

Tesis de Posgrado

El DNA del trypanosoma cruzi : Acción de drogas tripanocidas

Goijman, Silvia G.

1983

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:

Goijman, Silvia G.. (1983). El DNA del trypanosoma cruzi : Acción de drogas tripanocidas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1814_Goijman.pdf

Cita tipo Chicago:

Goijman, Silvia G.. "El DNA del trypanosoma cruzi : Acción de drogas tripanocidas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1814_Goijman.pdf

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

EL DNA DEL TRYPANOSOMA CRUZI: ACCION DE DROGAS TRIPANOCIDAS

(TESIS)

AUTOR: SILVIA G. GOIJMAN

DIRECTOR: PROF. DR. ANDRÉS O.M. STOPPANI

CONSEJERO DE ESTUDIOS: PROF. DR. CARLOS P. LANTOS

LUGAR DE TRABAJO: CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOENERGÉTICAS CONICET
E INSTITUTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE MEDICINA,
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. A.O.M. Stoppani por haberme permitido desarrollar mis tareas de investigación científica en el Centro de Investigaciones Bioenergéticas que él dirige, por su orientación y apoyo en el desarrollo de mi trabajo.

Al Dr. A.C.C. Frasch junto a quien tuve el honor de trabajar iniciándome en la Biología Molecular del Trypanosoma cruzi, quiero agradecerle también por sus consejos que contribuyeron a mi formación.

Al Dr. C.P. Lantos por sus consejos y apoyo para la realización de esta Tesis.

A la Dra. M. Dubín por su colaboración en los experimentos de glutatión hepático y peroxidación lipídica y por su amistad.

Al Dr. R. Docampo por haberme interesado en los nitroderivados y su acción sobre el Trypanosoma cruzi.

A mis compañeros de laboratorio por su colaboración y estímulo.

Por último quiero expresar mi agradecimiento al personal docente y no docente del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Medicina, por el apoyo brindado durante mis tareas.

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

1. Cleavage of Trypanosoma cruzi DNA by nifurtimox metabolites.
S.G. Goijman, A.C.C. Frasch, S.N.J. Moreno, R. Docampo, A.O.M. Stoppani
Journal of Protozool. 29, 332-333 (1982)
2. Efectos diferentes del nifurtimox y el benznidazol sobre la biosíntesis de DNA, RNA y proteínas en el Trypanosoma cruzi
S.G. Goijman, A.C.C. Frasch, A.O.M. Stoppani
Medicina (Buenos Aires) 42, 840-843 (1982)
3. Inhibición del crecimiento y la biosíntesis de macromoléculas en el Trypanosoma cruzi, por productos naturales: Efecto de la miconidina y la tingenona.
S.G. Goijman, J.F. Turrens, G.B. Marini-Bettolo, A.O.M. Stoppani
Medicina (Buenos Aires) (en prensa)
4. Inhibitory action of trypanocidal drugs on macromolecule synthesis in T. cruzi
S.G. Goijman, A.C.C. Frasch, A.O.M. Stoppani
Journal of Protozool. 30, 169-170 (1983)
5. Efectos del nifurtimox, benznidazol y β lapachona sobre el metabolismo del DNA, RNA y proteínas en el Trypanosoma cruzi.
S.G. Goijman, A.O.M. Stoppani
Revista Argentina de Microbiología (en prensa)
6. Effect of nitroheterocyclic drugs on lipid peroxidation and glutathione content in rat liver extracts.
M. Dubín, S.G. Goijman, A.O.M. Stoppani
Enviado para su publicación.

ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxirribonucleico
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
GSH	Glutation reducido
GSSH	Glutation oxidado
kDNA	DNA kinetoplástico
MDA	Malondialdehído
nDNA	DNA nuclear
1O_2	Oxígeno singulete
O_2^-	Anión superóxido
OH \cdot	Radical oxhidrilo
RNA	Acido ribonucleico
SDS	Sodio dodecil sulfato
SOD	Superóxido dismutasa
SSC	NaCl 0.15 M, citrato de sodio 0.015 M
TBA	Acido 2-tiobarbitúrico
TCA	Acido tricloroacético
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano

INDICE

INTRODUCCION

1.	La enfermedad de Chagas	1
2.	Ciclo biológico del <u>T. cruzi</u>	3
3.	Organización y estructura del DNA nuclear y kinetoplástico del <u>T. cruzi</u>	5
4.	Formación y toxicidad de los productos de la reducción parcial del oxígeno	9
5.	Detoxificación de los productos de la reducción parcial del oxígeno en el <u>T. cruzi</u>	15
6.	Diseño de drogas quimioterápicas	18
7.	Interacciones físico-químicas entre distintos compuestos químicos y los ácidos nucleicos	20
8.	Agentes quimioterápicos usados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas	24
8.1	Las naftoquinonas como generadores de radicales libres en el <u>T. cruzi</u>	25
8.2	Nitroderivados	28
8.2.1	Generalidades	
8.2.2	Los nitroderivados como generadores de productos de la reducción parcial del oxígeno	30

