrado contra el amortiguador sin la droga en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 550-S.

Microscopía electrónica.

Los testículos de las ratas controles y de las ratas tratadas con nifurtimox (100 mg/kg de peso por día) fueron fijados en glutaraldehído al 2.5 % en solución de fosfato 0.1 M (pH 7.2) durante 1 hora a temperatura ambiente, postfijados en OsO₄ al 1 % en solución de fosfato 0.1 M (pH 7.2) durante 1 hora a 4 °C, deshidratados en etanol y embebidos en Epon. Las secciones fueron teñidas con citrato de plomo y observadas en un microscopio electrónico Siemens Elmiskop 1 A.

RESULTADOS

Generación de radicales libres inducida por el nifurtimox en las diferentes formas del Trypanosoma cruzi.

Generación del radical aniónico del nifurtimox

La incubación de nifurtimox con un homogenado de amastigotes, de T. cruzi en presencia de nucleótidos de piridina (NAD(P)H) llevó a la formación del radical aniónico derivado. La estructura hiperfina de la señal fue similar a la de la obtenida por simulación, lo que permitió su identificación.

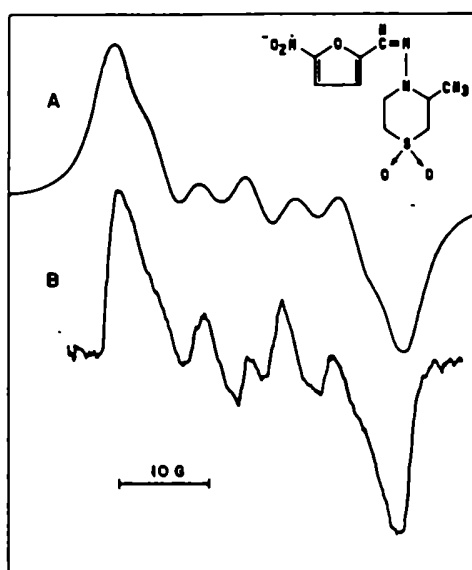


Fig. 3. Línea A. Espectro simulado por computadora del radical aniónico del nifuroxime. Se utilizaron las siguientes constantes de acoplamiento: $a_{\text{N}}^{\text{NO}} = 11.43 \text{ G}$; $a_{\text{H}}^{\text{H}} = 1.52 \text{ G}$; $a_{\text{H}}^{\text{H}} = 0.89 \text{ G}$; $a_{\text{N}}^{\text{NOH}} = 0.24 \text{ G}$ (Greenstock y col² 1973), ancho de línea, $a = 3.5 \text{ G}$. Línea B. Espectro de rpe del radical aniónico del nifurtimox luego de la incubación anaeróbica de nifurtimox 1 mM con un homogenado de amastigotes (5.6 mg proteína/ml) y NADH 0.7 mM en un medio anaeróbico conteniendo KCl 130 mM y amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4. La señal tiene un $g = 2.0044$. Las condiciones para las medidas de rpe fueron: poder, 50 mV, amplitud de modulación, 2.0 G; frecuencia, 9.5 GHz, velocidad de barrido, 25 G/min, ganancia, 3.2×10^4 .

La Fig. 3(B) muestra la señal de resonancia paramagnética electrónica (rpe) obtenida luego de la incubación del nifurtimox con el homogenado de amastigotes en presencia de NADH. La señal fue casi idéntica a la obtenida por simulación por computadora del radical aniónico del nifuroxime, otro nitrofurano (Fig. 3(A)).

Los radicales derivados de compuestos nitroaromáticos no pueden ser detectados en soluciones aereadas (Mason y Holtzman, 1975). Coincidiendo con esto, se observó que en mezclas aereadas el espectro del radical aniónico del nifurtimox sólo pudo ser detectado luego de un período de inducción (Fig. 4). Este período de inducción fue menor en presencia de mayores concentraciones de

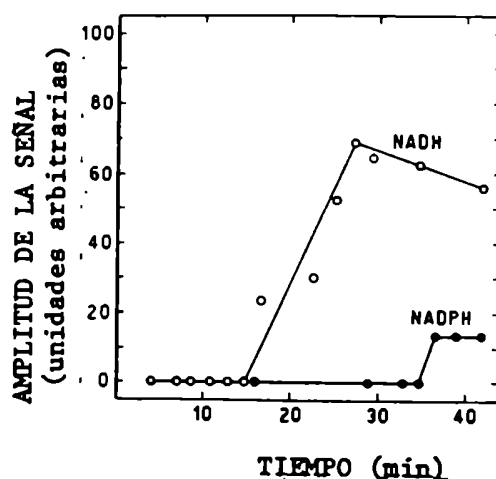


Fig. 4. Cambios en la amplitud de la señal de rpe luego de añadir la mezcla del homogenado de amastigotes (2.7 mg proteína/ml) con nifurtimox y NADH (o) o NADPH (o), en un medio saturado con O_2 . Condiciones como en la Fig. 3. La amplitud de la señal se mide en unidades arbitrarias.

proteína o en soluciones parcialmente deaereadas. Esto sugiere que

se produjo el agotamiento del oxígeno del medio, es decir, la solución se hizo anaerobia debido a la reacción (13):



A continuación del período de inducción se alcanzó un estado estacionario.

La formación del radical dependió de los tres componentes del sistema ya que la falta de nucleótidos de piridina o de nifurtimox o la inactivación térmica de los homogenados en un baño a 100 °C durante 10 min previno la aparición de la señal del radical libre. El NADH fue más efectivo que el NADPH como fuente de equivalentes de reducción. Se obtuvieron resultados similares con homogenados de epi- o tripomastigotes (datos omitidos).

La formación del radical aniónico del nifurtimox también pudo ser detectada en células enteras. La Fig. 5 muestra la cinética de aparición del radical libre del nifurtimox luego de añadir el nitrofurano a suspensiones de epimastigotes (E) o tripomastigotes (T) de T. cruzi. Ya que en estos casos no estaban presentes sustratos exógenos, los metabolitos endógenos actuaron como dadores de electrones para la reducción del nifurtimox. El período de inducción fue más corto y la amplitud relativa de la señal fue mayor en presencia del mismo número de tripomastigotes que de epimastigotes.

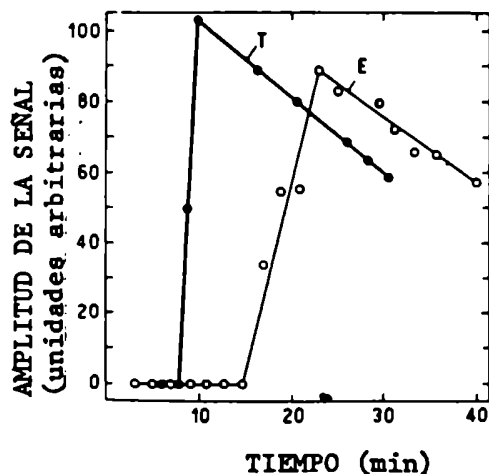


Fig. 5. Cambios en la amplitud de la señal de rpe luego de mezclar 10^8 epimastigotes (E) o tripomastigotes (T)/ml, con un medio saturado con O_2 conteniendo nifurtimox 1 mM. Otras condiciones experimentales como se describen en la Fig. 2 y en Materiales y Métodos.

Las Figs 6 y 7 muestran la cinética de aparición del radical aniónico derivado del nifurtimox en la fracción mitocondrial (6) y microsomal (7) de epimastigotes de T. cruzi. El período de inducción fue más corto y la amplitud relativa de la señal fue mayor en la fracción mitocondrial en presencia de NADH y en la fracción microsomal en presencia de NADPH.

Estimulación del consumo de oxígeno cianuro insensible y de la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno .

Como se observa en la Tabla 4, el nifurtimox produjo una estimulación inicial de la respiración cianuro-insensible de los epimastigotes de T. cruzi, aunque luego de incubaciones prolongadas ocurrió una inhibición (datos omitidos). En ausencia de epimastigotes el nifurtimox no estimuló el consumo de oxígeno. La estimula

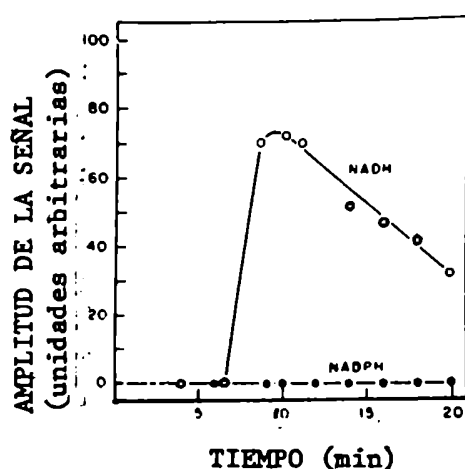


Fig. 6. Cambios en la amplitud de la señal de rpe con el tiempo luego de mezclar la fracción mitocondrial (2.0 mg de proteína/ml) de T. cruzi con una solución saturada de O_2 de nifurtimox 1.0 mM con NADH o NADPH 0.7 mM. Las condiciones para las determinaciones como en la Fig. 4.

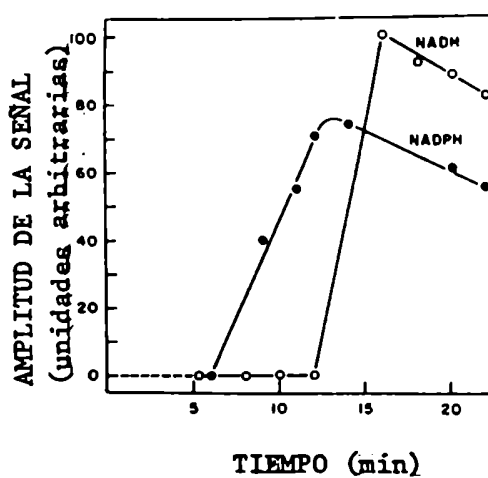


Fig. 7. Cambios en la amplitud de la señal de rpe con el tiempo luego de mezclar la fracción microsomal (0.3 mg de proteína/ml) de T. cruzi con una solución saturada de O_2 de nifurtimox 1.0 mM con NADH o NADPH 0.7 mM. Las condiciones para las determinaciones como en la Fig. 4.

ción en el consumo de oxígeno cianuro-insensible de los epimastigotes reveló que el radical aniónico derivado del nifurtimox pudo transferirle electrones al oxígeno determinando la generación de anión superóxido (reacción(15)). Esta reacción pudo revelarse midiendo la generación de O_2^- por los homogenados luego de la adición

Tabla 4. Efecto del nifurtimox sobre la respiración del T. cruzi

Nifurtimox (mM)	Consumo de oxígeno (nmol O_2 /min por mg de proteína)
0	3.9 \pm 0.9
0.01	4.9 \pm 0.8 (0.2 > P > 0.1) ^c
0.1	5.2 \pm 0.5 (0.1 > P > 0.01)
1.0	9.2 \pm 3.4 (P < 0.001)

^aLa mezcla de incubación tenía amortiguador Tris-HCl 35 mM (pH 7.2) amortiguador fosfato 5 mM (pH 7.2), NaCl 5 mM, KCl 0.1 mM, KCN 1 mM y epimastigotes (4.0 mg de proteína/ml). El nifurtimox se añadió a las concentraciones indicadas. El consumo de O_2 se midió en un polarógrafo Gilson con electrodo de platino.

^bMedia \pm DS (cuatro determinaciones independientes)

^cSignificación de la diferencias entre las muestras tratadas con nifurtimox y las controles, según el test de t

ción del nifurtimox en presencia de un dador de electrones. La Fig. 8 muestra el estímulo de la formación de O_2^- que se obtuvo luego de la adición de nifurtimox a un homogenado de amastigotes en presencia de NADPH. La adición posterior de superóxido dismutasa inhibió la formación de adrenocromo indicando la participación del O_2^- en la reacción. La omisión de NAD(P)H o del homogenado de la mezcla de incubación previno la formación de adrenocromo. Se pudieron obtener resultados similares con homogenados de epi- o tripomastigotes (da

tos experimentales omitidos).

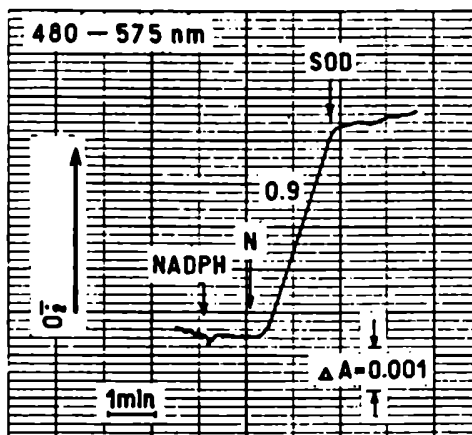


Fig. 8. Efecto del nifurtimox sobre la producción de O_2 por un homogenizado de amastigotes. El medio de reacción contenía el homogenizado (0.4 mg de proteína/ml), epinefrina 1 mM, KCl 130 mM, amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4. Donde se indica, se agregaron NADPH 0.7 mM, nifurtimox 0.1 mM (N) y superóxido dismutasa (SOD, 3.3 μ g/ml). El valor cerca del trazado indica nmol de O_2 /min por mg de proteína. Otras condiciones como en Materiales y Métodos.

Como se mencionó anteriormente (Introducción), la fracción mitocondrial de *T. cruzi* genera activamente O_2 en presencia de NADH (Fig. 9). La adición de nifurtimox a esta fracción suplementada con NADH, estimuló la producción de O_2 casi linealmente hasta una concentración de nifurtimox de 20 μ M, en cuyo caso la velocidad basal se incrementó tres veces. Con NADPH y succinato como agentes reductores se observaron menores efectos.

La producción de O_2 por la fracción microsomal también fue estimulada por nifurtimox (Fig. 10). En presencia de NADPH, el nifurtimox fue capaz de estimular la generación de O_2 en aproximadamente dos veces a la concentración de 40 μ M. Con NADH como dador

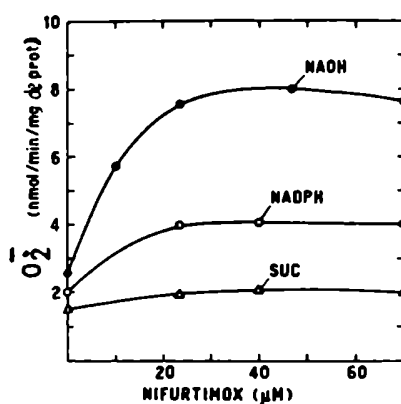


Fig. 9. Efecto del nifurtimox sobre la producción mitocondrial de O_2 en T. cruzi. El medio de incubación contenía manitol 0.23 M, sacarosa 0.07 M, amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, epinefrina 1 mM y 0.1-0.4 mg de proteína. Donde se indica se añadieron NADH o NADPH 40 μ M y succinato (SUC) 3 mM.

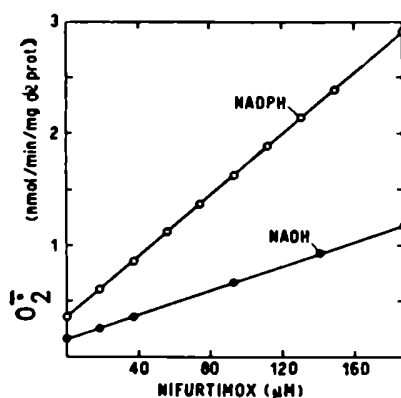


Fig. 10. Efecto del nifurtimox sobre la generación microsomal de O_2 en T. cruzi. La mezcla de incubación contenía KCl 130 mM, amortiguador fosfato de potasio 20 mM, pH 7.2. Donde se indica se añadió NADH o NADPH 40 μ M. En todos los casos la formación de adrenocromo se inhibió añadiendo 5 μ g de SOD/ml. Otras condiciones como en Materiales y Métodos.

de electrones se observaron efectos mucho menos acentuados. La estimulación de la formación de adrenocromo no ocurrió en ausencia de las fracciones mitocondrial o microsomal ya sea con NADH, NADPH o succinato.

La adición de nifurtimox a células intactas de T. cruzi de terminó también la liberación de H_2O_2 al medio de suspensión (Fig. 11).

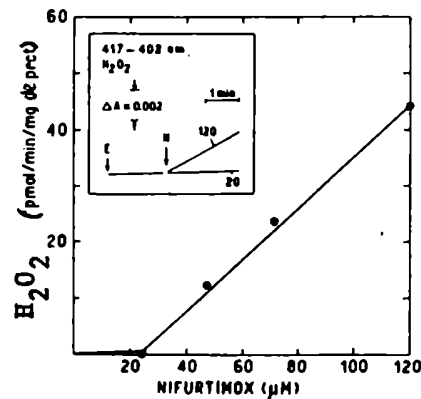


Fig. 11. Efecto del nifurtimox sobre la liberación de H_2O_2 por epimastigotes intactos. La mezcla de incubación contenía amortiguador fosfato 5 mM, amortiguador Tris-HCl 35 mM, pH 7.2, NaCl 5.0 mM, KCl 0.1 mM, peroxidasa de rábano rusticano 0.6 μ M y epimastigotes (0.1-0.2 mg de proteína/ml). Inserto: trazados originales mostrando la producción de H_2O_2 inducida por nifurtimox en los epimastigotes. E y N, adición de epimastigotes y nifurtimox, respectivamente. Los números indican la concentración de nifurtimox (μ M). Otras condiciones como se describe en Materiales y Métodos.

Finalmente la producción de H_2O_2 también fue estimulada por el nifurtimox en homogenados de las diferentes formas del T. cruzi (Tabla 5), siendo el efecto del nifurtimox más acentuado con el homogenado de los amastigotes. La nitrofurantoina, un nitrofurano prácticamente inactivo contra el T. cruzi fue incapaz de estimular la generación de H_2O_2 por los homogenados.

TABLA 5. EFECTO DEL NIFURTIMOX SOBRE LA PRODUCCION DE H_2O_2 POR HOMOGENADOS DE T. cruzi.*

Adiciones	Formas de <u>T. cruzi</u>		
	Amastigote	Epimastigote	Tripomastigote
NADH	23.3 ± 5.2(a)*	12.7 ± 2.9(e)	6.3 ± 2.1(j)
NADH + nifurtimox	38.3 ± 9.5(b)	29.0 ± 8.2(f)	25.7 ± 2.4(k)
NADH + nitrofurantoina	ND	10.4 ± 3.2(g)	ND
NADPH	14.0 ± 0.9(c)	14.7 ± 5.7(h)	4.2 ± 0.6(l)
NADPH + nifurtimox	39.2 ± 9.6(d)	19.3 ± 2.6(i)	17.6 ± 3.0(m)

* La mezcla de reacción contenía KCl 130 mM, amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4, NAD(P)H 0.3 mM y 0.4 mg de proteína de los homogenados, en un volumen total de 1.5 ml. Temperatura 30 °C. Donde se indica se añadió el nitrofurano a una concentración de 0.1 mM. Otras condiciones experimentales como se describen en Materiales y Métodos. Los valores indican nmoles H_2O_2 /min por mg de proteína.

** Media ± DS (tres determinaciones independientes). Análisis de varianza a,b,j,k, 0.02 > P > 0.01; c,d,e,f, 0.01 > P > 0.001; e,g,h,i, 0.3 > P > 0.2; l,m, 0.05 > P > 0.02.

Inhibición del crecimiento

Las concentraciones de nifurtimox capaces de incrementar la generación de O_2^- y H_2O_2 por los epimastigotes y las fracciones subcelulares fueron efectivas en inhibir el crecimiento del parásito (Fig. 12).

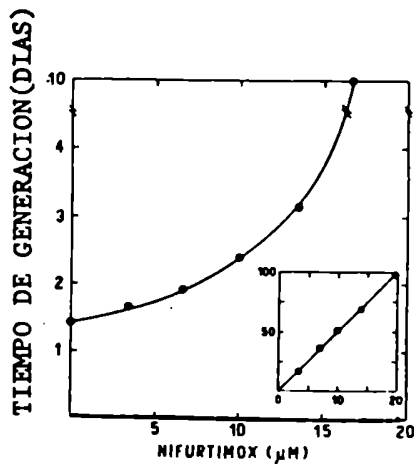


Fig. 12. Efecto del nifurtimox sobre el crecimiento del T. cruzi. Condiciones experimentales como se describen en Materiales y Métodos. El tiempo de generación es el tiempo (T) requerido para que el número de células se duplique durante el período logarítmico de crecimiento. Inserto: Porcentaje de inhibición del crecimiento calculado de la constante de crecimiento ($k = 0.69/T$) a diferentes concentraciones de nifurtimox.

Alteraciones ultraestructurales producidas por el nifurtimox

Las observaciones ultraestructurales demuestran que el nifurtimox induce severas alteraciones de las diferentes formas del Trypanosoma cruzi. Estas alteraciones incluyen la aparición de vacuolas citoplasmáticas, la reducción del número de ribosomas citoplasmáticos, y el hinchamiento de la mitocondria (Fig. 12 bis). La alteración inicial más característica es la aparición de masas densas homogéneas en la matriz mitocondrial ya sea cerca del cinetoplasto o en otras regiones de la célula (Fig. 12 bis).

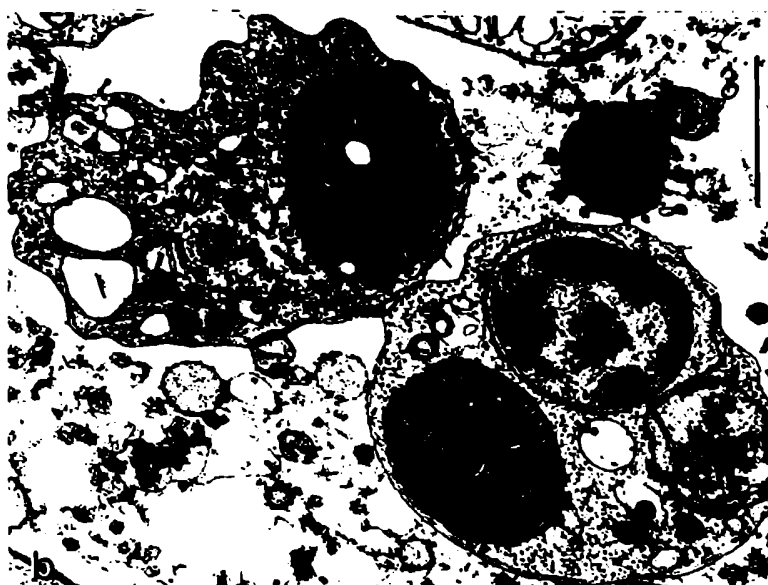


Fig. 12 bis. Microfotografía electrónica de amastigotes de Trypanosoma cruzi tratados con nifurtimox. Se muestra el hinchamiento de la mitocondria, la desaparición de ribosomas citoplasmáticos, las alteraciones de la membrana nuclear y la aparición de masas densas en la mitocondria de la célula. X 40.000. Tomado de Hoffman, 1972.

Generación de radicales libres inducida por el nifurtimox en tejidos de mamífero.

Formación del radical aniónico del nifurtimox.

La incubación de nifurtimox con microsomas de hígado de rata en presencia de NADPH llevó a la formación del radical aniónico derivado del nitrofurano. La estructura hiperfina de la señal fue similar a la de la obtenida por simulación lo que permitió su identificación. La Fig. 13 A, muestra la señal de rpe obtenida luego de la incubación del nifurtimox con microsomas en presencia de NADPH. La señal fue casi idéntica a la obtenida por simulación por computadora (Fig. 13 B).

En mezclas aereadas el espectro del radical proveniente del nifurtimox pudo ser observado sólo después de un período de inducción (Fig. 14). Este período de inducción fue menor en presencia de mayores concentraciones de proteína o en soluciones parcialmente deaereadas, lo que sugiere el agotamiento del oxígeno del medio, es decir, la solución se hizo anaerobia debido a la reacción (13):



A continuación del período de inducción se alcanzó un estado estacionario. La concentración del radical en estado estacionario fue proporcional a la raíz cuadrada de la concentración de proteína (Fig. 15), lo que indica que la terminación del radical siguió una cinética de segundo orden, reflejando su dismutación al nitrosoderivado (Peterson y col. 1979).

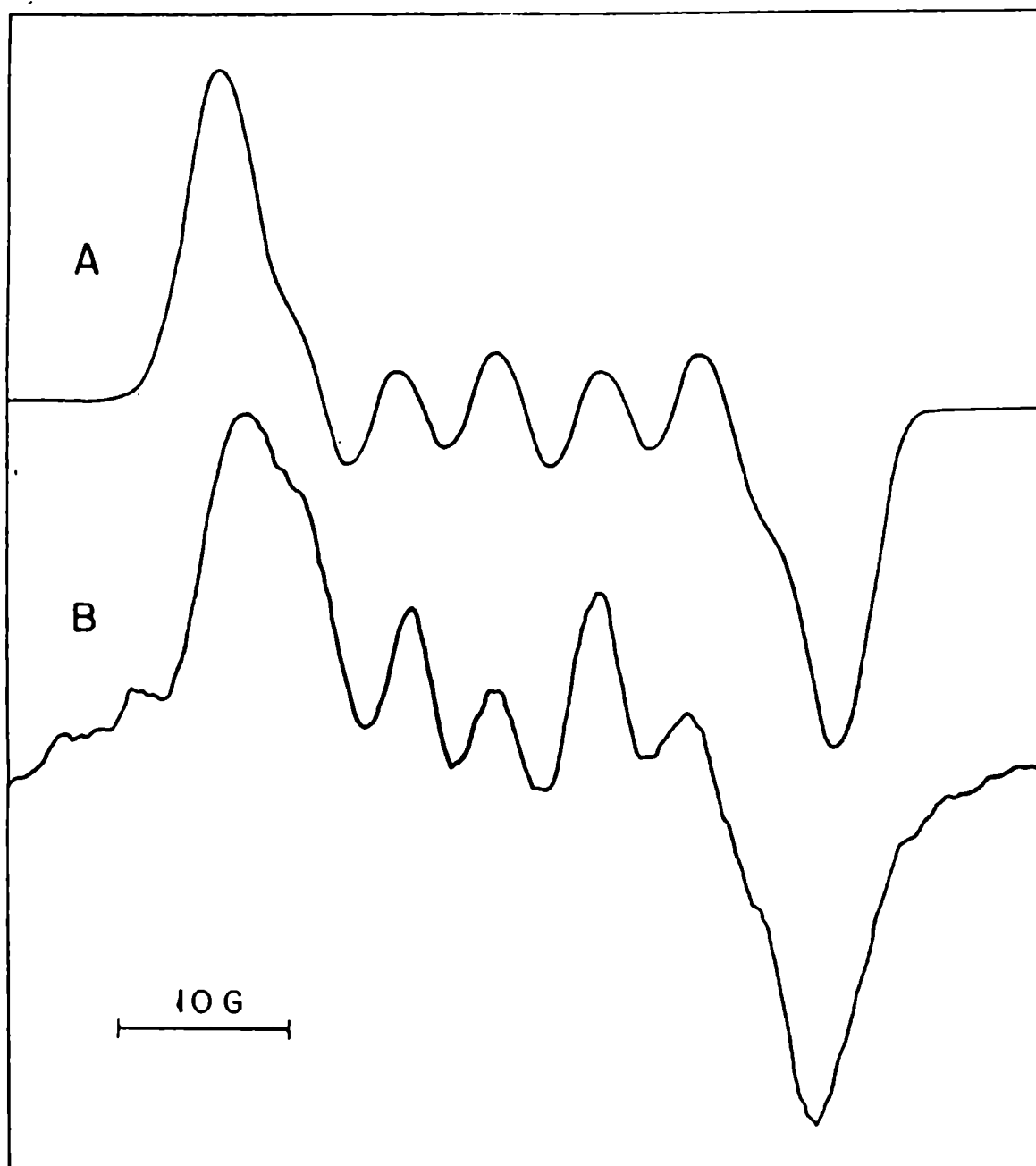


Fig. 13. Espectro de rpe del nifurtimox. B. Espectro formado luego de la incubación de microsomas (1 mg/ml), nifurtimox 1 mM y un sistema generador de NADPH formado por NADP^+ (0.38 mM), glucosa-6-fosfato (5.5 mM), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (0.67 unidades/ml) El espectro se obtuvo con una amplitud de modulación de 0.5 G y un poder de 20 mW. Otras condiciones como en Materiales y Métodos y en la Fig. 3. A. El espectro del radical aniónico del nifurtimox analizado por simulación con computadora. Las constantes de acoplamiento fueron: $a_{\text{NO}_2}^{\text{N}} = 11.2 \text{ G}$; $a_4^{\text{H}} = 7.3 \text{ G}$; $a_3^{\text{H}} = 1.15 \text{ G}$; $a_{\text{C=N}}^{\text{N}} = 2.25 \text{ G}$; $a_{\text{N-H}}^{\text{N}} = 1.45 \text{ G}$. El valor $g = 2.0041$.

La formación del radical dependió de los tres componentes: microsomas, NADPH y nitrofurano. La omisión de NADPH o el calentamiento de los microsomas a 100 °C durante 10 min llevó a una falta total de actividad. El sistema generador de NADPH no produjo concentraciones observables del radical aniónico nitroaromático.

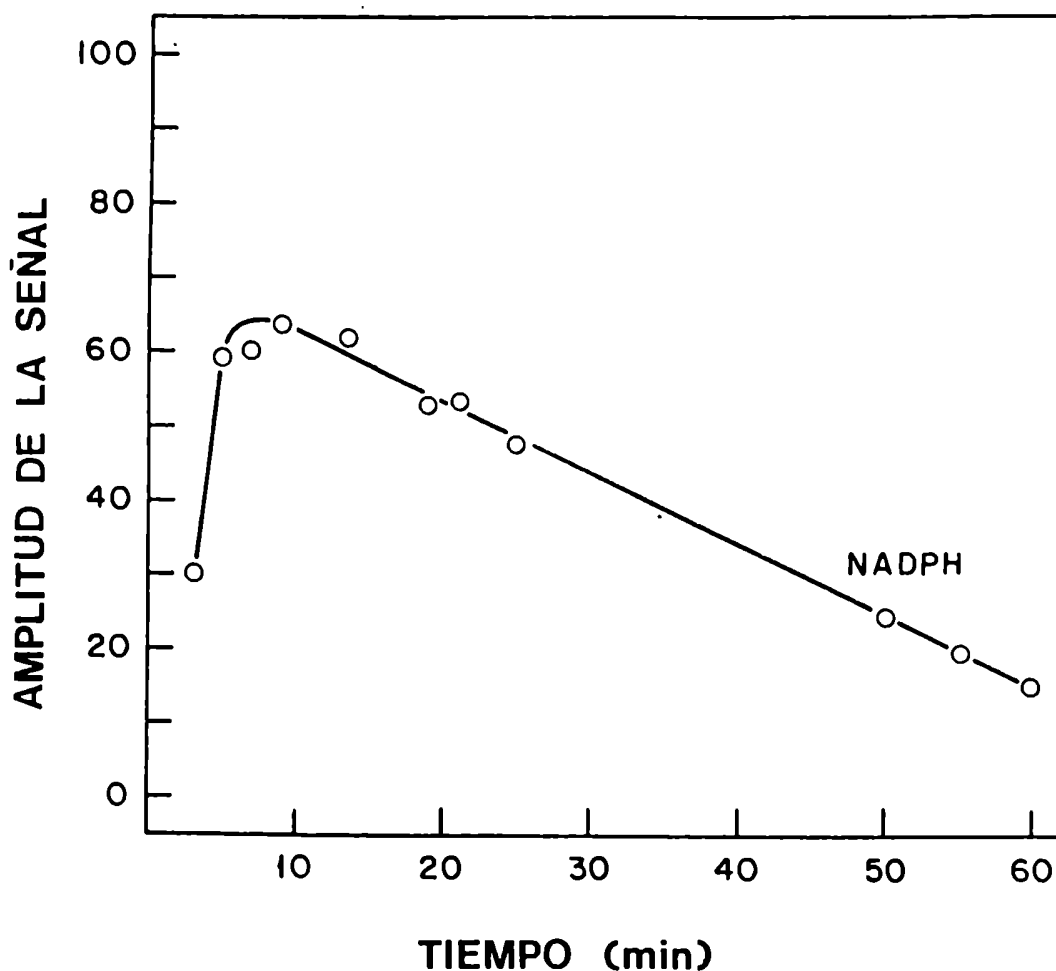


Fig. 14. Cambios en la amplitud de la señal de rpe del nifurtimox luego de mezclar 0.4 mg de microsomas de hígado de rata con una solución saturada de O_2 de nifurtimox 1 mM y NADPH 1 mM (sistema generador). Otras condiciones experimentales como en la Fig. 13 y en Materiales y Métodos.

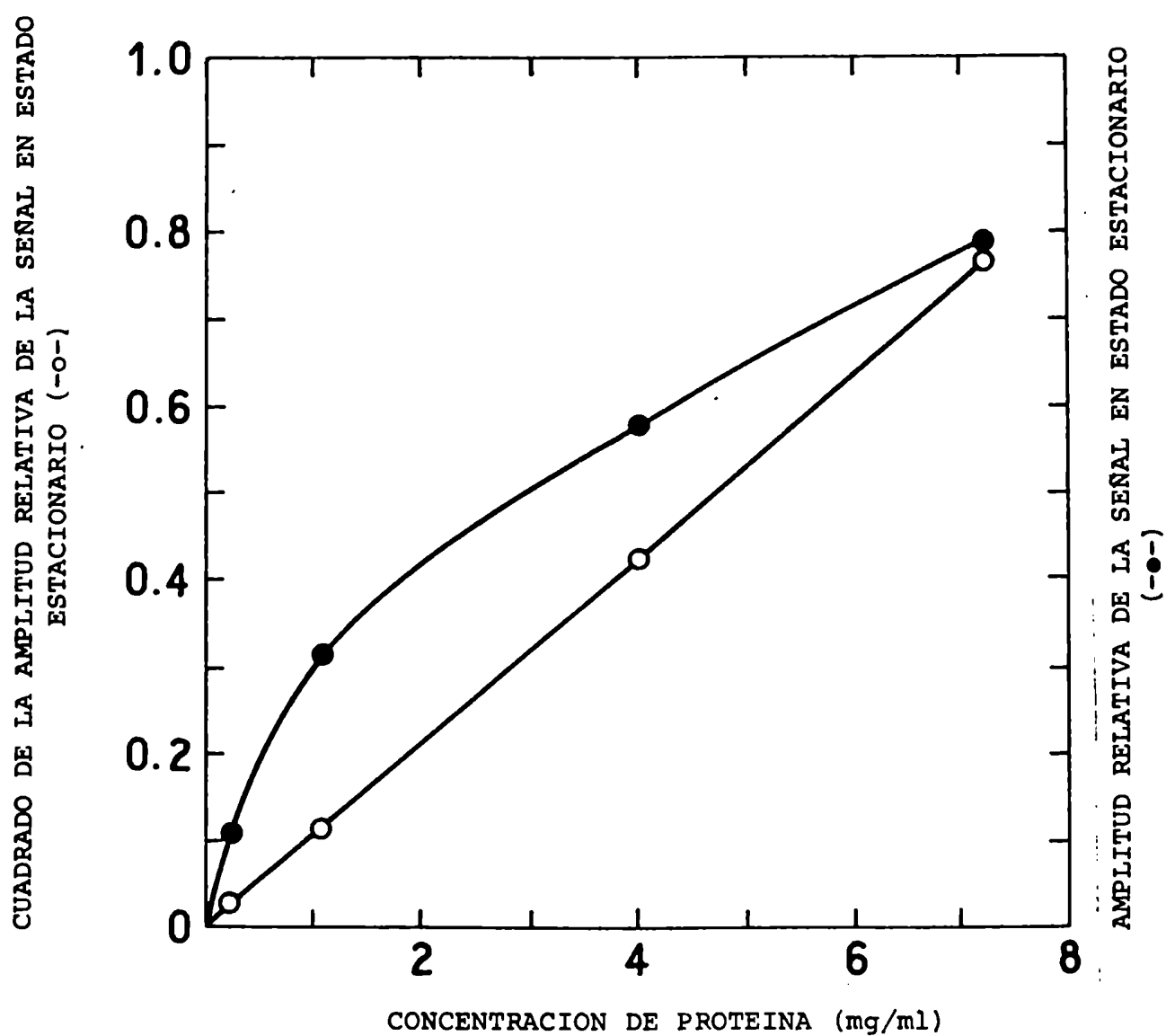


Fig. 15. Concentración en estado estacionario del radical aniónico del nifurtimox y concentración en estado estacionario del radical aniónico del nifurtimox al cuadrado versus la concentración de proteína de microsomas de hígado de rata.

El efecto de inhibidores específicos de la NADPH citocromo P-450 (c) reductasa, la DT diaforasa y del funcionamiento del citocromo P-450 sobre la formación del radical aniónico del nifurtimox por microsomas de hígado de rata se muestra en la Tabla 6. El dicumarol no disminuyó la concentración en estado estacionario del radical. La falta de inhibición por dicumarol descarta cualquier supuesto rol de la DT diaforasa microsomal (Ernster y Orrenius 1965) como nitrorreductasa. La inhibición que produjo el NADP^+ , un inhibidor competitivo de la NADPH citocromo P-450 (c) reductasa

TABLA 6. EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA FORMACION DEL RADICAL ANIONICO DEL NIFURTIMOX EN MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA.^a

Inhibidor	Porcentaje del control
Ninguno	100 ^b
Metopirona (1.0 mM)	98
CO	95
NADP^+ (1.0 mM)	30
pCMB (0.05 mM)	0
Dicumarol (0.1 mM)	103
Superóxido dismutasa (20 ug/ml)	100
Catalasa (1 mg/ml)	99

^a Las mezclas de reacción contenían 1.4 mg de proteína microsomal/ml. La reacción se inició agregando NADPH 0.7 mM. Las condiciones para las medidas como en la Fig. 13.

^b Calculado por comparación de las intensidades de las señales.

y el p-cloromercuribenzoato, un inhibidor irreversible de la misma enzima (Masters y col. 1965; Orrenius, 1965), indican que esta flavoproteína puede participar en la reducción del nifurtimox. La falta de inhibición de la formación del radical en presencia de CO o metopirona, dos inhibidores de la actividad del citocromo P-450 (Ernster y Nordenbrand, 1967), descartan su participación en el primer paso de la reducción del nifurtimox.

El efecto de la superóxido dismutasa y de la catalasa sobre la concentración en estado estacionario del radical aniónico del nifurtimox, también se muestra en la Tabla 6, e indica que estos intermediarios de la reducción parcial del oxígeno no están involucrados en la generación del radical.

La baja concentración en estado estacionario del radical derivado del nifurtimox en presencia del sobrenadante de 105000 g ó de las mitocondrias de hígado de rata, ya sea en presencia de NADH o de NADPH en relación con la obtenida con la fracción microsomal (datos omitidos) son consistentes con la localización microsomal de la nitrorreductasa.

Mason y Holtzman (1975) observaron la reducción de compuestos nitroaromáticos por un sistema modelo consistente en NADPH (10^{-3} M) y FMN (5×10^{-4} M). Este sistema modelo también determinó la formación del radical aniónico del nifurtimox (datos no mostrados). La concentración en estado estacionario no se modificó en la oscuridad, descartándose la reducción fotoquímica del nifurtimox a su radical aniónico. A altas concentraciones de flavina, el espectro del radical aniónico del nifurtimox se superpuso al de la FMNH[•] (Fig. 16 A), el producto de oxidación parcial por un electrón de

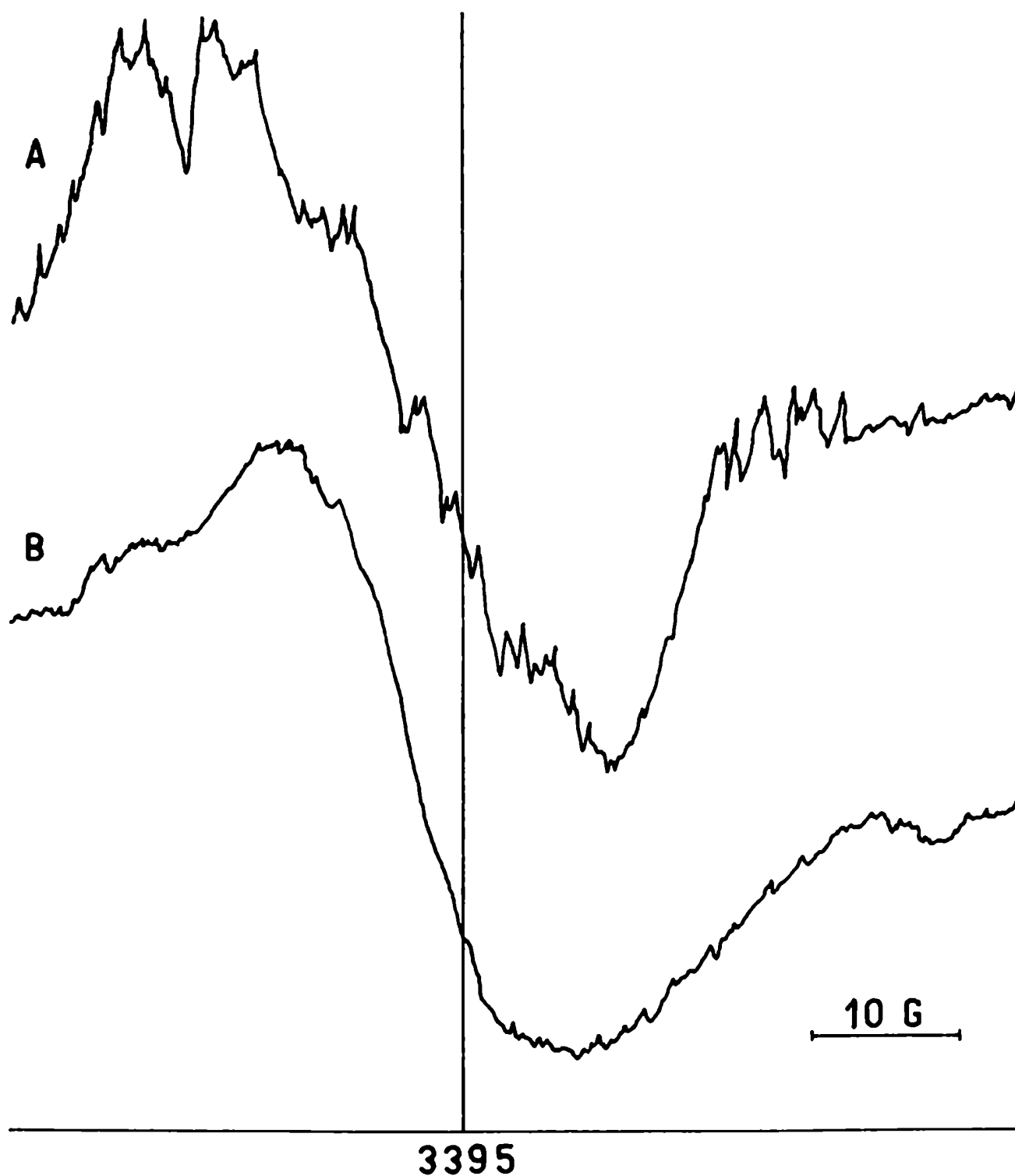


Fig. 16. En el espectro A, la señal del radical aniónico del nifurtimox está superpuesta a la de la semiquinona de la flavina. Luego de 80 min el radical aniónico del nifurtimox decae dejando el espectro B de la semiquinona de la flavina. La mezcla de reacción contenía FMN (10 mM), NADPH (20 mM) y nifurtimox (50 mM). Las condiciones para las medidas fueron: amplitud de modulación 0.63 G (A) ó 1.0 G (B); frecuencia aproximada, 9.5 GHz; velocidad de barrido, 12.5 G/min (A) ó 25 G/min (B); ganancia, 10.0×10^4 (A) ó 3.2×10^4 (B); voltaje, 50 mV.

la FMNH₂, indicando que la formación del radical semiquinona de la flavina ocurre durante la formación del radical aniónico del nifurtimox por la transferencia de un electrón. Luego de 80 min de incubación la señal del radical aniónico del nifurtimox decayó dejando el espectro de la Fig. 16 B de la semiquinona de la flavina.

En las ratas, los órganos blanco de la toxicidad de, nifurtimox son además del hígado, el cerebro y los testículos (Hoffman, 1972). Las Figs. 17 y 18 muestran el tiempo que demoró en aparecer la señal del radical aniónico del nifurtimox luego de la adición de homogenado de cerebro de rata (Fig. 17) o de homogenado de testículos de rata (Fig. 18) en presencia de NADH o de NADPH. La señal apareció también luego de un período de inducción, creció en intensidad y posteriormente decayó. La concentración en estado estacionario fue mayor en presencia de NADPH con los homogenados de cerebro y en presencia de NADH con los homogenados de testículo.

Estimulación del transporte de electrones y la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno.

Esta bien establecido que los microsomas hepáticos consumen O₂ utilizando NADPH como co-sustrato (Orrenius y col. 1965). La Fig. 19 muestra que el consumo de oxígeno por los microsomas fue incrementado varias veces cuando se introdujo nifurtimox a la mezcla de reacción. El incremento en el consumo de O₂ determinado por el nifurtimox dependió de todos los componentes del sistema, sien

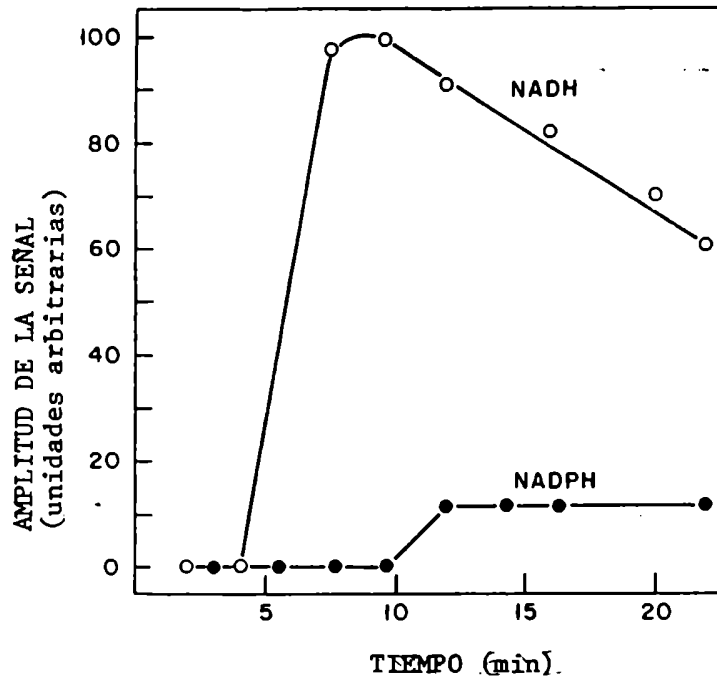


Fig. 17. Cambios en la amplitud relativa de la señal de rpe del radical obtenido luego de la mezcla de 7.0 mg/ml de homogenado de cerebro de rata con una solución saturada de O_2 conteniendo nifurtimox 1.0 mM, NADH 0.7 mM ó un sistema generador de NADPH. Condiciones experimentales como en la Fig. 14 y en Materiales y Métodos.

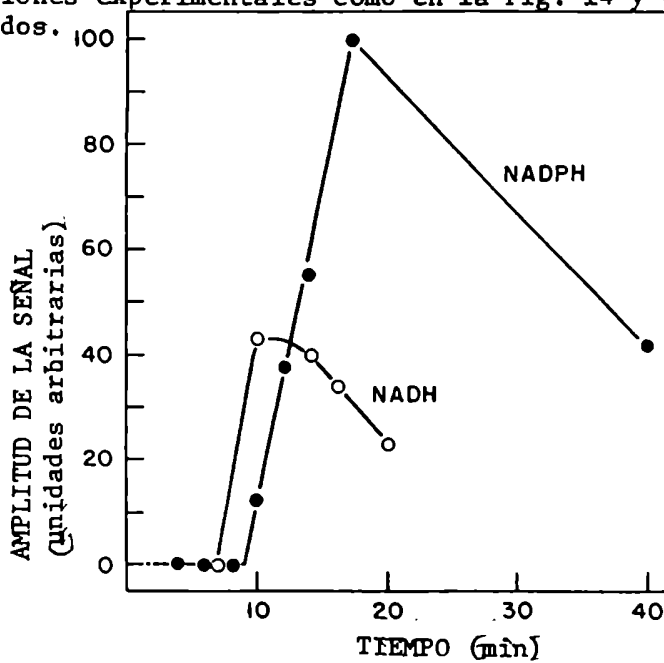


Fig. 18. Cambios en la amplitud relativa de la señal de rpe del radical obtenido luego de la mezcla de 9.6 mg/ml de homogenado de testículos de rata con una solución saturada de O_2 conteniendo nifurtimox 1.0 mM, NADH 0.7 mM ó un sistema generador de NADPH. Condiciones como en la Fig. 14 y en Materiales y Métodos.

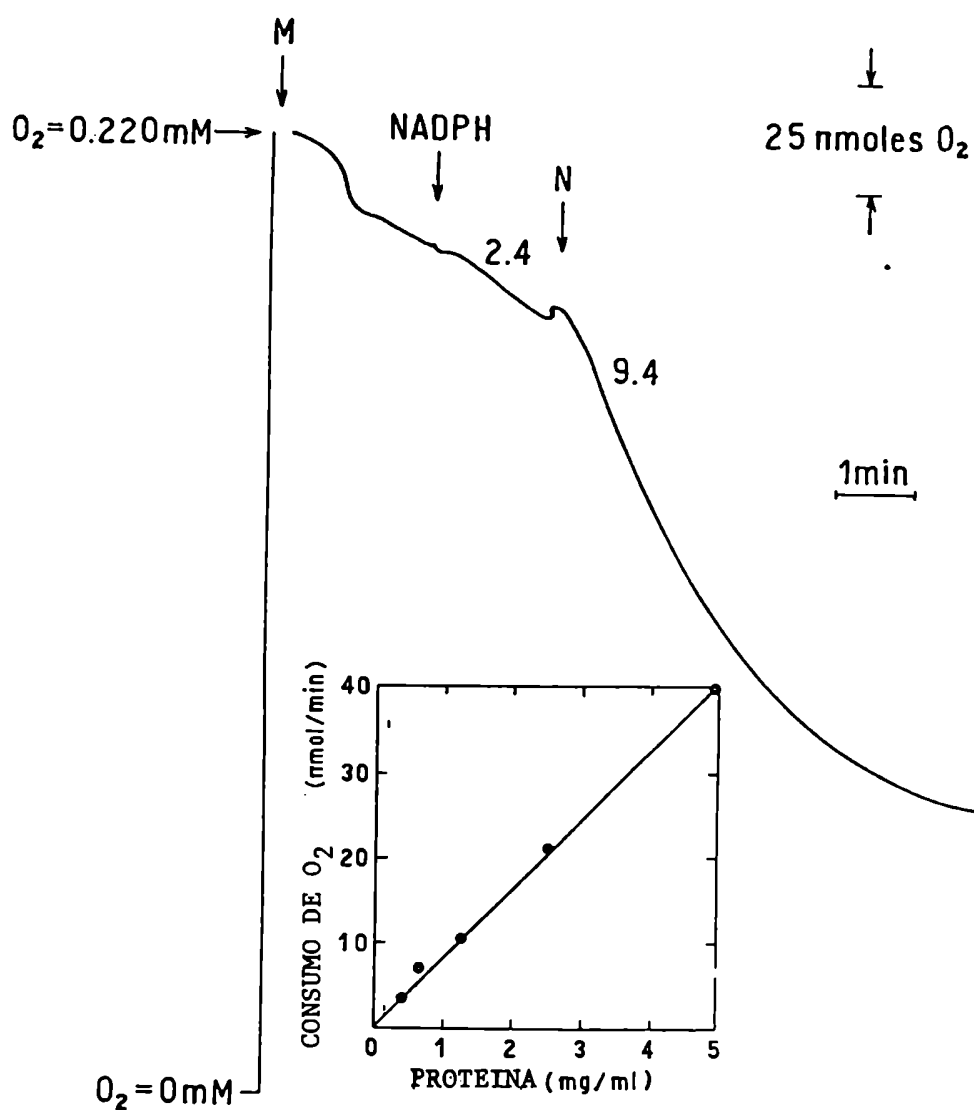


Fig. 19. Efecto del nifurtimox sobre el consumo de O_2 por microsomas de hígado de rata. La mezcla de reacción contenía microsomas (3.6 mg de proteína/ml) y amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4, NADPH 0.5 mM y nifurtimox (N) 0.3 mM. Inserto: dependencia del efecto del nifurtimox sobre la concentración de proteína. Otras condiciones experimentales como se describen en Materiales y Métodos. Los valores indican nmoles O_2 /min por mg de proteína.

do la velocidad de reacción despreciable en ausencia de NADPH o de microsomas o luego de la desnaturalización térmica de los microsomas (datos omitidos). Se pudo establecer una relación lineal entre el consumo de O_2 estimulado por nifurtimox y la concentración de proteína (Fig. 19, inserto).

La curva de concentración-efecto para el nifurtimox se muestra en la Fig. 20. Se observa que la estimulación del consumo de O_2 está de acuerdo con una cinética de saturación ($K_M = 0.45$ mM; $V_{m\acute{a}x.} = 16.6$ nmol/min por mg de proteína).

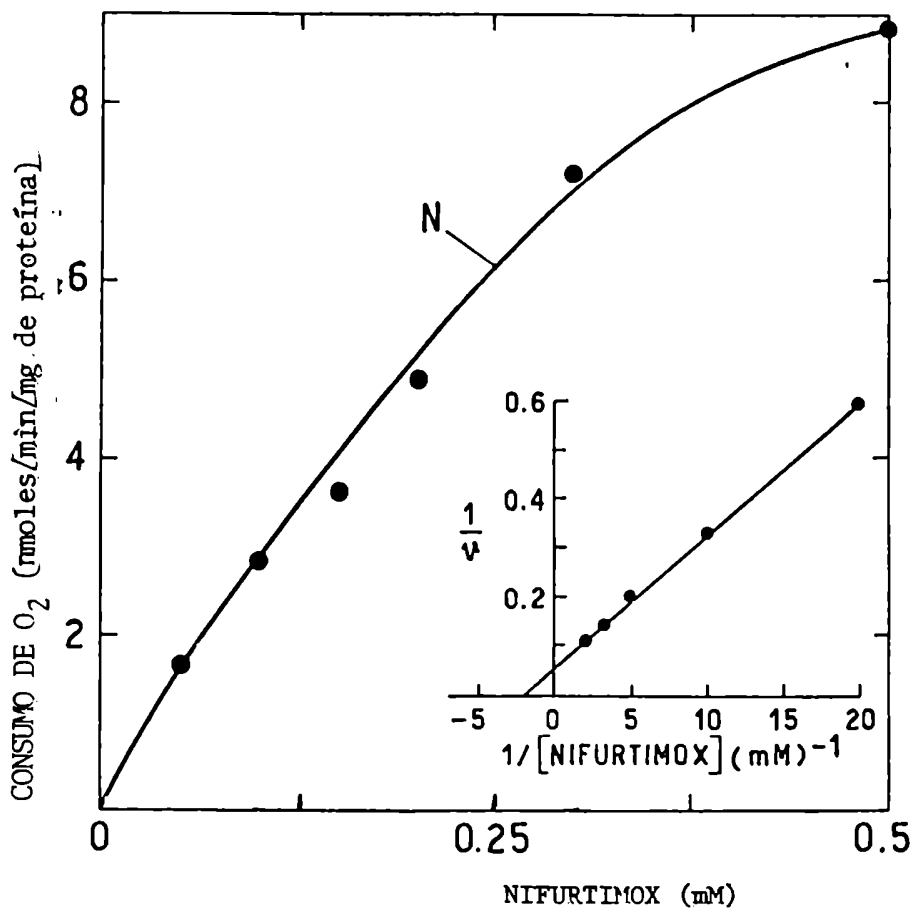


Fig. 20. Efecto de diferentes concentraciones de nifurtimox (N) sobre el consumo de O_2 . Inserto: gráfico de Lineweaver-Burk para el nifurtimox. Las condiciones experimentales como se describen en la Fig. 19 y en Materiales y Métodos. Los valores endógenos se restaron.

El exámen de diferentes fracciones celulares de hígado de rata en cuanto a su respuesta al nifurtimox, mostró que los microsomas constitufan el componente subcelular más activo (Tabla 7). Con NADPH como dador de electrones, la utilización de O_2 mostró una estimulación de cuatro veces en presencia de nifurtimox 0.3 mM. La respuesta de la fracción citosólica y mitocondrial al nifurtimox fue relativamente menor (se incrementó 1.5-2 veces la velocidad de utilización de O_2).

TABLA 7. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL CONSUMO DE O_2 INDUCIDO POR NIFURTIMOX.^a

Fracción celular (mg de proteína/ml)	Consumo de O_2 (nmoles/min por mg de proteína)	
	Endógeno	Inducido por nifurtimox
Microsomal (4.4)	2.2 \pm 0.3 ^b	9.1 \pm 0.2
Mitocondrial (2.7)	1.4 \pm 0.4	2.5 \pm 0.5
Sobrenadante (4.2)	0.7 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1

^aLa mezcla de reacción contenía la fracción subcelular, amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4, KCl 130 mM, NADPH 0.5 mM y nifurtimox 0.3 mM. El consumo de O_2 se midió polarográficamente con un electrodo de Clark a 30 °C. Otras condiciones se describen en Materiales y Métodos.

^bMedia \pm D.S. (4 determinaciones independientes)

La Fig. 21 muestra que el nifurtimox incrementó significativamente la velocidad de generación de O_2^- por microsomas suplementados con NADPH y disminuyó el período de inducción de la oxidación de adrenalina. La omisión de NADPH o de microsomas del sistema completo o la adición de superóxido dismutasa previno la formación de adrenocromo, mostrando de esta forma el rol del O_2^- en la transferencia de electrones del radical aniónico nitroaromático al O_2 . El nifurtimox estimuló la producción de O_2^- linealmente hasta una concentración de 60 μ M. A esta concentración el valor basal se incrementó 7 veces (Fig. 21).

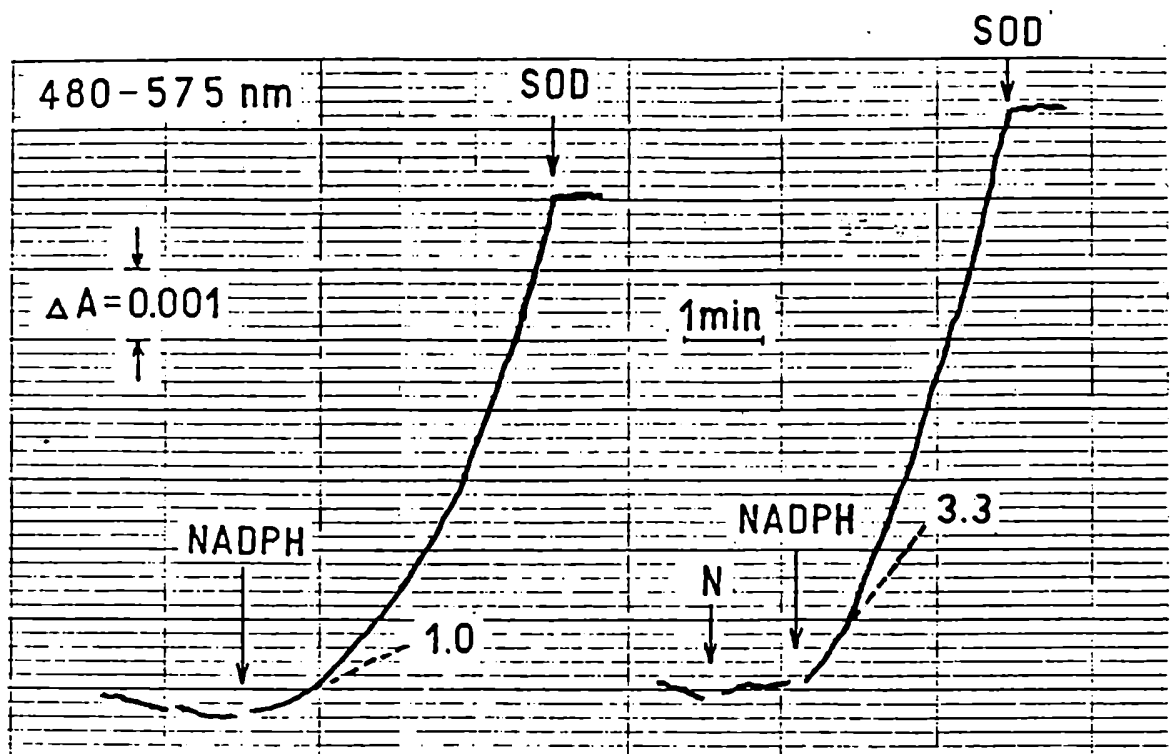


Fig. 21. Efecto del nifurtimox sobre la generación de O_2^- por microsomas de hígado de rata. La mezcla de reacción contenía microsomas (0.25 mg de proteína/ml), amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4, KCl 130 mM y epinefrina 1 mM. Donde se indica se añadieron NADPH 0.16 mM, nifurtimox 0.1 mM (N) y 5 μ g/ml de superóxido dismutasa (SOD). Otras condiciones experimentales como se indican en Materiales y Métodos. El valor cerca del trazado indica la velocidad en nmoles O_2^- /min por mg de proteína.

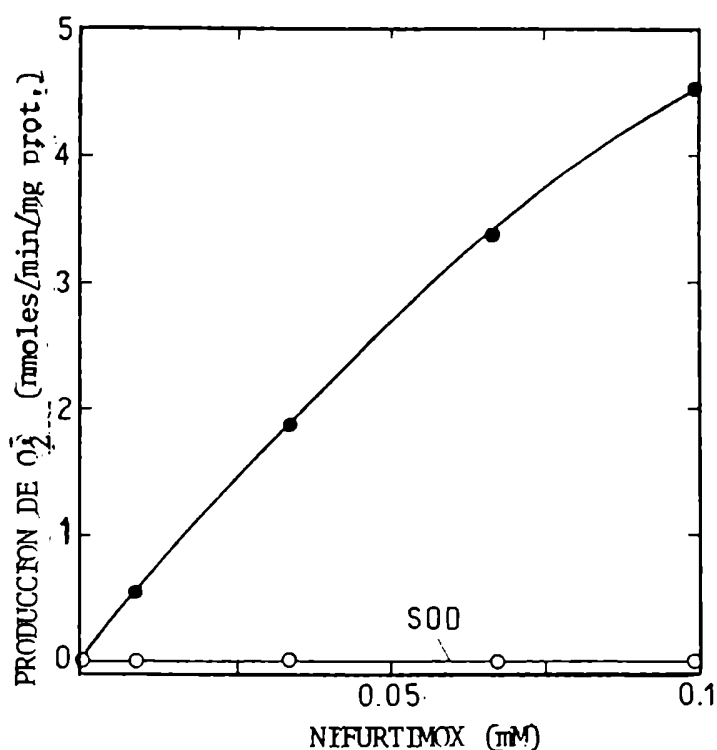


Fig. 22. Efecto de la concentración de nifurtimox sobre la producción de anión superóxido por microsomas de hígado. Condiciones experimentales como en Materiales y Métodos y en la Fig. 20, excepto la concentración de nifurtimox que se indica en la abscisa. Los valores endógenos se restaron.

La inducción de la producción de O_2^- por derivados nitroaromáticos involucra la conversión del radical nitroaromático al compuesto original (Mason, 1979). La oxidación aeróbica de este radical es muy rápida (Mason, 1979) y por lo tanto no fue posible detectar una reducción neta del nitrocompuesto midiendo el efecto del NADPH sobre su absorción a 400 nm (en presencia de preparaciones microsomales y bajo condiciones anaeróbicas, la velocidad de reducción del nifurtimox fue de 0.26 ± 0.02 nmoles/min por mg de proteína, para una concentración de droga de 100 μ M). La actividad nifurtimox reductasa dependiente de NADPH de los microsomas de hígado bajo condiciones aeróbicas pudo, sin embargo, medirse espec

trofotométricamente siguiendo la velocidad de oxidación de NADPH por el nifurtimox. La oxidación de NADPH por la fracción microsomal fue estimulada tres veces por el nifurtimox (100 μ M) (Tabla 8). La producción de H_2O_2 por la fracción microsomal también fue estimulada por nifurtimox. Debe notarse en la Tabla 8 que, en presencia de nifurtimox, la oxidación de NADPH, el consumo de O_2 , la producción de O_2^- y la formación de H_2O_2 no fueron equimolares. Así, 2.6 moles de NADPH fueron oxidados por cada 2.2 moles de O_2 consumidos, por cada 2.1 moles de O_2^- y 1 mol de H_2O_2 generados.

TABLA 8. EFECTO DEL NIFURTIMOX SOBRE EL CONSUMO DE O_2 , LA PRODUCCION DE O_2^- Y H_2O_2 Y LA OXIDACION DE NADPH POR MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA^a

Nifurtimox (mM)	Parámetros metabólicos (nmoles/min por mg de proteína)			
	Consumo de O_2	Producción de O_2^-	Oxidación de NADPH	Producción de H_2O_2
0	1.5 \pm 0.1 ^b	1.1 \pm 0.1	1.6 \pm 0.5	1.4 \pm 0.2
0.1	4.6 \pm 0.2	4.5 \pm 0.1	5.5 \pm 0.3	2.1 \pm 0.2

^aLa mezcla de incubación contenía proteínas microsomales (2.3 mg/ml) amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4, KCl 130 mM, NADPH 0.5 mM y nifurtimox. Para las determinaciones de O_2^- se agregó epinefrina 1 mM. La formación de adrenocromo fue inhibida completamente por superóxido dismutasa (5 μ g/ml). Para la determinación de H_2O_2 se agregó peroxidasa de rábano 0.8 μ M. Otras condiciones experimentales se describe en Materiales y Métodos. La oxidación de NADPH se midió a 340 nm.

^bMedia \pm D.S. (tres determinaciones independientes)

La Tabla 9 muestra el efecto de inhibidores específicos del transporte de electrones microsomal sobre la oxidación de NADPH, el consumo de O_2 y la formación de O_2^- por microsomas de hígado.

TABLA 9. EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE EL CONSUMO DE O_2 Y LA FORMACIÓN DE O_2^- DEPENDIENTES DE NADPH EN PRESENCIA DE NIFURTIMOX.^a

Inhibidor (mM)	Parámetros metabólicos (nmoles/min por mg prot.)		
	Oxidación de NADPH	Consumo de O_2	Generación de O_2^-
Ninguno	5.5 ± 0.3	4.5 ± 0.2	4.6 ± 0.1
Dicumarol (0.01)	5.1 ± 0.3 (7) ^c	ND ^d	ND
NADP ⁺ (1.0)	1.0 ± 0.1 (81)	2.6 ± 0.2 (42)	2.9 ± 0.3 (37)
p-cloromercuri benzoato (0.04)	0 (100)	0 (100)	0 (100)
Metopirona (0.1)	3.7 ± 0.2 (27)	3.1 ± 0.3 (31)	4.7 ± 0.1 (0)
SKF-525-A (0.1)	3.8 ± 0.3 (29)	3.2 ± 0.2 (29)	4.5 ± 0.2 (2)

^aLa mezcla de incubación contenía proteínas microsomales (0.4 mg/ml), nifurtimox 0.1 mM y los inhibidores. Otras condiciones como en la Tabla 7.

^bMedia ± D.S. (tres determinaciones independientes)

^cPorcentaje de inhibición

^dNo determinado

Estos resultados merecen los siguientes comentarios: a) el transporte de electrones no fue afectado por dicumarol, lo que descarta un rol importante de una DT diaforasa microsomal (Ernster y Orrenius, 1965) en la reducción del nifurtimox; b) la inhibición de la actividad por NADP⁺ indica la participación de la NADPH citocromo P-450 (c) reductasa, ya que el NADP⁺ es un inhibidor competitivo de esta

enzima; c) la misma conclusión es apoyada por el efecto del p-cloromercuribenzoato, un inhibidor del transporte de electrones microsomal de hígado durante la oxidación de NADPH (Ernster y Orrenius, 1965; Orrenius, 1965; Masters y col. 1965); d) El efecto de la metopirona y el SKF-525-A, dos inhibidores específicos del transporte de electrones microsomal a nivel del citocromo P-450 (Ernster y Nordenbrand, 1967), confirma la participación de este citocromo en la reducción del nifurtimox. Sin embargo, la formación del radical aniónico del nifurtimox no fue inhibida por monóxido de carbono y metopirona (Tabla 6). En concordancia con estos resultados la metopirona y el SKF-525-A no inhibieron la generación de O_2^- (Tabla 9), lo que implica que el citocromo P-450 puede estar involucrado en la conversión del radical aniónico nitro en otro producto de la reducción del nifurtimox (probablemente la hidroxilamina).

La falta de la esperada estequiometría 1:1:1 para la oxidación de NADPH, el consumo de O_2 y la formación de H_2O_2 (Tabla 8) indica que otros mecanismos pueden estar involucrados en la reducción del nifurtimox. Por ejemplo, la oxidación de NADPH estimulada por nifurtimox fue inhibida por superóxido dismutasa y también por la catalasa en presencia de superóxido dismutasa (Tabla 10). Estas inhibiciones sugieren que, en presencia de nifurtimox, el NADPH es hasta cierto punto oxidado por el O_2^- o por alguna especie derivada como el radical OH^\cdot (Biaglow y col. 1977). Un hecho que refuerza esta hipótesis es la inhibición de la oxidación de NADPH dependiente de O_2^- y de OH^\cdot por la superóxido dismutasa y sequestrantes de radica

TABLA 10. EFECTO DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA, CATALASA, MANITOL, Y DMPO SOBRE LA OXIDACIÓN DE NADPH POR MICROSOMAS DE HÍGADO EN PRESENCIA DE NIFURTIMOX.^a

Superóxido dismutasa (µg/ml)	Catalasa (µg/ml)	Manitol (mM)	DMPO (mg/ml)	Oxidación de NADPH (nmoles/min por mg de proteína)
0	0	0	0	6.6 ± 0.3 ^{b,c}
33	0	0	0	4.1 ± 0.4 (38) ^d
0	200	0	0	6.0 ± 0.7 (9)
33	200	0	0	2.8 ± 0.4 (57)
0	0	6.7	0	4.6 ± 0.3 (30)
0	0	0	6.7	4.9 ± 0.5 (26)

^aLa mezcla de incubación contenía proteínas microsomales (0.3 mg/ml), nifurtimox 0.1 mM y las adiciones que se señalan. Otras condiciones como en la 7.

^bMedia ± D.S. (5 determinaciones independientes)

^cVelocidad en ausencia de nifurtimox: 3.5 ± 0.2 nmoles/min por mg de proteína.

^dPorcentaje de inhibición.

les OH[•], como el manitol, el DMPO y el desferal (Tabla 11). El O₂⁻ y el OH[•] oxidaron el NADPH a baja velocidad, como ha sido observado con otros nucleótidos de piridina (Bielski y Chan, 1976). El rol de tanto el anión superóxido como el radical oxhidrilo en la oxidación de NADPH se demostró por el efecto sinérgico de la dismutasa y el desferal o el DMPO (Tabla 11).

Los microsomas de riñón, cerebro y testículos no fueron tan activos como los de hígado como generadores de O₂⁻ en presencia de nifurtimox, aunque la velocidad de producción de este radical

TABLA 11. OXIDACION DE NADPH POR ANION SUPEROXIDO Y RADICAL HIDROXILO.

Inhibidor	Velocidad de oxidación de NADPH ($\mu\text{mol}/\text{min}$) ^a		
	Oxidante: O_2^-	Oxidante: O_2^- (generado por hierro quelado)	Oxidante: OH^\cdot (generado por el reactivo de Fenton)
	(A)	(B)	(C)
Ninguno	5.13	8.63	9.5
Manitol (10 mM)	-	6.73 (22) ^b	6.4 (33)
DMPO (7 mg/ml)	-	2.03 (76)	4.9 (48)
Desferal (0.7 mg/ml)	-	3.2 (63)	-
Manitol (10 mM) + desferal (0.7 mg/ml)	-	2.67 (69)	-
Superóxido dismuta sa (33 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.3 (94)	3.2 (63)	-
igual + desferal (0.7 mg/ml)	-	1.27 (85)	-
igual + DMPO (7mg/ml)	-	0.97 (89)	2.03 (79)

^a Los números representan el promedio de muestras por duplicado. La composición de las mezclas de reacción fue la siguiente (volumen final: 1.5 ml). A: Tris-HCl 0.1 M, pH 7.6, xantina 50 mM, NADPH 0.33 mM y 20 μl de xantina oxidasa (0.48 unidades) añadidas al tiempo cero. B. lo mismo que A, más FeSO_4 0.1 mM y EDTA 0.3 mM. C. Tris-HCl 0.1 M, pH 7.6, NADPH 0.33 mM, FeSO_4 0.1 mM y H_2O_2 1 mM añadida al tiempo cero. A, según Fridovich, 1970; B, según Halliwell 1978 y C, según Buetner y Oberley, 1979.

^b Porcentaje de inhibición.

fue significativamente aumentada por esta droga (Tabla 12).

TABLA 12. EFECTO DEL NIFURTIMOX SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO POR MICROSOMAS DE HIGADO, RIÑON, CEREBRO Y TESTICULOS DE RATA.^a

Suspensión microsomal	Producción de O_2^- inducida por nifurtimox (nmoles/min por mg prot.)		Producción endógena de O_2^- (nmoles/min por mg prot.)
	- SOD	+ SOD	
Hígado	5.2 ± 0.3 ^b	0	1.3 ± 0.3
Riñón	2.8 ± 0.1	0.01	0
Cerebro	3.8 ± 0.1	0.02	0
Testículo	3.0 ± 0.2	0.01	0

^aLa mezcla de incubación contenía proteínas microsomales (0.16 mg/ml), nifurtimox 0.1 mM y las adiciones que se indican en la Fig. 21. SOD, superóxido dismutasa (33 µg/ml). Otras condiciones como en Materiales y Métodos.

^bMedia ± D.S. (tres determinaciones independientes)

Estimulación de la peroxidación lipídica

La incubación de microsomas de hígado de rata en presencia de nifurtimox y NADPH determinó un aumento significativo de la formación de malondialdehído (Fig. 23). El efecto del nifurtimox fue máximo en presencia de NADPH como dador de electrones.

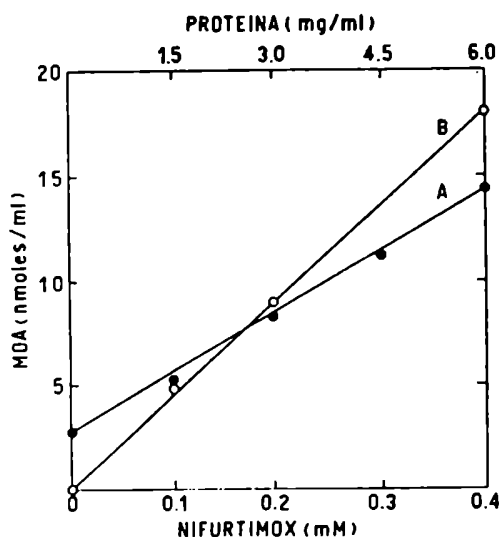


Fig. 23. Efecto del nifurtimox sobre la peroxidación lipídica de microsomas de hígado. La mezcla de reacción y otras condiciones como en la Tabla 13. La concentración de nifurtimox o de proteína (a una concentración de nifurtimox de 0.1 mM) se indican en la abcisa.

La Fig. 23 muestra que la formación de malondialdeído fue linealmente dependiente de la concentración de proteína utilizada y de la concentración de nifurtimox en el medio de incubación.

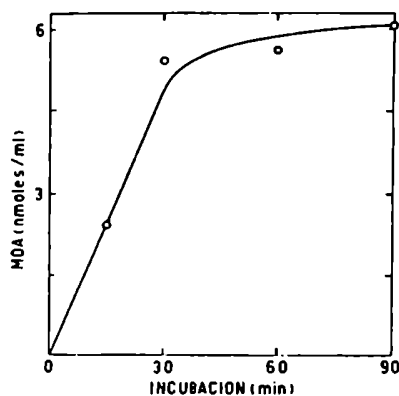


Fig. 24. Cinética de la estimulación de la peroxidación lipídica inducida por nifurtimox en microsomas de hígado de rata. Los microsomas (3.2 mg de proteína/ml) fueron suspendidos en el medio descrito en la Fig. 23, a 37°C durante los tiempos indicados en la abcisa. Concentración de nifurtimox 0.33 mM.

La formación de malondialdehído se incrementó al prolongar el tiempo de incubación, pero después de 30 min se mantuvo constante (Fig. 24).

A pesar de que el mecanismo de la peroxidación lipídica no está del todo explicado, diferentes argumentos indican que tanto el oxígeno singulete (1O_2) como el radical oxhidrilo (OH^\cdot) pueden actuar como iniciadores del proceso. La estimulación de la lipoperoxidación por el nifurtimox fue inhibida en presencia de agentes secuestrantes de radicales OH^\cdot (manitol) y de 1O_2 (histidina, azida) (Tabla 13), lo que demuestra que los derivados de la reducción

TABLA 13. EFECTO DE AGENTES SECUESTRANTES DE RADICALES OH^\cdot y 1O_2 SOBRE LA ESTIMULACION DE LA PEROXIDACION LIPIDICA POR NIFURTIMOX EN MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA.^a

Adiciones	Absorbancia a 548 nm
Ninguna	0.006 \pm 0.002 ^b
Nifurtimox + NADPH	0.312 \pm 0.041
Nifurtimox + NADPH + manitol	0.225 \pm 0.013 (30.1) ^c
Nifurtimox + NADPH + histidina	0.206 \pm 0.009 (34)
Nifurtimox + NADPH + azida	0.191 \pm 0.004 (38.8)

^aLa incubación se llevó a cabo a 37 °C durante una hora con microsomas (4 mg de proteína/ml) suspendidos en amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4 y KCl 130 mM en un volumen final de 1 ml. Nifurtimox 0.33 mM, NADPH 0.5 mM, manitol 0.1 mM, histidina 10 mM, azida, 10 nM.

^bMedia \pm D.S. (tres determinaciones independientes)

^cPorcentaje de inhibición.

parcial del O_2 están involucrados en las reacciones de peroxidación lipídica estimuladas por el nitrofurano.

Alteraciones ultraestructurales en los órganos blanco de la toxicidad del nifurtimox

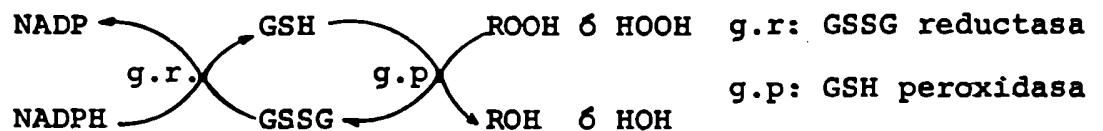
Uno de los órganos más sensibles a los procesos de peroxidación lipídica es el testículo (Tappel, 1973) y justamente este órgano es uno de los blancos de la toxicidad selectiva del nifurtimox en mamífero (Hoffman, 1972). La Fig. 25 A muestra un corte transversal de un túbulo semínfero de testículo de rata normal (inoculada con el solvente utilizado para suspender el nifurtimox: Tween 80-agua 4 % V/V). La Fig. 25 B muestra los efectos observados luego de dos horas de la administración intraperitoneal de 100 mg de nifurtimox/kg de peso. Se observa dilatación difusa del retículo endoplásmico liso de las células de Sertoli, extendida a todo su citoplasma, con la aparición de microvacuolas y también alteraciones de la membrana basal. En la Fig. 25 C se observan los efectos producidos después de la administración intraperitoneal de 100 mg de nifurtimox/kg de peso por día durante 5 días. Se observa necrosis de los espermatoцитos primarios con picnosis y mayor densidad citoplasmática, aumento del número de cuerpos multivesiculares o lisosomas secundarios en el citoplasma de las células de Sertoli probablemente por digestión de restos celulares de espermatoцитos y espermátides y retracción citoplasmática en el compartimiento basal, con grandes espacios que sólo contienen algunas membranas.



Fig. 25. A. Microfotografía electrónica de testículo de rata control (inoculada con el solvente del nifurtimox) mostrando una célula de Sertoli (S) normal. Abreviaturas usadas: N, núcleo, B, membrana basal. x 4500. B. Microfotografía electrónica de testículo de rata inoculada con 100 mg de nifurtimox por kg de peso y sacrificada dos horas después, mostrando una célula de Sertoli alterada con dilataciones del retículo endoplásmico liso en forma de microvacuolas (V). La membrana basal también está alterada y se observan cuerpos de lipofusina (L) en las células de Sertoli. X 4500. C. Microfotografía electrónica de testículo de rata inoculada con 100 mg de nifurtimox/kg de peso por día durante 5 días mostrando espermatocitos (E) en necrosis con sus núcleos picnóticos, retracción de las células de Sertoli con grandes espacios vacíos y restos de la actividad fagocítica (flechas). x 4500.

Mecanismo de desintoxicación hepática del nifurtimox

Se reconoce de manera general que muchas reacciones adversas provocadas por drogas se deben a la transformación de las mismas en especies químicas altamente reactivas. Estos metabolitos tóxicos pueden alterar la estructura y función de las macromoléculas tisulares de diferentes maneras, tales como mediante la alquilación de proteínas y ácidos nucleicos o por estimulación de la peroxidación lipídica como hemos observado en el caso del nifurtimox. Las células han desarrollado varios mecanismos de defensa contra tales ataques oxidativos. Entre estos, el glutatión reducido (GSH) juega un papel muy importante junto a la glutatión peroxidasa mediante la remoción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los hidroperóxidos (ROOH) que se forman (Sies y col. 1978):



Por otro lado, el glutatión reacciona con diversos intermediarios electrofílicos para formar conjugados. Estas reacciones de conjugación son catalizadas por las glutatión-S-transferasas y resultan en una deplección de las reservas de glutatión.

El nifurtimox produjo una deplección notable del glutatión hepático en ratas, con un valor máximo entre las 2 y 4 horas de administrado (Fig. 26). Esta deplección fue dependiente de la dosis y con una concentración de 200 mg/kg de peso, el nifurtimox disminuyó el contenido de glutatión hepático en un 30 % sin pro

vocar la mortalidad de las ratas ni alterar la histología hepática o la actividad de la piruvato transaminasa sérica (datos omitidos). 8

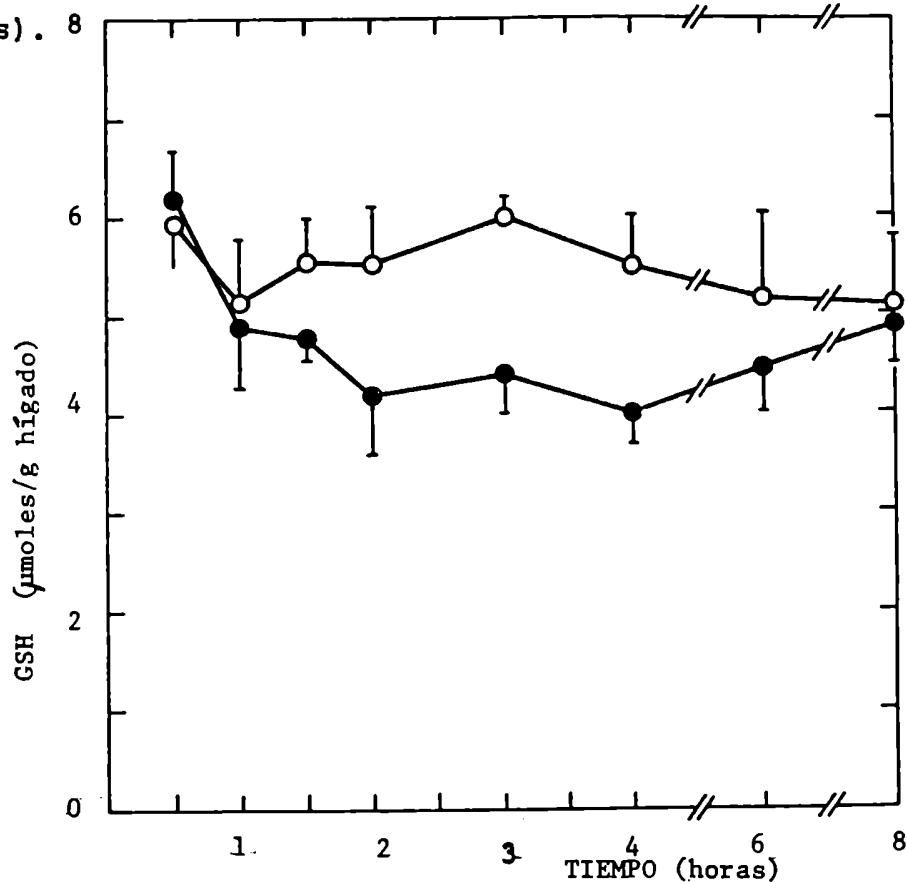


Fig. 26. Deplección del glutati6n hepático inducida por nifurtimox (●), 200 mg/kg de peso, intraperitoneal. Cada punto representa la media \pm error standard de 6 animales. (o) Ratas controladas inoculadas con el solvente. Las diferencias fueron significativas a las 2 horas ($P < 0.02$), a las 3 horas ($P < 0.05$) y a las 4 horas ($P < 0.02$).

La liberaci6n de glutati6n oxidado (GSSG) de hígado de rata fue evaluada como un indicador del stress oxidativo (Sies y col. 1978). Como se muestra en la Fig. 27, el nifurtimox determin6 un incremento de la salida de GSSG del hígado. Se lleg6 a una velocidad estacionaria de liberaci6n de GSSG alrededor de los 45 min luego de la inoculaci6n de la droga que luego se mantuvo constan

te hasta más allá de los 120 min (Fig. 27)

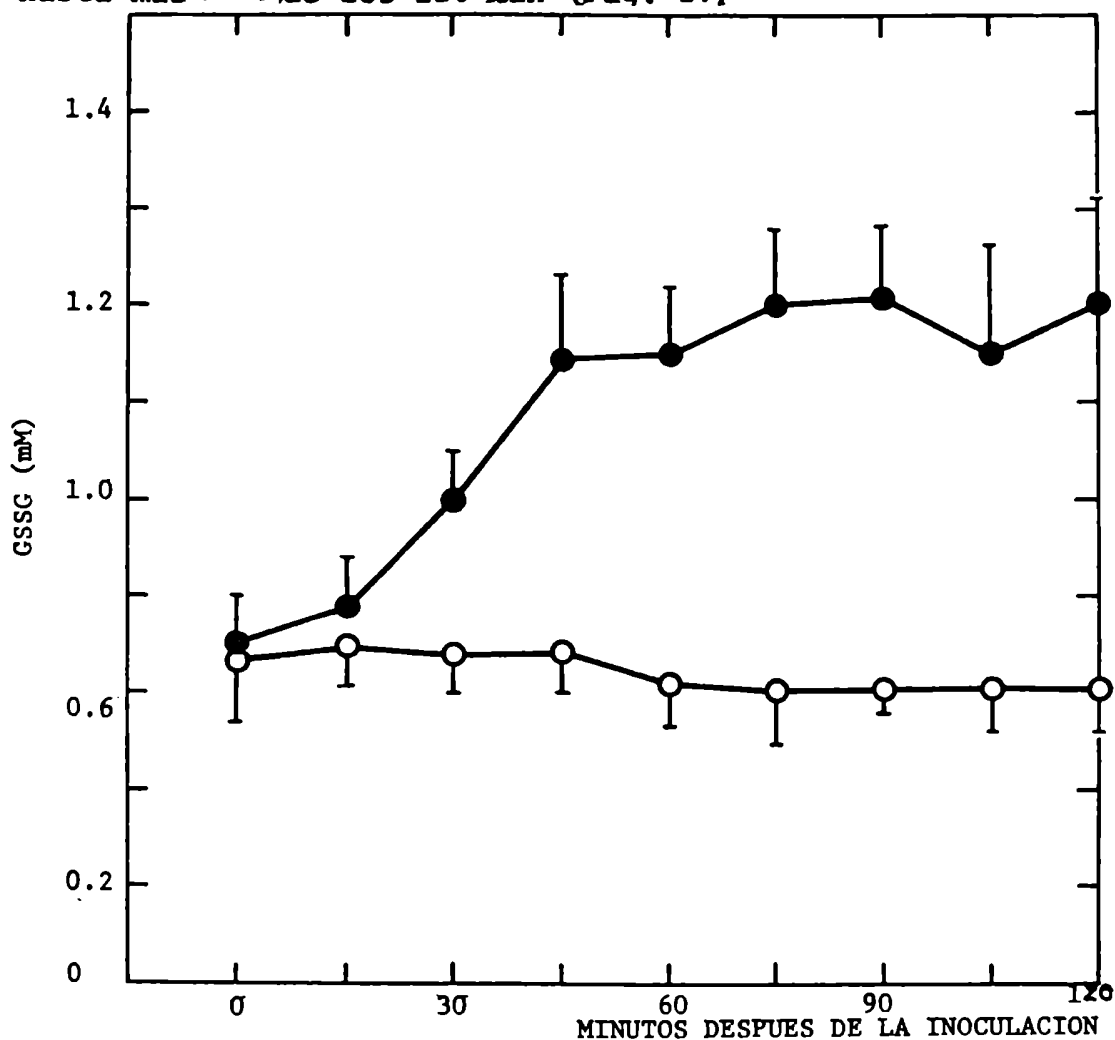


Fig. 27. Secreción biliar de GSSG. La bilis se recolectó cada 15 min luego de la inoculación de nifurtimox (●), 200 mg/kg de peso, intraperitoneal. Cada punto representa la media \pm E.S. de 6 animales. Las diferencias fueron significativas a partir de los 30 min ($P < 0.001$).

El incremento de la liberación de glutatión oxidado se acompañó de un incremento paralelo de la liberación de glutatión reducido alcanzando esta una velocidad máxima alrededor de los 90 min de administrada la droga (Fig. 28).

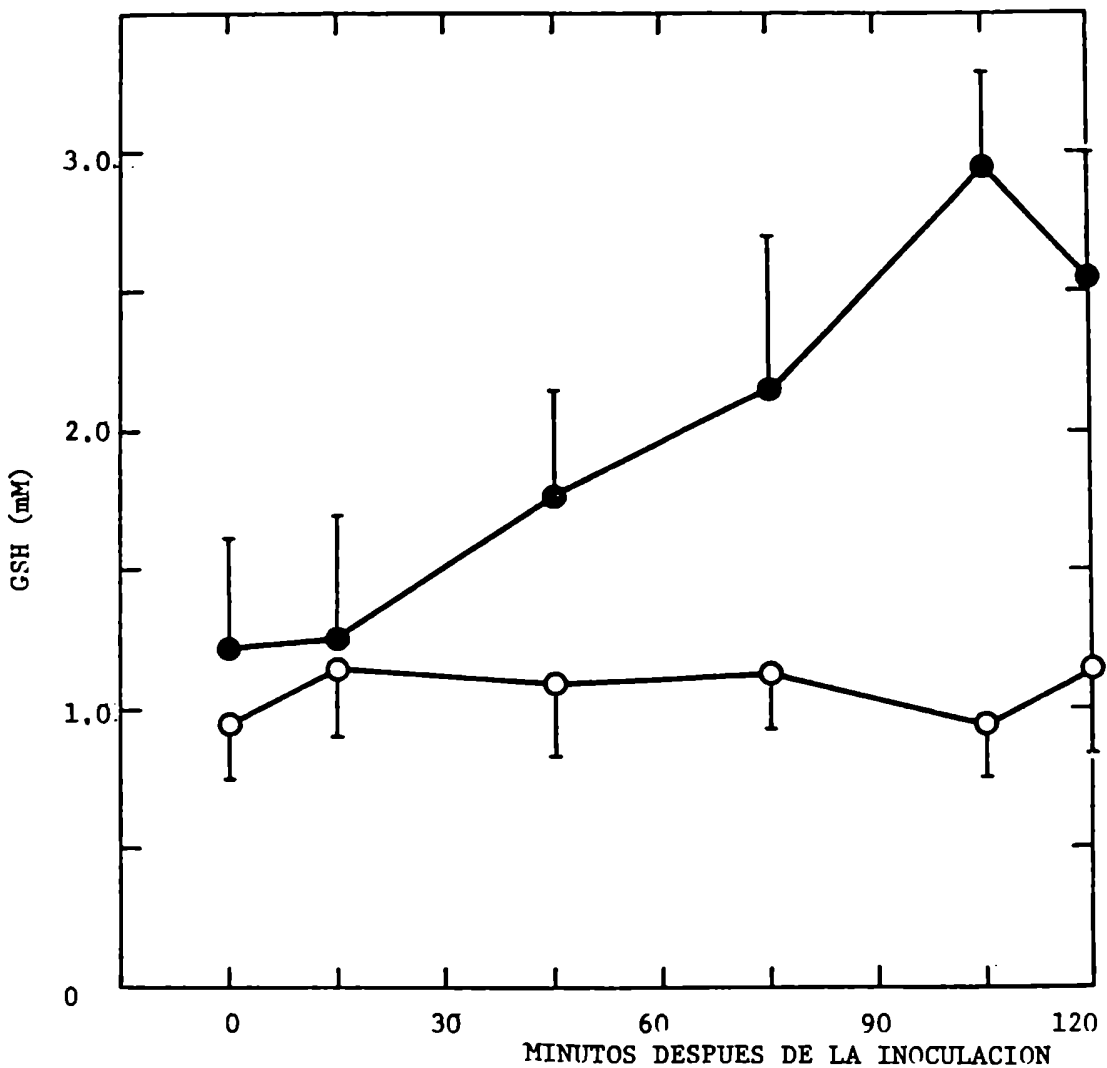


Fig. 28. Secreción biliar de GSH. Iguales condiciones que en la Fig. 27. Cada punto representa la media \pm E.S. de 6 animales. Las diferencias fueron significativas a partir de los 45 min ($P < 0.05$) A los 105 min, $P < 0.01$.

La investigación por espectrofotometría de las bilis de las ratas tratadas con nifurtímox reveló la existencia de un presunto metabolito de la droga con picos máximos de absorción a 295 nm y 415 nm (Fig. 29). Este espectro fue comparado con el obtenido de una solución pura de nifurtímox (Fig. 29). Los mismos picos de absorción a 295 nm y 415 nm fueron encontrados al estudiar

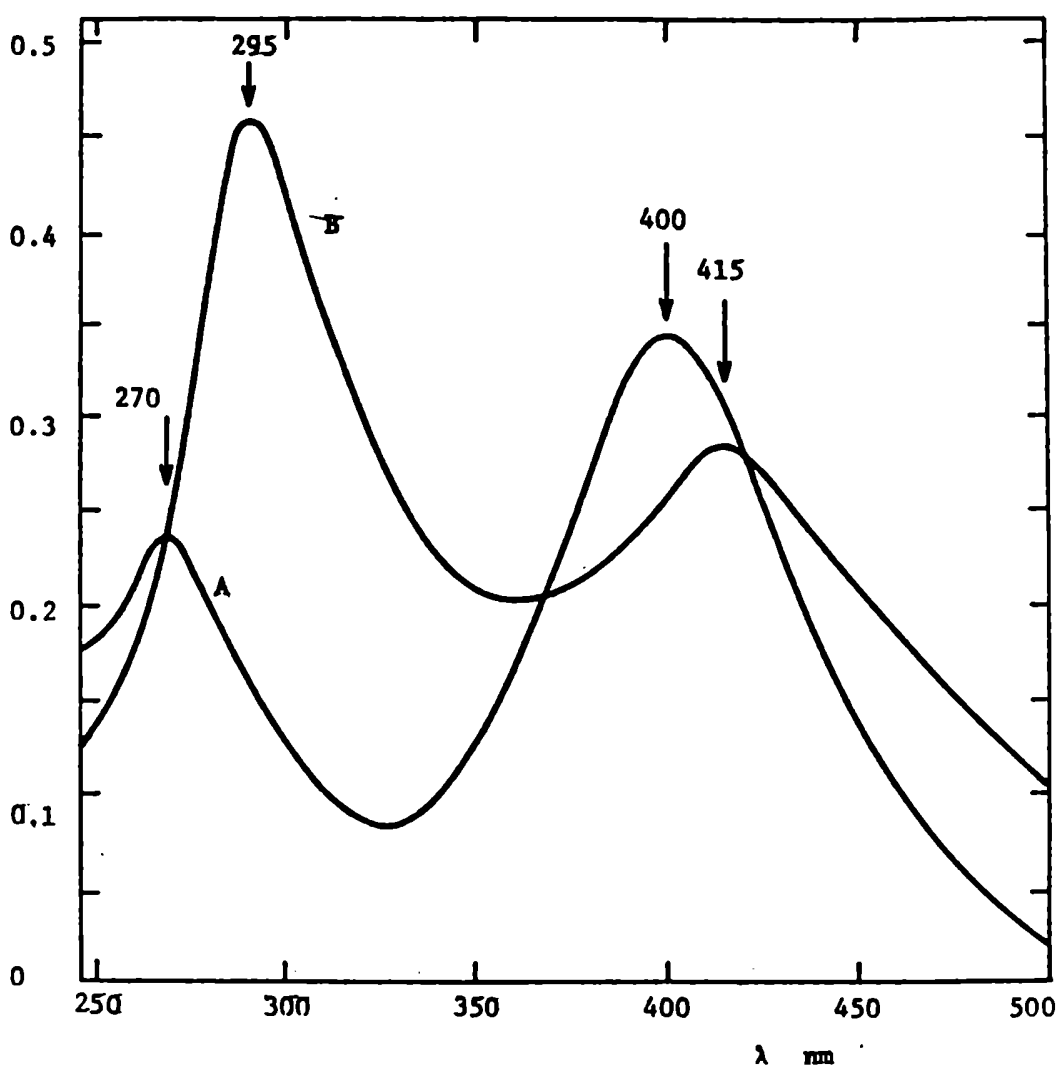


Fig. 29. Espectro de absorción del nifurtimox (A) mostrando picos de absorción a 400 nm y 270 nm. (B) Espectro diferencial de bilis de ratas tratadas con nifurtimox (200 mg/kg) contra bilis de ratas inoculadas con el solvente, mostrando picos a 295 nm y 415 nm. Otras condiciones como en Materiales y Métodos.

muestras de orina de las ratas tratadas con nifurtimox.

Se encontró una buena correlación entre la eliminación biliar del presunto metabolito del nifurtimox y la eliminación del glutatión total (Fig. 30), lo que puede indicar que la absorbancia encontrada en bilis se debe a la eliminación de un conjugado del nifurtimox con el glutatión. La correlación entre la eliminación

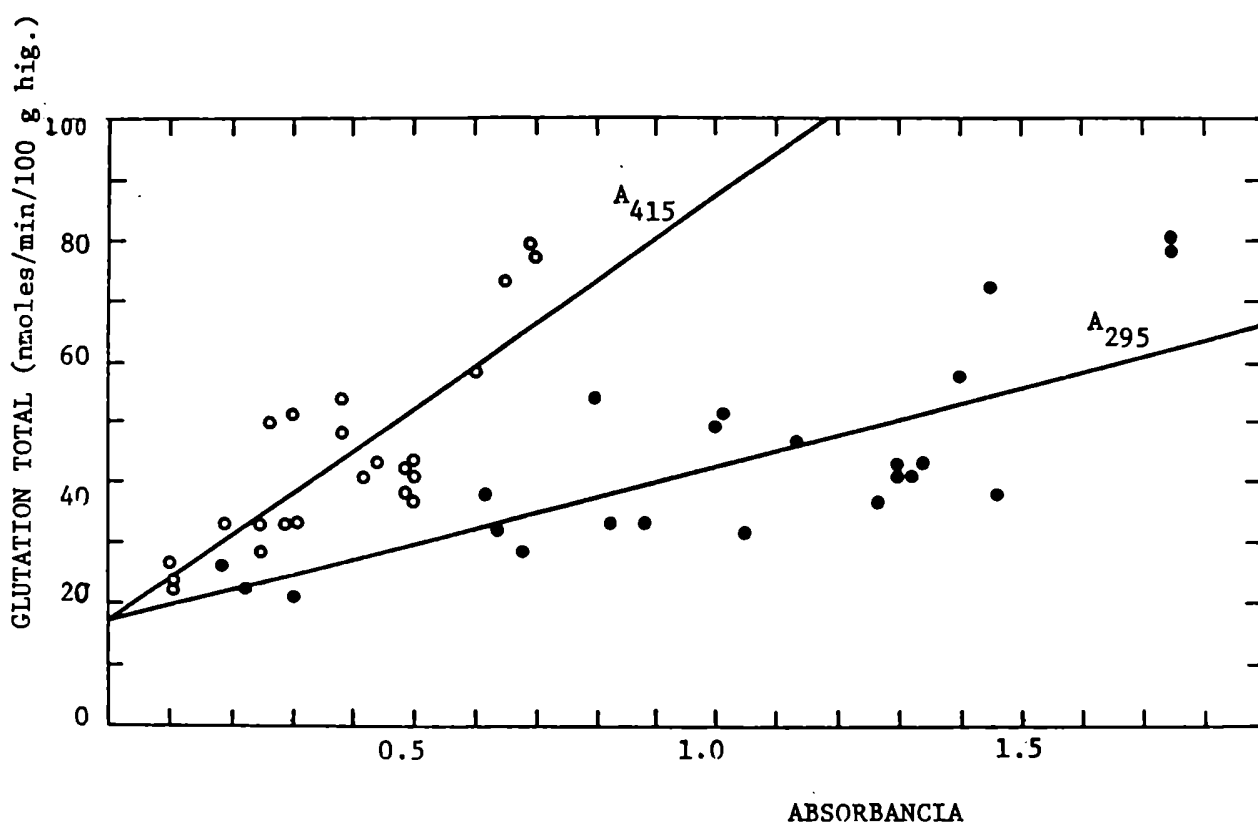


Fig.30. Correlación entre la liberación de glutatión total en bilis y la absorbancia del metabolito del nifurtimox en la bilis en diferentes tiempos luego luego de su administración (200 mg/kg de peso). Condiciones experimentales como en Materiales y Métodos.

de glutatión total y la absorbancia a 415 nm de las bilis fue positiva ($r = 0.82$, $P < 0.01$). La línea en la Fig. 30 representa la recta de regresión ($y = 16.0 + 73.3x$). También fue buena la correlación entre la eliminación de glutatión total y la absorbancia de las bilis a 295 nm ($r = 0.76$, $P < 0.01$) representando la línea de la Fig. 30, la recta de regresión ($y = 16.6 + 24.9x$).

El flujo biliar no fue significativamente modificado después de la administración de una dosis de 200 mg/kg de peso.

Se sabe que algunos nitrofuranos como la nitrofurantoina (Buzard y col., 1960) inhiben la actividad in vitro de la glutatión reductasa por lo que se investigó la actividad de esta enzima y de la glutatión peroxidasa en el hígado de las ratas tratadas con nifurtimox (200 mg/kg de peso), ya que una modificación de estas actividades podría explicar el aumento de la eliminación de glutatión en bilis.

La Tabla 14 muestra que no hubo diferencias significativas entre las actividades de ambas enzimas en las ratas tratadas y en los controles.

TABLA 14. EFECTO DE LA INOCULACION DE NIFURTIMOX SOBRE LA ACTIVIDAD DE GLUTATION REDUCTASA Y DE GLUTATION PEROXIDASA DE HIGADO DE RATA.^a

Ratas	Actividades enzimáticas (nmoles/ min por mg de proteína)	
	Glutatión peroxidasa	Glutatión reductasa
Controles	505 ± 53	127 ± 27
Tratadas con nifurtimox	534 ± 63	123 ± 25

^aLas determinaciones se hicieron en los sobrenadantes de 105000 g obtenidos después de la desintegración celular como se describe en Materiales y Métodos (1 mg proteína/ml).

^bMedia ± D.S. (tres determinaciones independientes).

Sin embargo, el nifurtimox inhibió la glutatión reductasa in vitro. El efecto del nifurtimox sobre la actividad de la glutatión reductasa se muestra en la Fig.31. El nifurtimox causó una pronunciada inhibición de la actividad glutatión reductasa del sobrenadante de hígado de rata.

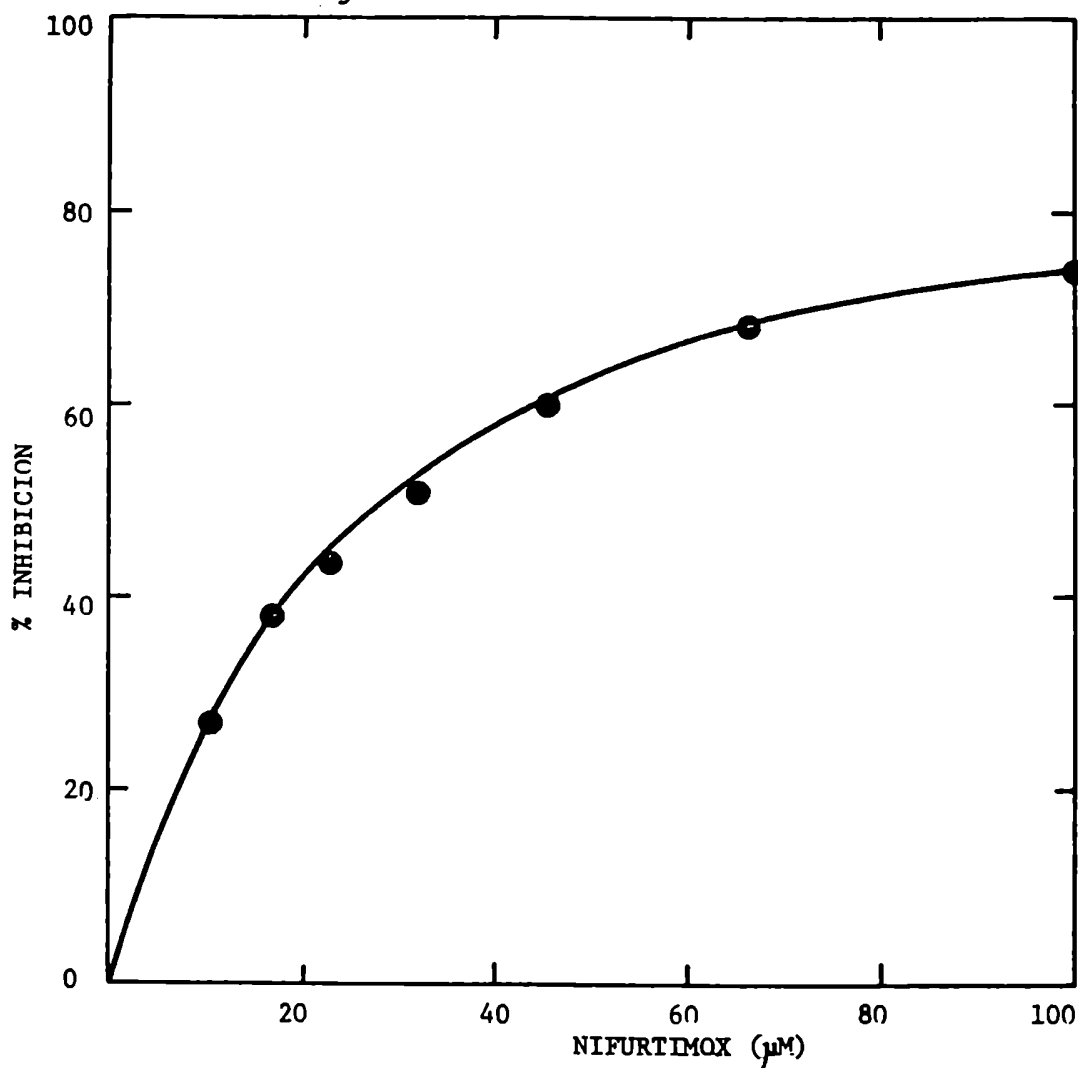


Fig. 31. Efecto de la concentración de nifurtimox sobre la actividad glutatión reductasa de hígado de rata. El sobrenadante de 105000 g (2 mg de proteína/ml) fue incubado en amortiguador fosfato de potasio 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0 en presencia de nifurtimox. Otras condiciones como en Materiales y Métodos.

Como era de esperar ante el eficiente mecanismo de desintoxicación hepática del nifurtimox, la peroxidación lipídica, medida por el ensayo de los conjugados dieno no fue incrementada en las ratas tratadas con nifurtimox (Tabla 15).

TABLA 15. EFECTO DEL NIFURTIMOX SOBRE LA ABSORCIÓN DE CONJUGADOS DIENO DE LOS LÍPIDOS DE HOMOGENADOS HEPATICOS.^a

Homogenados de hígado de:	A ₂₃₅ nm
Ratas controles	0.235 ± 0.016 ^b
Ratas inoculadas con nifurtimox	0.227 ± 0.009

^a Alícuotas de los homogenados de hígado de rata (20 mg de proteína/ml) fueron extraídas por el método de Klaassen y Plaa, 1969.

^b Media ± D.S. (n=4 a 6).

Generación de radicales libres inducida por el benznidazol en el Trypanosoma cruzi y en el huésped.

Formación del radical aniónico del benznidazol

La incubación de benznidazol (Fig.32), un 2-nitroimidazol utilizado clínicamente en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, con microsomas de hígado de rata en presencia de NADPH

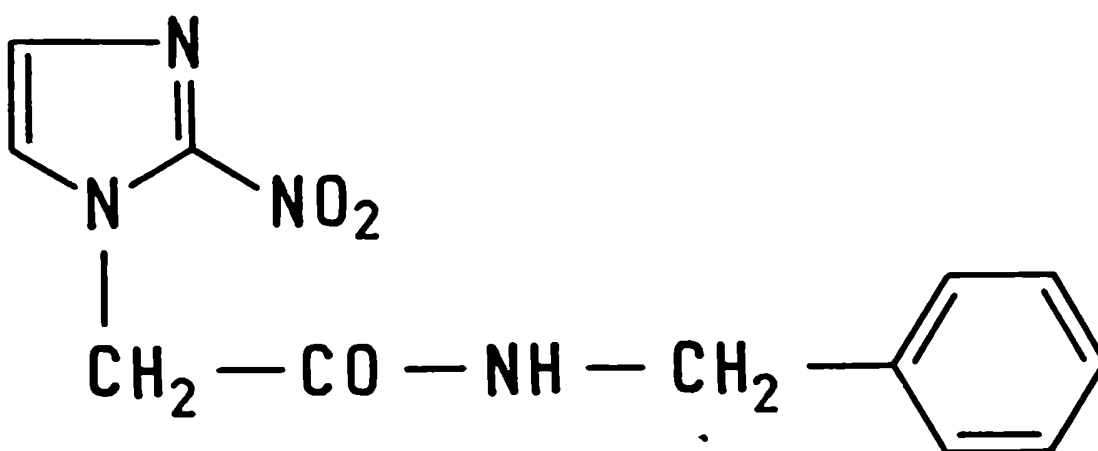


Fig. 32. Fórmula química del benznidazol (Ro-1051, N-bencil-2-nitro-1-imidazol).

llevó a la formación del radical aniónico del nitroimidazol (Fig. 33). El valor de $a_{\text{NO}_2}^{\text{N}}$ fue de 13.75 G y está de acuerdo con el valor de 14.10 G para el misonidazol (Ayscough y col.1978) otro 2-nitroimidazol. La formación del radical dependió de los tres componentes: microsomas, NADPH y benznidazol. La omisión de NADPH o el calentamiento de los microsomas a 100 °C durante 10 min llevó a una falta total de actividad. El sistema generador de NADPH no produjo concentraciones observables del radical aniónico nitroaromático.

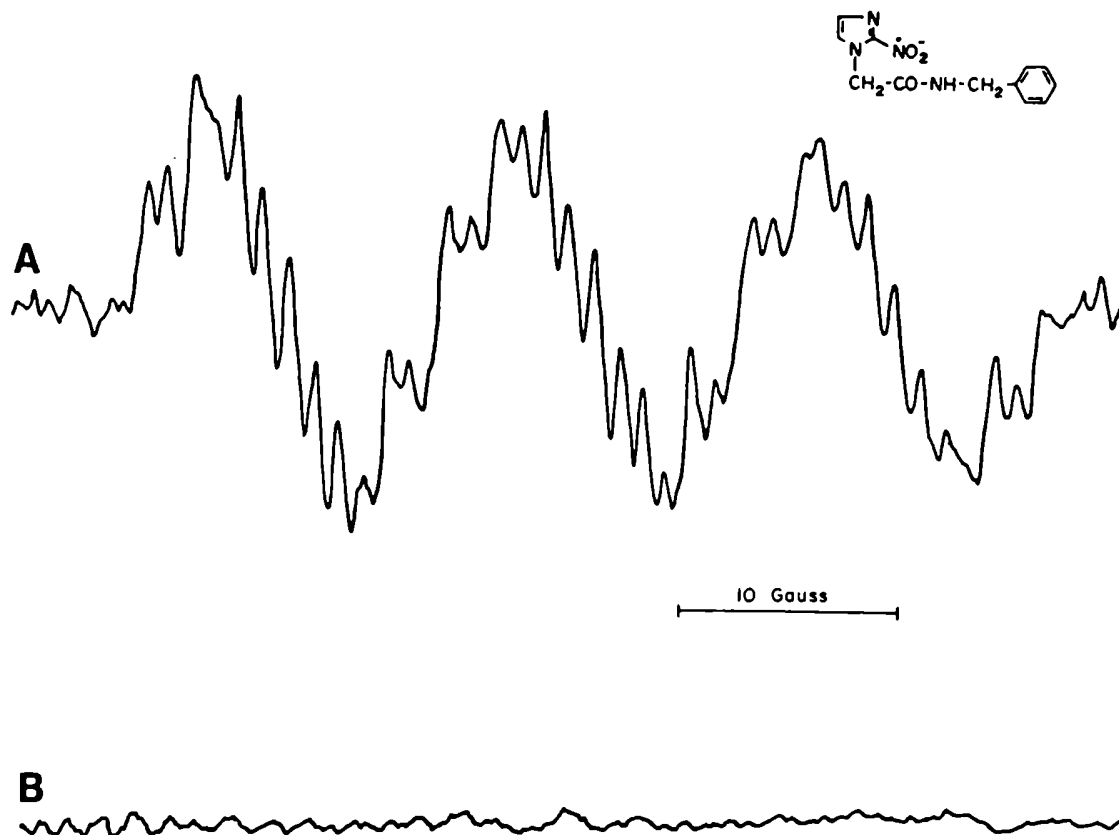
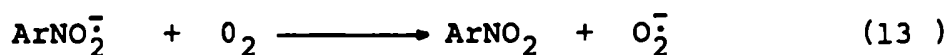


Fig. 33. Espectro de rpe del benznidazol. **A**: Espectro formado luego de la incubación de microsomas (2 mg proteína/ml), benznidazol 2 mM y un sistema generador de NADPH formado por NADP⁺ (0.38 mM), glucosa-6-fosfato (5.5 mM), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (0.67 unidades/ml). El espectro se obtuvo con una amplitud de modulación de 0.5 G y un poder de 20 mV. Otras condiciones como en Materiales y Métodos. **B**: Espectro obtenido luego de la incubación de epimastigotes de *T. cruzi* (10⁹ células/ml) y benznidazol 1.6 mM en las mismas condiciones experimentales que en A y en la Fig. 3.

De la misma forma que ocurrió para la obtención del radical libre del nifurtímox, el espectro del radical proveniente del benznidazol pudo ser observado sólo después de un período de in-

rducción que reveló el agotamiento del oxígeno del medio debido a la reacción ya descrita (13):



En las mismas condiciones experimentales, la incubación de benznidazol en presencia de NADPH ó NADH y fracciones mitocondriales, microsomales, solubles y homogenados (no mostrados) ó en presencia de epimastigotes intactos (Fig. 33 B) no llevó a la formación de un radical detectable.

Estimulación del transporte de electrones y la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno

La Fig. 34 muestra que el consumo de O_2 por los microsomas hepáticos fue incrementado varias veces cuando se introdujo benznidazol a la mezcla de reacción. El incremento en el consumo de O_2 determinado por el benznidazol dependió de todos los componentes del sistema, siendo la velocidad de reacción despreciable en ausencia de NADPH o de microsomas o luego de la desnaturalización térmica de los microsomas (datos omitidos).

La Fig. 35 muestra que el benznidazol incrementó significativamente la velocidad de generación de O_2^- por microsomas suplementados con NADPH, disminuyendo el período de inducción de la oxidación de adrenalina. La omisión de NADPH o de microsomas del sistema completo o la adición de superóxido dismutasa previno la formación de adrenocromo, mostrando de esta forma el rol del O_2^- en la transferencia de electrones del radical aniónico nitroaromático al oxígeno.

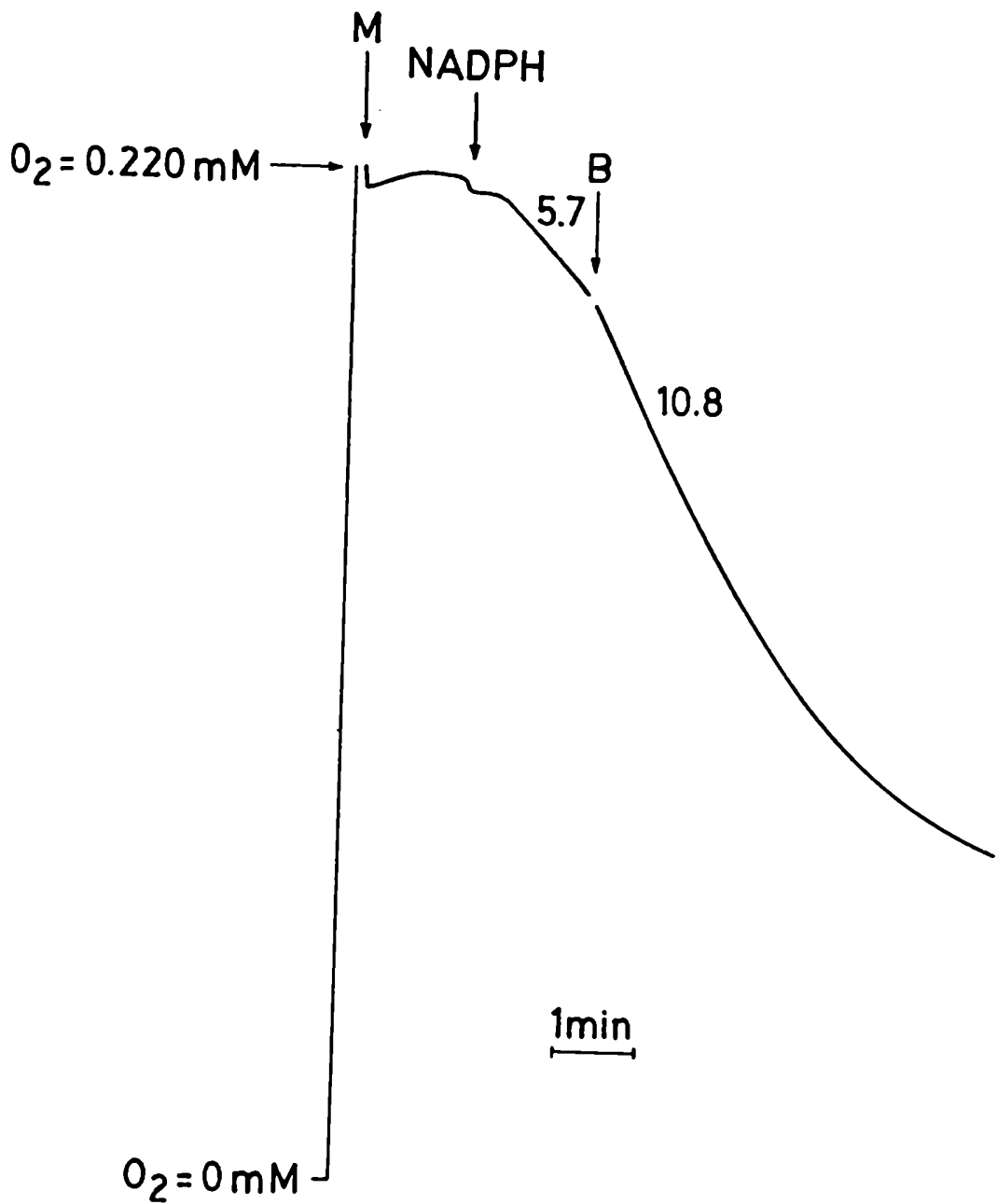


Fig. 34. Efecto del benznidazol sobre el consumo de oxígeno por microsomas de hígado de rata. La mezcla de reacción contenía mi crosomas (4.0 mg de proteína/ml) y amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4, NADPH 0.5 mM y benznidazol (B) 1.0 mM. Los valores indi can nmoles de O_2 /min por mg de proteína. Otras condiciones como se describe en Materiales y Métodos.

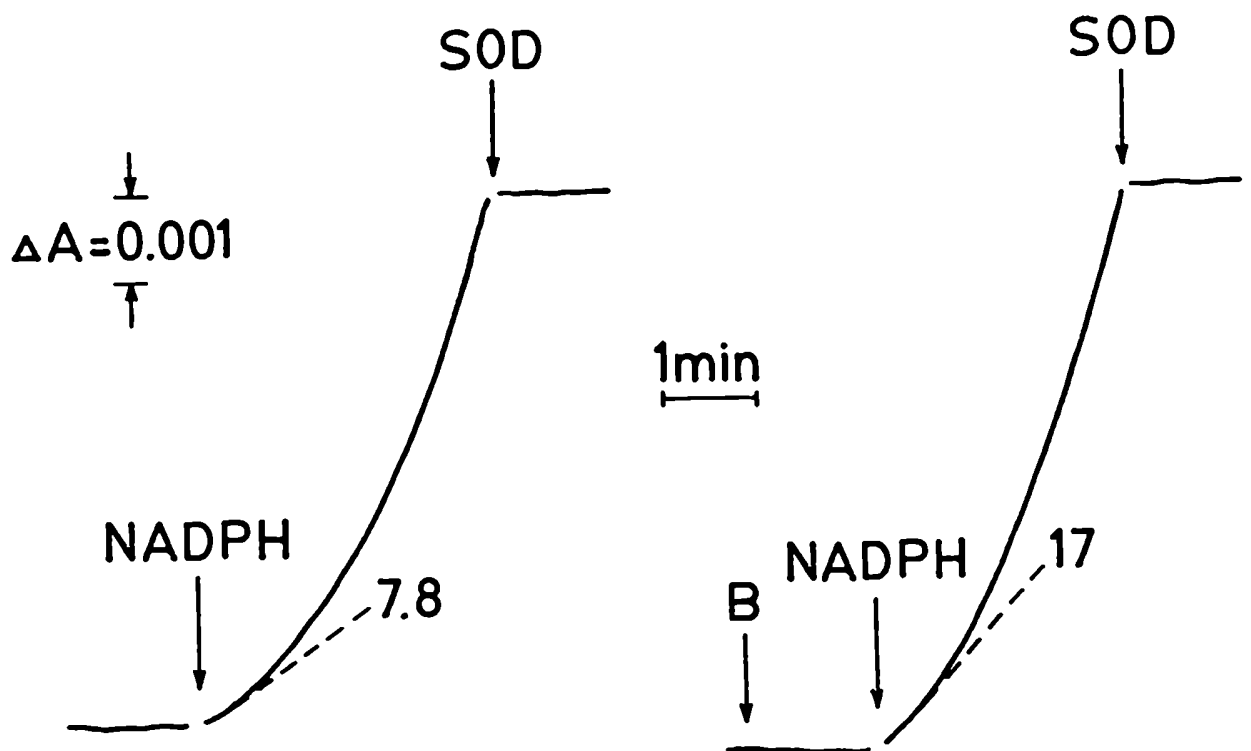


Fig. 35. Efecto del benzimidazol sobre la generación de O_2^- por microsomas de hígado de rata. La mezcla de reacción contenía microsomas (0.5 mg de proteína/ml), amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4, KCl 130 mM y epinefrina 1 mM. Donde se indica se añadieron NADPH 0.3 mM, benzimidazol 1.0 mM (B) y 5 μ g/ml de superóxido dismutasa (SOD). Otras condiciones experimentales como se indican en Materiales y Métodos. El valor cerca del trazado indica la velocidad en nmoles O_2^- /min por mg de proteína.

La Fig. 36 muestra el efecto de diferentes concentraciones de benzimidazol sobre la generación de O_2^- por microsomas de hígado de rata (A) y por microsomas de epimastigotes de Trypanosoma cruzi (B). Sólo con los microsomas hepáticos, el benzimidazol fue capaz de estimular la generación de anión superóxido.

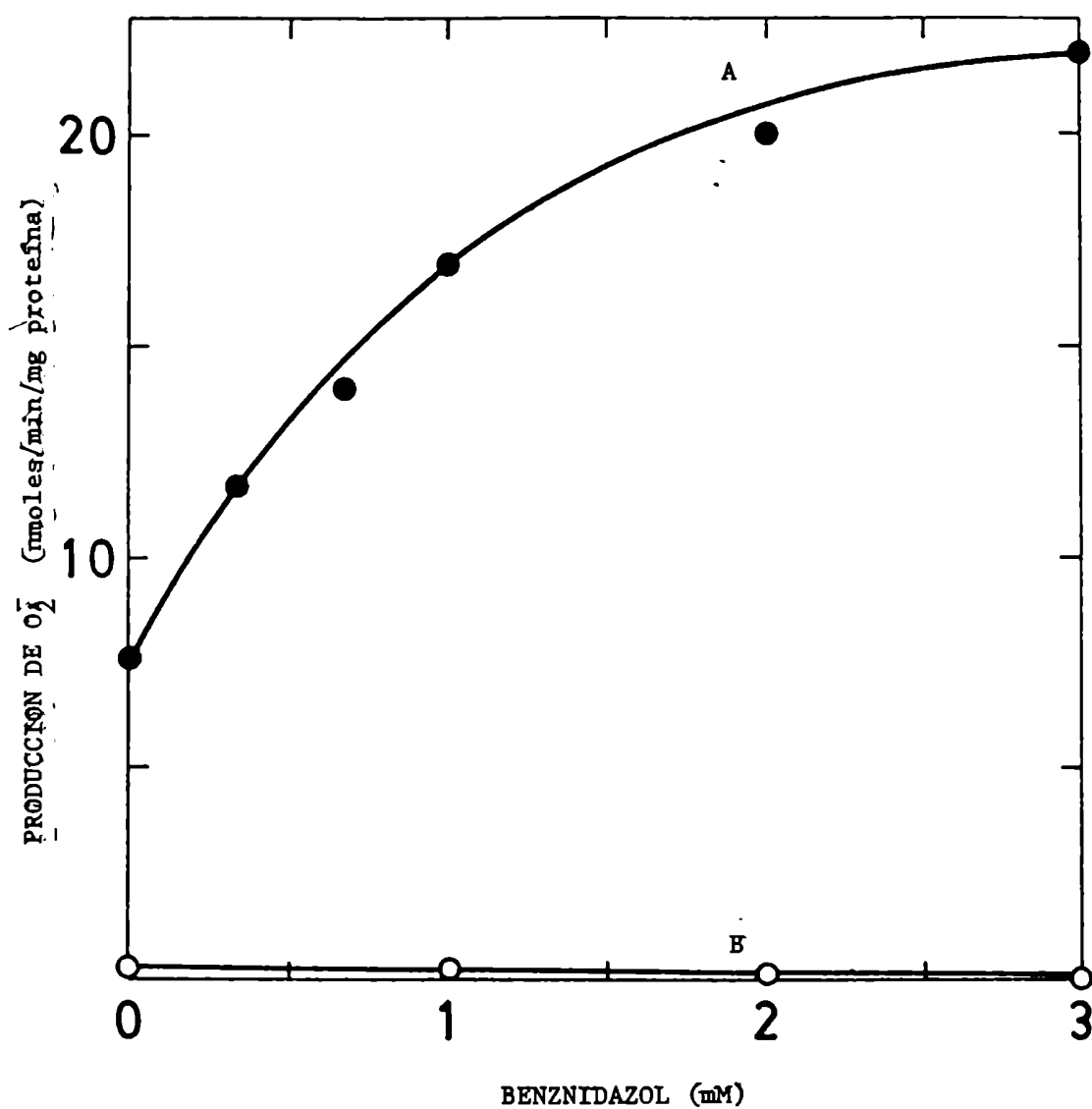


Fig. 36. Efecto de la concentración de benznidazol sobre la producción de anión superóxido por microsomas de hígado (A) y de T. cruzi (B). Condiciones experimentales como en la Fig. 35 y en Materiales y Métodos. La concentración de benznidazol se indica en la abcisa. T. cruzi: 2.0 mg de proteína microsomal/ml.

La Tabla 16 muestra el efecto de inhibidores específicos del transporte de electrones microsomal sobre el consumo de O_2 y la formación de O_2^- por microsomas de hígado de rata.

TABLA 16. EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE EL CONSUMO DE O_2 Y LA FORMACION DE O_2^- DEPENDIENTES DE NADPH EN PRESENCIA DE BENZNIDAZOL.^{2a}

Inhibidor (mM)	Parámetro metabólicos (nmoles/min por mg prot.)	
	Consumo de O_2	Generación de O_2^-
Ninguno	4.4 ± 0.2	6.0 ± 0.5
NADP ⁺ (1.0)	2.9 ± 0.2 (66)	1.5 ± 0.2 (75)
p-cloromercuri benzoato (0.04)	0 (100)	0 (100)
Metopirona (0.1)	4.4 ± 0.3 (0)	5.2 ± 0.4 (13)
SKF-525-A (0.1)	5.0 ± 0.3	5.1 ± 0.3 (15)

^aLa mezcla de reacción contenía proteínas microsomales (4 mg/ml) benznidazol 1 mM y los inhibidores. Otras condiciones como en Materiales y Métodos.

^bMedia ± D.S. (tres determinaciones independientes)

^cPorcentaje de inhibición

La inhibición de la actividad por NADP⁺, inhibidor competitivo de la NADPH citocromo P-450 (c) reductasa, y por p-cloromercuribenzoato, inhibidor irreversible de la misma actividad (Ernster y Orrenius, 1965; Orrenius, 1965; Masters y col. 1965), indican la participación de esa enzima en la reducción del benznidazol. La falta de efecto de la metopirona y el SKF-525-A, dos inhibidores específicos del citocromo P-450 (Ernster y Nordenbrand, 1967), indica que este citocromo no participa en la reducción de esta droga por los

microsomas hepáticos.

La Fig. 37 muestra que el benznidazol incrementó significativamente la velocidad de generación de H_2O_2 por microsomas hepáticos suplementados con NADPH. La omisión de NADPH o de microsomas del sistema completo previno la formación de H_2O_2

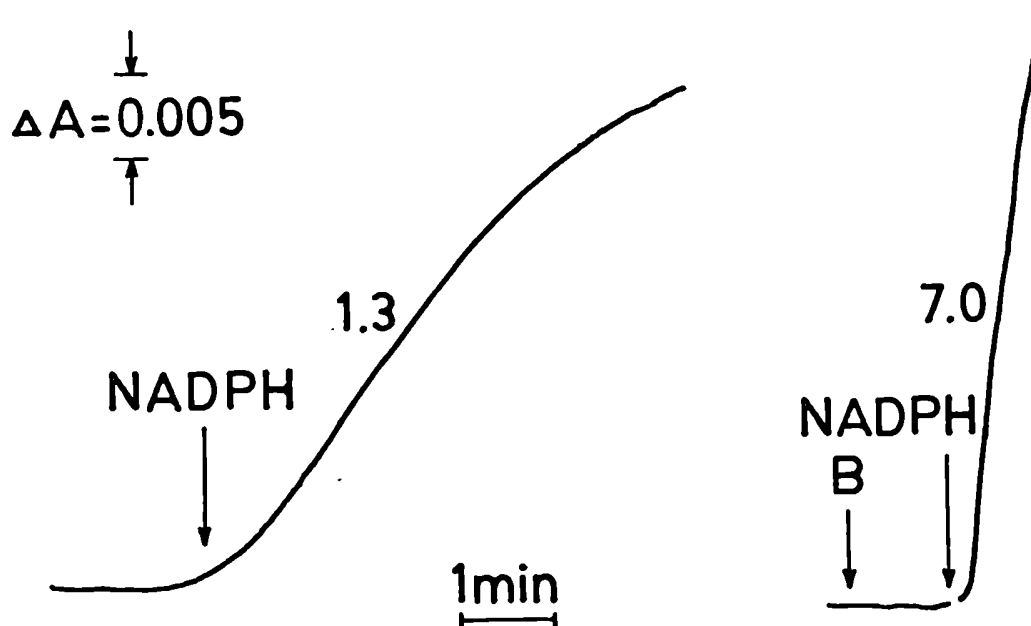


Fig. 37. Generación de H_2O_2 por microsomas de hígado de rata en presencia de benznidazol. La mezcla de reacción contenía microsomas (0.5 mg de proteína/ml), amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.4, KCl 130 mM, y peroxidasa de rábano 0.8 μ M. Donde se indica se añadieron NADPH 0.3 mM y benznidazol 1.0 mM. Otras condiciones experimentales como en Materiales y Métodos. El valor cerca del trazado indica la velocidad en nmoles de H_2O_2 /min por mg de proteína.

El benznidazol estimuló linealmente la producción de H_2O_2 por microsomas de hígado de rata (Fig. 38 A). En las mismas condiciones experimentales, el benznidazol fue incapaz de estimular la generación de H_2O_2 por microsomas de epimastigotes de T. cruzi (Fig. 38 B). Tampoco pudo obtenerse estímulo de la producción de H_2O_2 por benznidazol utilizando otros dadores de electrones como el NADH y otras fracciones subcelulares de T. cruzi (fracción mitocondrial, sobrenadante), homogenados ó células intactas (datos omitidos).

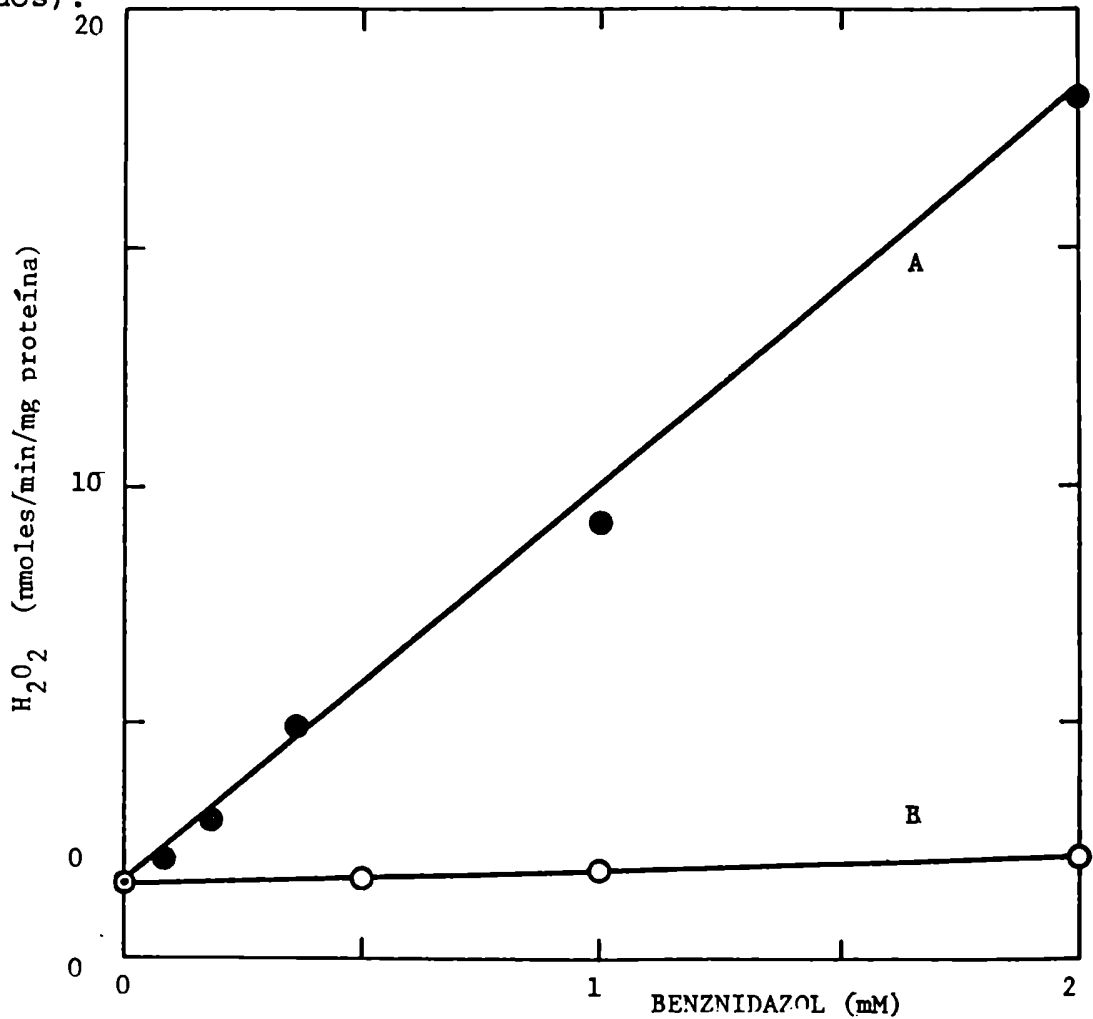


Fig. 38. Efecto de la concentración de benznidazol sobre la producción de H_2O_2 por microsomas de hígado (A) y de T. cruzi. Condiciones experimentales como en la Fig. 37. T. cruzi: 2.0 mg de proteína/ml. Concentración de benznidazol en la abscisa.

Inhibición del crecimiento del *T. cruzi*

Concentraciones de benznidazol menores de las necesarias para estimular la generación de derivados de la reducción parcial del oxígeno en microsomas de hígado de rata e incapaces de generar estos radicales en las fracciones subcelulares, homogenados y células intactas de *T. cruzi* fueron efectivas en inhibir el crecimiento del parásito en cultivo (Fig. 39).

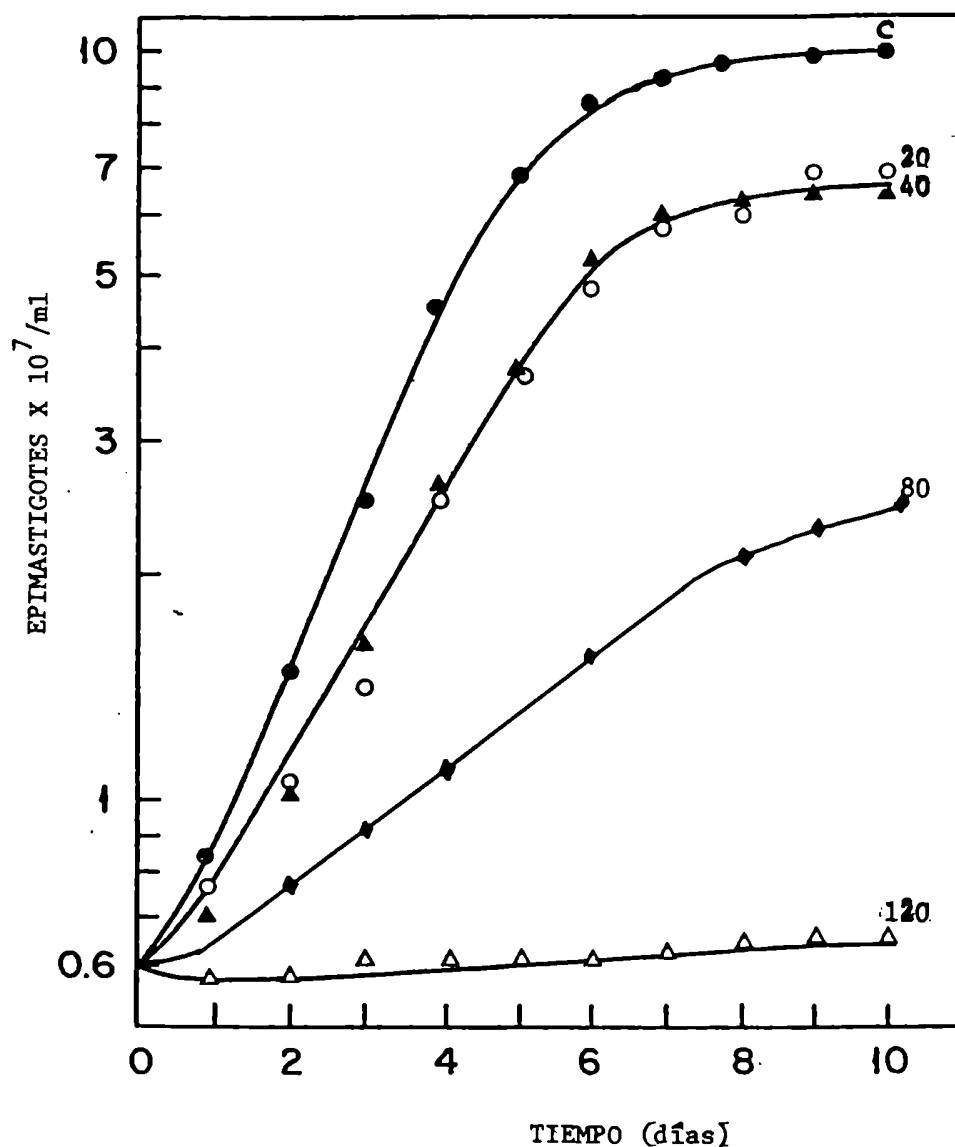
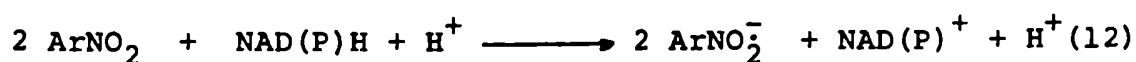


Fig. 39. Efecto del benznidazol (20,40,80 y 120 µM) sobre el crecimiento del *Trypanosoma cruzi*. C: control. Condiciones experimentales como en Materiales y Métodos.

DISCUSION

Mecanismo de toxicidad del nifurtimox en el T. cruzi y en el huésped.

Nuestros estudios indican que el primer intermediario de la reducción del nifurtimox en el T. cruzi es presumiblemente el radical aniónico derivado (Reacción [12]):



El radical reacciona con el O_2 generando O_2^- (reacción 13) que a su vez produce H_2O_2 ya sea espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (reacción [1]). La interacción del H_2O_2 con el O_2^- puede llevar a la producción de radical OH^\cdot (reacción [2]) que como ya mencionamos en la Introducción ha sido postulado como una de las especies de bajo peso molecular más dañinas generadas por las radiaciones ionizantes. Estas reacciones pueden llevar a producir extensos daños en los ácidos nucleicos (Olive, 1978) y formación de peróxidos lipídicos y orgánicos (Tappel, 1973). En el esquema de la Fig.40 se detalla el posible mecanismo de la acción tripanocida del nifurtimox:

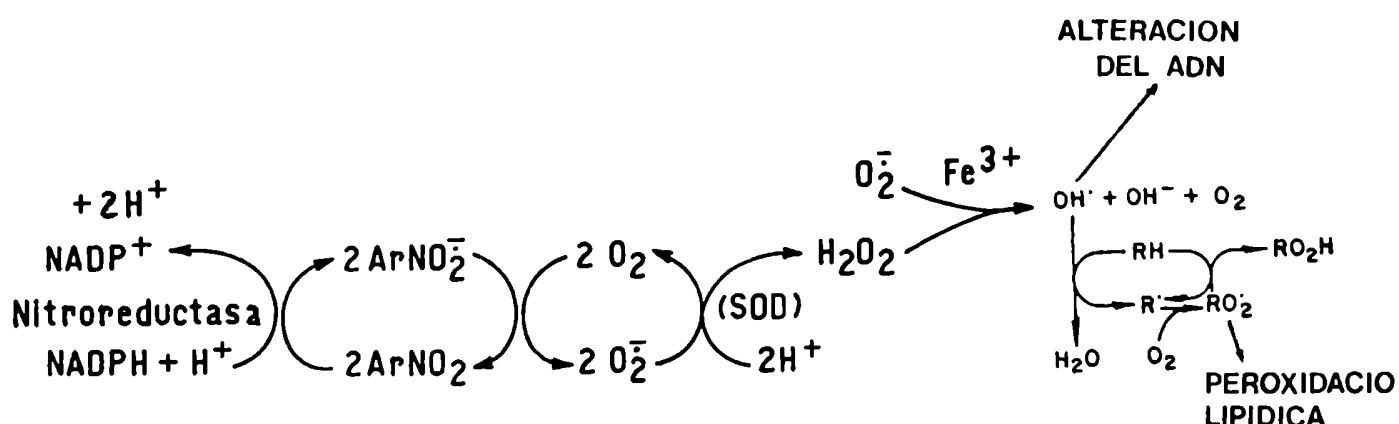


Fig. 40. Posible mecanismo de toxicidad del nifurtimox en T. cruzi

La concentración sérica que se alcanza luego de la administración oral de nifurtimox (15 mg/kg de peso) en el hombre es de alrededor de 10-20 μM , valor que está cercano a la concentración de nifurtimox que produce: a) máxima estimulación de la formación de O_2^- por la fracción mitocondrial de T. cruzi (Fig. 9); b) inicia la difusión de H_2O_2 fuera de las células intactas (Fig. 11) y c) inhibe completamente el crecimiento del T. cruzi en medio de cultivo (Fig. 12). Otros mecanismos de toxicidad, sin embargo, no pueden excluirse. Uno de esos posibles mecanismos consiste en la unión del radical libre nitroaromático o de metabolitos relacionados a las macromoléculas celulares

El esquema de la Fig. 40 que detalla el posible mecanismo de acción tripanocida del nifurtimox podría aplicarse también para

explicar los efectos tóxicos colaterales de esta droga en el huésped, ya que se detectó: a) la formación del radical aniónico derivado (Figs. 13-15, 17-18) en microsomas de hígado y en homogenados de otros órganos blanco de su toxicidad; b) un incremento de la utilización microsomal de O_2 (Figs. 19 y 20, Tablas 7-9); c) un estímulo de la generación de O_2^- por microsomas de diferentes tejidos (Figs. 21 y 22, Tablas 8, 9 y 12) y d) un estímulo de la velocidad de formación de H_2O_2 por microsomas de hígado (Tabla 8). Además de estos efectos, el nifurtimox incrementó la velocidad de peroxidación lipídica por los microsomas hepáticos (Figs. 23 y 24, Tabla 13).

Los efectos de los inhibidores de las Tablas 6 y 9 indican que la reducción inicial de la droga es catalizada por la NADPH citocromo P-450 (c) reductasa, siendo capaz el radical formado de reaccionar con oxígeno molecular para generar anión superóxido. La dismutación del O_2^- da origen al H_2O_2 y la reacción de Haber-Weiss que sigue (dependiente de iones Fe^{3+}) da origen al radical OH^\cdot y posiblemente al 1O_2 que pueden causar: peroxidación lipídica, daño a los ácidos nucleicos y daño biológico. Parte de la oxidación de NADPH y del consumo de O_2 observados en la Tabla 8 pueden deberse a la reacción del O_2^- y del OH^\cdot con el NADPH, como también ha sido sugerido para otros nitrofuranos (Biaglow y col. 1977). Los resultados de la Tabla 11 están de acuerdo con esta hipótesis. El efecto de inhibidores específicos del citocromo P-450 (metopirona y SKF-525-A) sobre la oxidación de NADPH, el consumo de O_2 y la formación de O_2^- (Tabla 9) y de estos inhibidores (CO, metopirona) sobre la formación del radical

aniónico del nifurtimox (Tabla 6) indican que el citocromo P-450 puede estar involucrado en la conversión del radical aniónico nitro en otro producto de reducción del nifurtimox. Estas reacciones podrían explicar la falta de estequiometría entre el consumo de O_2 , la formación de O_2^- y H_2O_2 y la oxidación de NADPH por microsomas en presencia de nifurtimox (Tabla 8).

Los microsomas de cerebro, testículos y riñón de rata muestran una producción incrementada de O_2^- cuando se los incubaba con nifurtimox y los homogenados de cerebro y testículos también son capaces de generar el radical aniónico del nifurtimox (Figs. 17 y 18). Aunque estas actividades no son tan altas como las de microsomas de hígado podrían ser las responsables de las lesiones producidas en esos tejidos por la acción tóxica del nifurtimox (Hoffman, 1972). Los mecanismos de detoxificación del H_2O_2 en cerebro y testículos no son claros. Las enzimas protectoras como la glutatión peroxidasa y la catalasa, que actúan en otros tejidos para destruir al H_2O_2 (Introducción) parecen estar en muy baja actividad o ausentes en cerebro (Cohen y Hochstein, 1973) y testículos (Buhrley y Ellis, 1973). El tejido cerebral es muy sensible a la inhibición de la glucólisis cuando se añaden agentes generadores de H_2O_2 como los 0-6 p-hidroxi fenoles (Hochstein y Cohen, 1960; Cohen y Hochstein, 1963). Esta sensibilidad puede contribuir a la susceptibilidad del cerebro a los efectos citotóxicos del nifurtimox. Por otra parte la peroxidación lipídica iniciada por los radicales libres generados a través del ciclo redox del nifurtimox pueden constituir un importante mecanismo para explicar el daño del cerebro y otros tejidos. Asimismo las alteraciones ultraestructurales observadas en testículo de rata

luego de inocular nifurtimox son similares a las producidas por radiaciones ionizantes (Hugon y Borgers, 1966) que generan radical OH^{\cdot} . Los daños ultraestructurales observados pueden interpretarse como resultado de una alteración inmediata de las células de Sertoli que a su vez produce un defecto en las células germinales (compartimiento apical), especialmente las más activas los espermatoцитos primarios, que degeneran en su totalidad con los tratamientos prolongados. Como alteración secundaria y debido al aumento de la fagocitosis por las células de Sertoli, se observa, luego de tratamientos prolongados, un aumento de lisosomas secundarios (cuerpos multivesiculares), inclusiones lipídicas y otros derivados de la actividad fagocítica.

La reducción enzimática del grupo nitro es requerida para la acción bactericida de los nitrofuranos. La reducción del grupo nitro es necesaria para el efecto mutagénico en bacterias y para la rotura del ADN bacteriano o de mamífero, así como para la unión covalente de los intermediarios de la reducción de los nitrofuranos a las proteínas y al DNA. El o los intermediarios responsables por estos fenómenos son todavía desconocidos y deben tener un estado de oxidación entre el radical nitro y la amina (Peterson y col. 1979). La mayoría de los autores creen que la hidroxilamina, que es el producto de reducción por cuatro electrones, es el metabolito reactivo responsable de los efectos biológicos de los nitrocompuestos (Peterson y col. 1979). Ya que la nitrorreducción del nifurtimox procede a través de un radical libre aniónico, se plantea el interrogante sobre si los equivalentes de reducción requeridos para la formación de la

Hidroxilamina y la amina derivan a través de la nitrorreductasa del NADPH, o, como ha sido sugerido por estudios electroquímicos (Peterson y col. 1979) del propio radical libre.

El decaimiento de segundo orden del radical implica que es el propio radical el que provee el segundo electrón necesario para la formación del nitrosoderivado. Los nitrosocompuestos son conocidos como muy reactivos y susceptibles de reducción enzimática o no enzimática por NADPH (Guillette, 1971). Este intermediario también puede ser reducido por el radical aniónico nitroaromático (Kastening, 1964). Por lo tanto, el radical aniónico podría proveer todos los equivalentes de reducción necesarios para formar la amina derivada. Sin embargo, los resultados de la Tabla 9 indican que probablemente el citocromo P-450 puede intervenir transportando electrones del NADPH al nitrosoderivado para formar la hidroxilamina. En este sentido, es apropiado destacar que el citocromo P-450 es esencial al menos en el último paso de la reducción del nitrobenzeno a anilina, la reducción de la fenilhidroxilamina (Harada y Omura, 1980).

Mecanismo de desintoxicación hepática del nifurtimox

Los cambios en el nivel del glutatión oxidado (GSSG) en la bilis pueden deberse a múltiples factores que determinan ya sea su síntesis o su degradación. Dos factores influyen en su síntesis: a) la actividad de la GSH peroxidasa, la enzima limitante en la síntesis de GSSG y b) la disponibilidad del sustrato para la glutatión peroxidasa, es decir, hidroperóxidos lipídicos y peróxido de hidrógeno. Nuestros estudios demostraron la ausencia de

modificaciones de la actividad de la GSH peroxidasa en las ratas tratadas con nifurtímox. Sin embargo, el nifurtímox indujo la generación de H_2O_2 y la peroxidación lipídica in vitro por microsomas de hígado de rata (Tabla 8, Figs. 23 y 24). Aunque los conjugados dieno no fueron elevados in vivo luego del tratamiento de las ratas con nifurtímox este resultado podría indicar solamente un eficiente mecanismo de metabolización de hidroperóxidos.

En la degradación de GSSG son importantes dos factores: a) la actividad de la GSSG reductasa y b) la disponibilidad de la coenzima de la GSSG reductasa, el NADPH. El nifurtímox estimuló la oxidación de NADPH por microsomas de hígado de rata (Tablas 8 y 9), es decir el consumo de coenzima, y por otro lado inhibió la actividad in vitro de la glutatión reductasa de hígado de rata (Fig. 30). Aunque in vivo esta actividad enzimática no fue afectada, esto puede atribuirse a una inhibición reversible de la enzima como ha sido demostrado en el caso de otros nitrofuranos (Buzard y col. 1960).

Por lo tanto, el aumento de la liberación de GSSG no puede ser solamente el resultado de un incremento de la peroxidación lipídica y parece más probable que sea causado por una combinación de factores múltiples que revelan el stress oxidativo de las células. En este contexto, vale la pena mencionar que un incremento en la liberación de GSSG ha sido observado durante las transiciones oxidativas asociadas a la oxidación de drogas y durante el metabolismo de hidroperóxidos endógenos y exógenos (Sies y Summer, 1975; Sies y col. 1978; Oshino y Chance, 1977).

Se ha demostrado la conversión enzimática de varios nitrofuranos en conjugados del glutatión con liberación de nitritos (Boyland

Y Speyer, 1970). Esta reacción lleva a la pérdida de la toxicidad de los nitrofuranos ya que ésta es marcadamente dependiente de la presencia de grupos nitro. Por lo tanto, la liberación de GSH del hígado inducida por el nifurtimox podría explicarse por la formación de un conjugado del mismo. Sin embargo, otros mecanismos de deplección del GSH hepático no pueden excluirse. Es posible que debido a su capacidad secuestrante de radicales, el GSH reaccione con los radicales generados por el nifurtimox (Fig. 22). Los radicales combinados con el glutatión que resultarían podrían, por un lado, llevar a alteraciones funcionales de las proteínas celulares y de membrana y, por el otro, a una pérdida de GSH hepático, ya que este escaparía a la determinación por el método que utilizamos. Otra posibilidad es que el nifurtimox impida la síntesis de novo del GSH.

Los estudios espectrofotométricos de las bilis de las ratas tratadas con nifurtimox, dieron indicaciones de diferentes máximos de absorción a 295 nm y 415 nm. Una absorbancia similar a 415 nm ha sido observada en hígados aislados luego de ser perfundidos con nitrofurantoina y se ha sugerido que posiblemente fuera debida a un metabolito polar de ese nitrofurano (Jonen y Kaufman, 1980). En estudios anteriores se había demostrado la existencia de una vía de metabolización de los nitrofuranos que lleva a la formación de metabolitos polares amarillos que absorben cerca de 415 nm y que se detectan en la orina de animales tratados con esos nitrofuranos (Olivard y col. 1962; Paul y col. 1960). Posteriormente, esos metabolitos fueron identificados en la orina de ratas tratadas con nitrofurantoina como mezclas tautoméricas de 4-hidroxi-5-nitrofuranc

carboxaldehído y sus correspondientes formas aci-nitro, indicativas de la hidroxilación metabólica del anillo furano (Olivard y col. 1976).

Aunque la naturaleza química de estos metabolitos del nifurtimox encontrados en la bilis no se ha identificado, parece posible que puedan ser 4-hidroxiderivados de la droga.

Mecanismo de toxicidad del benznidazol en el T. cruzi y en el huésped

El benznidazol es reducido por los microsomas de hígado de rata a un radical aniónico nitroaromático. La reoxidación de este radical se acompaña de la formación de radicales derivados de la reducción parcial del oxígeno. Se encontró que el benznidazol: a) indujo un aumento del consumo de oxígeno microsomal (Fig. 34 y Tabla 16); b) estimuló la velocidad de generación de O_2^- (Figs. 35 y 36 y Tabla 16) y c) incrementó la velocidad de formación de H_2O_2 (Figs. 37 y 38). Además de estos efectos, se obtuvieron evidencias de la formación del radical aniónico por espectrometría de resonancia paramagnética electrónica (Fig. 33). Los efectos de los inhibidores de la Tabla 16 indican que la reducción inicial de la droga es iniciada por la NADPH citocromo P-450 (c) reductasa, siendo la droga capaz de reaccionar con oxígeno molecular para generar anión superóxido, cuya dismutación determina la formación de H_2O_2 . El efecto de los inhibidores específicos del citocromo P-450 (metopirona y SKF-525-A) sobre el consumo de O_2 y la generación de O_2^- (Tabla 16) estimulados por el benznidazol, indica que el citocromo P-450 no está involucrado en la reducción del benznidazol.

La reacción del benznidazol con el oxígeno bloquea la reducción posterior del grupo nitro y de esa forma inhibe la formación de intermediarios presumiblemente responsables de la unión al ADN como ha sido descrito para otros nitroimidazoles (La Russo y col., 1977). Se cree que esta interacción con el ADN puede ser responsable de la toxicidad del benznidazol en el T. cruzi (Polak y Richle, 1978).

La toxicidad selectiva del benznidazol contra el T. cruzi (Polak y Richle, 1978) puede explicarse a través de la reacción de detoxificación entre el oxígeno y el radical aniónico. Ya que la reducción a través de la cesión de un electrón ocurre solamente en los tejidos de mamífero, el oxígeno oxida al radical transformándolo nuevamente en la droga original antes de que ocurra alguna interacción entre el radical libre y las macromoléculas y antes de que ocurra la reducción de ese radical con la formación de derivados nitroso e hidroxilamina, los que son aparentemente responsables de los efectos mutagénicos (Rosenkranz y Speck, 1976) de la rotura del ADN (Olive y Mc Calla, 1977) y de la alquilación de proteínas (Mc Calla y col., 1971). Esta deducción está apoyada por la falta de toxicidad de esta droga en el hombre. Estas evidencias también indican que la cantidad de anión superóxido y peróxido de hidrógeno generados in vivo por esta droga, no es citotóxica y no debe sobrepasar los niveles basales. Finalmente la reacción entre el radical y el oxígeno podría explicar la falta de actividad carcinogénica del benznidazol, ya que el O_2 inhibe completamente su reducción al contrario de lo que ocurre con el potente carcinógeno 4-nitroquinolina N-óxido, cuya reducción es, en parte, insensible al oxígeno (Kato y col. 1970).

CONCLUSIONES FINALES

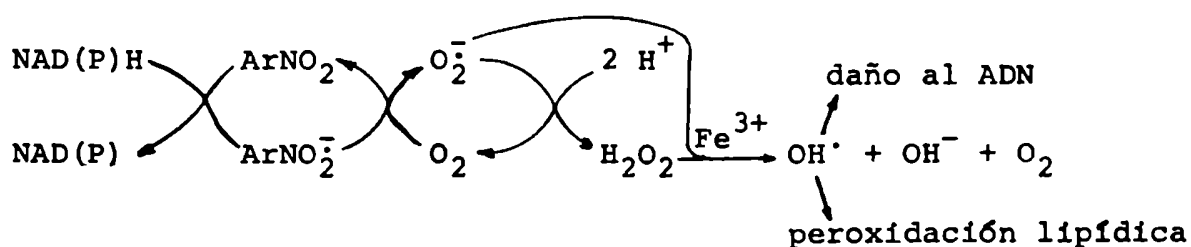
A pesar de que la Enfermedad de Chagas, causada por el Trypanosoma cruzi, es un importante problema de Salud Pública para muchos países Latinoamericanos no se ha conseguido hasta el momento el diseño de un adecuado agente terapéutico.

Un intento racional para el diseño y selección de agentes terapéuticos es el que se basa en la detección de mecanismos biológicos o moleculares en el parásito que puedan ser afectados por drogas que a la vez resulten inocuas para el huésped. En teoría, cualquier reacción metabólica importante para el parásito puede ser considerada un adecuado blanco para los agentes quimioterápicos.

Desde hace varios años se han estado estudiando diferentes vías metabólicas en el T. cruzi con el objeto de encontrar diferencias que puedan llegar a ser importantes para el diseño de nuevos agentes tripanocidas. La principal diferencia bioquímica que se ha encontrado hasta el presente es el bajo desarrollo de los mecanismos protectores del parásito contra los productos derivados de la reducción parcial del oxígeno.

La ausencia de mecanismos eficientes de defensa contra la acción deletérea de los productos de la reducción parcial del oxígeno puede tener una importancia fundamental para el desarrollo de quimioterápicos que presenten toxicidad selectiva. Un avance importante en este sentido está representado por las investigaciones que realizamos sobre el mecanismo de acción de nitrofuranos y nitroimidazoles.

El nifurtimox, un derivado nitrofurano, es una de las drogas más efectivas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Concentraciones farmacológicas de nifurtimox son capaces de producir una estimulación máxima de la producción de O_2^- por fracciones mitocondriales y microsomales de T. cruzi e iniciar la difusión de H_2O_2 fuera de las células (Figs. 9-11). El primer paso en la reducción enzimática del nifurtimox consiste en la transferencia de un solo electrón con generación del radical aniónico del mismo (Figs. 3-7). Este radical aniónico reacciona con el oxígeno regenerando el nifurtimox y generando O_2^- que dismuta



a H_2O_2 . Su reacción con O_2^- catalizada por Fe^{3+} lleva a la generación de radical oxhidrilo (OH^{\cdot}) capaz de iniciar procesos de peroxidación lipídica y daño a los ácidos nucleicos. Este mecanismo aparentemente es efectivo en todos los estadios celulares de T. cruzi (Figs. 3-11) y puede ser responsable de los efectos tóxicos colaterales del nifurtimox en los tejidos del huésped parcialmente deficientes en mecanismos protectores contra los derivados de la reducción parcial del oxígeno como el cerebro y los testículos (Figs. 17,18 y 25, Tabla 12) y constituye justamente una de las limitaciones para el uso de esta droga en Medicina. En el hígado la reducción de esta droga es iniciada por la NADPH citocromo P-450 (c) reductasa, interviniendo también el citocromo P-450

en su desintoxicación. A pesar de la efectiva generación de derivados de la reducción parcial del oxígeno por los microsomas de hígado (Figs. 21,22; Tablas 8 y 9) y de la peroxidación lipídica que ocurre in vitro (Figs. 23 y 24, Tabla 13) los eficientes mecanismos de desintoxicación del hígado de los productos derivados de la reducción parcial del oxígeno (Figs. 26-30) llevan a no provocar daños in vivo (Tabla 15).

El benznidazol, un nitroimidazol también efectivo contra la enfermedad de Chagas, tuvo un mecanismo similar de generación de derivados de la reducción parcial del oxígeno en microsomas de hígado de rata (Figs. 36-38, Tabla 16). Sin embargo, las concentraciones utilizadas fueron un orden de magnitud superiores a las utilizadas en el caso del nifurtimox, por lo que la reacción del radical aniónico derivado del benznidazol con el oxígeno probablemente constituyó un mecanismo de desintoxicación evitando la formación de derivados de la reducción de la droga potencialmente tóxicos (nitrosoderivado, hidroxilamina) Estas reacciones no ocurrieron en el T. cruzi (Figs. 33, 36 y 38) lo que explicaría la toxicidad de la misma sobre el parásito, ya que en él podrían generarse otros productos de reducción de la droga que no aparecen en los tejidos del huésped debido a la mencionada reacción de desintoxicación.



REFERENCIAS

- ALBERT, A (1973) "Selective Toxicity", Chapman and Hall, London.
- ALLEN, R.C., YEVICH, S.J., ORTH, R.W., STEELE, R.H. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60,909.
- AYSCOUGH, P.B., ELLIOT, A.J., SAMON, G.A. (1978) J. Chem. Soc. Faraday Trans 1,74
- BARTOLI, G.M., GALEOTTI, T., PALOMBINI, G., PARISI, G. (1976) Biochem. Hamburg Abs. 06-7-096, p.348.
- BERTINO, J. (1979) Cancer Res. 39, 293.
- BIAGLOW, J.E., GREENSTOCK, C.L., JACOBSON, B., RALEIGH, J. (1977) Mol. Pharmacol. 13, 269.
- BIELSKI, B.H.J., CHAN, P.C. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3841.
- BOVERIS, A., OSHINO, N., CHANCE, B. (1972) Biochem. J. 128, 617.
- BOVERIS, A., CHANCE, B. (1973) Biochem J. 134, 707.
- BOVERIS, A. (1977) En "Tissue Hypoxia and isquemia", Plenum Press.
- BOVERIS, A., MARTINO, E., STOPPANI, A.O.M. (1977) AnalBiochem. 80, 145.
- BOVERIS, A., STOPPANI, A.O.M. (1977) Experientia 33, 1306.
- BOVERIS, A., DOCAMPO, R., TURRENS, J.F., STOPPANI, A.O.M. (1978) Biochem, J. 175,431.
- BOVERIS, A. , SIES, M., MARTINO, E., DOCAMPO, R., TURRENS, J.F. STOPPANI, A.O.M. (1980) Biochem J. 188,643.
- BOYLAND, E., SPEYER, B.E. (1970) Biochem. J. 119, 463.
- BRODIE, A.F. (1965) En "Biochemistry of Quinones", Ed.R.A. Morton Academic Press, London and New York, p. 355.
- BUETNER, G.R., OBERLEY, L.W. (1979) FEBS Lett. 98,18.
- BUHRLEY, L.E., ELLIS, L.C. (1973) Fertil. Steril. 24, 956.

- BURK, R.F. Jr., NISHIKI, K., LAWRENCE, R.A., CHANCE, B. (1978) J. Biol. Chem. 253, 43.
- BUZARD, J.A., KOPKO, F., PAUL, M.F. (1960) J. Lab. Clin Med. 56, 884.
- CANÇADO, J.R., SALGADO, A.A., BATISTA, S.M., CHIARI, C. (1976) Rev. Goiana Med. 22, 203.
- CHANCE, B. SIES, H., BOVERIS, A. (1979) Physiol. Rev. 59, 527.
- CHANCE, B. (1978) J. Biol. Chem. 253, 43.
- CHIARI, E. (1971) Thesis, Univ. Fed. Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.
- COHEN, S.S. (1977) Science 197, 431.
- COHEN, G., HOCHSTEIN, P. (1963) Dis. Nerv. Syst. 24, 44.
- CRANE, F.L. (1961) En Quinones in Electron Transport, Eds. G.E. W. Wustenholme, C.M.O'Connor, J. and A.Churchill, London, p.36.
- CRUZ, F.S., DOCAMPO, R., BOVERIS, A. (1978). Antimicrob. Ag.Chemother 14, 630.
- DOCAMPO, R., BOISO, J.F., STOPPANI, A.O.M. (1976) Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 8, 21.
- DOCAMPO, R., LOPEZ, J.N., CRUZ, F.S., DE SOUZA, W. (1977) Exp. Parasitol. 42, 142.
- DOCAMPO, R., CRUZ, F.S., BOVERIS, A., MUNIZ, R.P.A., ESQUIVEL, D.M.S. (1978a) Arch. Biochem. Biophys. 186, 292.
- DOCAMPO, R., DE SOUZA, W., CRUZ, F.S., ROITMAN, I., COVER, B. GUTTERIDGE, W.E. (1978 b). Z. Parasitenkunde 57, 189.
- DOCAMPO, R., BOISO, J.F., STOPPANI, A.O.M. (1978c) Biochim. Biophys. Acta 502, 466.
- DOCAMPO, R., CRUZ, F.S., BOVERIS, A., MUNIZ, R.P.A., ESQUIVEL, D.M.S. (1979 a) Biochem. Pharmacol, 28, 723
- EDITORIAL (1978) Lancet 810 , 1190
- ELLMAN, G.L. (1959) Arch. Biochem. Biophys. 82, 70.
- ERNSTER, L., ORRENIUS, S. (1965) Fed. Proc. 24, 1190.
- ERNSTER, L., NORDENBRAND, K. (1967) En "Methods in Enzymology", Academic Press, New York, V. 10, p. 574.

- FONG, K.L., MC CAY, P.B., POYER, J.L., KEELE, B.B., MISRA, H. (1973) J. Biol. Chem 248, 7792.
- FRIDOVICH, I. (1974) Adv. Enzymol. 41,35.
- FRIDOVICH, I. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4053.
- GONÇALVES, A.M., VASCONCELLOS, M.E.L., DOCAMPO, R., CRUZ, F.S., DE SOUZA, W., LEON, W. (1980) Molec. Biochem. Parasitol.1, 167.
- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.S., DAVID, M.N. (1969) J. Biol. Chem 197, 751.
- GREENSTOCK, C.L., DUNLOP, I., NETA, P. (1973) J. Phys Chem 77, 1187
- GRUNBERG, E., TITSWORTH, E.H. (1973) Ann. Rev. Microbiol. 27, 317.
- GUILLETTE, J.P. (1971) En "Handbook of Experimental Pharmacology" Springer-Verlag, New York, p. 349.
- GUILLETTE, J.R., MITCHELL, J.R., BRODIE, B.B. (1974) A. Rev. Pharmacol. 14, 271.
- GUTTERIDGE, W.E. (1980) The Host. Invader Interplay . Elsevier. North Holland Amsterdam, p. 583.
- HABER, F., WEISS, J. (1934) Proc.Royal Society London A147, 332.
- HALLIWELL, B. (1978)FEBS Lett. 92, 321.
- HARADA, N., OMURA, T. (1980) J. Biochem. 87, 1539.
- HIMMELWETT, F. (1960) "The collected papers of Paul Erlich", vol. 3, Pergamon, New York.
- HITCHINGS, G., BURCHALL, J.J. (1965) Adv. Enzymol 27, 417.
- HOFFMAN, K. (1972) Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 22, 1590
- HOCHSTEIN, O., COHEN, G. (1960) J. Neurochem 5, 370.
- HUGON, J., BORGERS, M. (1966) Anat. Rec. 155, 15.
- JONEN, H.G., KAUFMAN, I. (1980) Biochem. Pharmac. 29, 263.
- KALLINIKOVA, V.D. (1968) ActaProtozool. 5, 395.
- KASTENING, B. (1964) Electrochem. Acta9,241.
- KATO, R., TAKA HASHI, A. OSHIMA, T. (1970).Biochem Pharmacol. 19,45
- KELLOG, E.W. FRIDOVICH, I. (1975) J.Biol. Chem. 250, 8812.

- KLAASSEN, C.D., PLAA, G.L. (1969) *Biochem. Pharmacol.* 18, 2019.
- KUSEL, J.P., BOVERIS, A., STOREY, B.T. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 158, 791.
- LA RUSSO, N.F.M., TOMASZ, M., MULLER, M., LIPMAN, R. (1977) *Mol. Pharmacol.* 13, 872.
- LEON, W., VILLALTA, F., QUEIROZ, T., SZARFMAN, A. (1979) *Infect. Immunity* 26, 1218.
- LOPETEGUI, R., SOSA MIATELLO, C. (1961) *Rev. Soc. Argent. Biol.* 37, 134.
- LOSCHEN, G., AZZI, A., RICHTER, C., FLOHE, L. (1974) *FEBS Lett.* 42, 68.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- MASON, R.P., HOLTZMAN, J.L. (1975) *Biochemistry* 14, 1626.
- MASON, R.P. (1979) En "Reviews in Biochemical Toxicology", Elsevier-North Holland Inc., New York, p. 151.
- MASTERS, B.B.S., KAMIN, H., GIBSON, O.H., WILLIAMS, G.R. Jr. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 921.
- MC CALLA, D.R., REUVERS, A., KAISEM, C. (1971) *Biochem. Pharmacol.* 20, 3532.
- MC CORD, J.M., FRIDOVICH, I. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 6049.
- MC CORD, J.M., DAY, E.D. (1978) *FEBS Lett.* 86, 139.
- MC CORD, J.M., KEELE, B., FRIDOVICH, I. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1024.
- MESHNICK, S.R., CHANG, K.P., CERAMI, A. (1977) *Biochem. Pharmacol.* 26, 1923.
- MICHAELIS, L. (1951) En "The enzymes", Academic Press, New York p.1.
- MISHINE, V., POKROVSKY, A., LYARHOVICH, V.V. (1976) *Biochem J.* 154, 307.
- MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 188.
- MORON, M.S., PIERRE, J.W., MANNERVIK (1979) *Biochem. Biophys. Acta* 582, 67.
- MULLER, M. (1975) *Ann. Rev. Microbiol.* 29, 467.

- NICHIKI, K., OSHINO, N., JAMIESON, D., CHANCE, B. (1978) *Biochem J.* 160, 343.
- NISHIKI, K., OSHINO, N., JAMIESON, D., CHANCE, B. (1976) *Biochem Pharmacol.* 26, 1923.
- OWENS, C. W., BELCHER, R.V. (1965) *Biochem J.* 96, 705
- OLIVARD, J., ROSE, G.M., KLEIN, G.M., HOETIS, J.P. (1976) *J. Med. Chem.* 19, 729.
- OLIVE, P.L. (1978) *Chem. Biol. Interact.* 20 323
- OLIVE, P.L., MC CALLA, D.R. (1979) *Chem. Biol. Interact.* 16, 223
- OLIVARD, J. VALENTI, S., BUZARD, J.A. (1962) *J. Med. Chem.* 5, 524.
- OSHINO, N., CHANCE, B., SIES, H., BUCHER, T. (1973) *Arch. Biochem Biophys.* 154, 106.
- OSHINO, N., OSHINO, R., CHANCE, B. (1974) In "Alcohol and aldehyde metabolizing systems" Eds. R.G. Thurman, T. Yonetani, J.R. Williams and B. Chance. Academic Press, New York, p. 231.
- OSHINO, N., JAMIESON, D., CHANCE, B. (1975a) *Biochem. J.* 146, 53.
- OSHINO, N., JAMIESON, D., SUGANO, T., CHANCE, B. (1975b) *Biochem J.* 146, 67.
- OSHINO, N., CHANCE, B. (1977) *Biochem. J.* 162, 509.
- ORRENIUS, S. (1965) *J. Cell Biol* 26, 713.
- ORRENIUS, S., ERICSSON, J.L.E., ERNSTER, L. (1965) *J. Cell. Biol.* 25, 267.
- PAUL, M.E., ELLIS, V.R., KOPKO, F., BENDER, R.C. (1968) *J. Med. Pharm. Chem.* 2, 563.
- PETERSON, F.J., MASON, R.P., HOUSEPIAN, J., HOLTZMAN, J.L. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4009.
- PLACER, Z.A., CUSHMAN, L.L., JOHNSON, B.R. (1966) *Anal. Biochem* 16, 359.
- POLAK, A., RICHLER, R. (1978) *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72, 45.
- ROSENKRANZ, H.S., SPECK, W.T. (1976) *Biochem. Pharmacol.* 25, 1555.
- RUZICKA, F.L., CRANE, F.L., (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 289.

- SEDLACK, J., LINDSAY, R.H. (1968) *Anal. Biochem.* 25, 192.
- SIES, H., SUMMER, K.H. (1975) *Eur. J. Biochem.* 57, 503.
- SIES, H., KOCH, O., MARTINO, E., BOVERIS, A. (1979) *FEBS Lett.* 103, 287.
- SIES, H., BARTOLI, G.M., BULK, R.F., WAYDHAS, C. (1978) *Eur. J. Biochem* 89, 113.
- SLATER, E.C., COLPA-BOONSTRA, J.P., LINKS, L. (1961) En "Quinones in Electron transport, J. and A. Churchill , London, p. 36
- SLIGER, S.G., LIPSCOMB, J.D., DE BRUNNER, P.G., GUNSALUS, I.C. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 290.
- STANIER, R.Y., DOUDOROFF, M., ADELBERG, E.A. (1970) "The microbial world", Prendice-Hall, Engle Wood Cliffs, N. 1.
- STEINHOFF, D., GRUNDMANN, E. (1972) *Arzneim. Forsch. (Drug Res)* 22, 1607.
- STOPPANI, A.O.M., DOCAMPO, R., BOISO, J.F., FRASCH, A.C.C. (1980) *Molec. Biochem Parasitol*, 2,3.
- TAPPEL, A.L. (1973) *Fed. Proc.* 32, 1870.
- TAYLOR, A.E.R., BAKER, J.R. (1968) "The cultivation of Parasites in vitro" Blackwell, Oxford.
- THAYER, W.S. (1977) *Chem, Biol. Interact.* 19, 265.
- TIETZE, F. (1969) *Anal. Biochem.* 27, 1870.
- TYLER, D.D. (1975) *Biochem J.* 147, 493.
- VAN DEN BOSSCHE, H. (1978) *Nature (London)* 173, 626.
- VILLALTA , F., LEON, W. (1979) *J. Parasit.* . 65, 188.
- WANG, C.Y., BEHRENS, B.C., ICHIKAWA, M., BRYAN, G.T. (1974) *Biochem. Pharmacol.* 13, 3395.
- WARREN, L. (1960) *J. Parasitol.* 46, 529.
- WOLPERT, M.K., ALTHAUS, J.R., JOHNS, D. (1973) *J. Pharmac. Exp. Ther.* 185, 202.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1960) *World Health Organ. Tech. Rep. Ser. No 202*, p. 21.
- YAMAZAKI, I., ONISHI, T. (1966) *Biochem. Biophys. Acta.* 112,469.
- ZIMMERMAN, R., FLOHE, L., WEISER, V., HARTMAN, H.J. (1973) *FEBS Lett* 29,117.