MATERIALES Y METODOS

1.	Cultivo y mantenimiento del <u>T. cruzi</u>	36
2.	Fraccionamiento subcelular	
2.1	Fracción microsomal de <u>T. cruzi</u>	36
2.2	Fracción microsomal de hígado de rata	36
3.	Preparación del DNA de <u>T. cruzi</u> marcado con ^3H timidina	37
4.	Aislamiento y purificación del n y kDNA del <u>T. cruzi</u>	37

5.	Incorporación de precursores radiactivos a macromoléculas	38
6.	Determinación de MDA por el método del TBA	39
7.	Análisis de las lesiones causadas por el nifurtimox y benznidazol en el DNA "in vitro"	40
8.	Análisis de las lesiones en el DNA del <u>T. cruzi</u>	
8.1	Análisis de las rupturas en el nDNA	41
8.2	Cálculo del número de rupturas	41
8.3	Análisis de las rupturas en el kDNA	42
8.4	Electroforesis en geles alcalinos de agarosa	43
9.	Inducción de "Síntesis no programada de DNA"	
9.1	Efecto de inhibidores de la síntesis de DNA	43
9.2	Inducción de "Síntesis no programada de DNA" en el <u>T. cruzi</u>	44
	Reactivos	44

RESULTADOS

1.	Análisis de las rupturas inducidas por el nifurtimox y benznidazol en el DNA "in vitro"	46
2.	Relación entre las rupturas en el DNA, peroxidación lipídica y contenido hepático de glutatión reducido	49
3.	Análisis de las rupturas inducidas por el nifurtimox y benznidazol en el DNA del <u>T. cruzi</u> "in vivo"	56
3.1	Lesiones en el nDNA	56
3.2	Lesiones en el kDNA	60
4.	Inducción de "Síntesis no programada de DNA"	64
4.1	Efecto de inhibidores de la síntesis de DNA en el <u>T. cruzi</u>	64

4.2	Inducción de "Síntesis no programada de DNA"	66
5.	Efecto de nifurtimox, benznidazol, α y β lapachona, tingenona y miconidina sobre la síntesis de macromoléculas	67
5.1	Efecto del nifurtimox	67
5.2	Efecto del benznidazol	73
5.3	Efecto de las α y β lapachonas	75
5.4	Efecto de la tingenona y miconidina	77
5.5	Potencia relativa de las drogas tripanocidas como inhibidores de la síntesis de DNA	81
5.6	Efecto del nifurtimox y β lapachona en epimastigotes preincubados con las drogas	82
6.	Efecto del nifurtimox, benznidazol y β lapachona sobre la degradación del DNA, RNA y proteínas	84

DISCUSION

Efecto del nifurtimox y benznidazol sobre los ácidos nucleicos "in vitro"	
Inducción de rupturas	95
Relación entre peroxidación lipídica, lesiones en el DNA y contenido hepático de glutatión reducido	97
Efecto del nifurtimox y benznidazol sobre los ácidos nucleicos del <u>T. cruzi</u> "in vivo"	100
Reparación de las rupturas inducidas por el nifurtimox, benznidazol y β lapachona en el DNA del <u>T. cruzi</u>	105
Efecto de drogas tripanocidas sobre la biosíntesis de macromoléculas en el <u>T. cruzi</u>	110
Conclusiones	117
Bibliografía	119

INTRODUCCION

1. La enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis es una afección parasitaria causada por la presencia en el organismo de un tripanosoma, que pertenece al género de los flagelados, del grupo de los protozoarios. La forma parasitaria se encuentra en invertebrados, plantas y vertebrados y comprende varios géneros que tienen una interesante secuencia evolutiva, que va desde protozoarios parásitos en un huésped invertebrado (monogénico, género Crithidia, Leptomonas, Blastocrithidia y Herpetomonas) a protozoarios parásitos; que tienen en forma alternada huéspedes vertebrados e invertebrados (Nature, vol. 283, Revisión 1978). Entre ellos se encuentran los géneros Leishmania y Trypanosoma que son causantes de enfermedades médicas y de problemas económicos muy importantes, tanto en humanos como en animales. Durante el desarrollo en el insecto o vector y en el mamífero, tanto Leishmania como Trypanosoma, tienen formas morfológicamente comparables a las del género monogénico.

El tripanosoma tiene un ciclo biológico interesante, definido por el método de transmisión y la localización del ciclo de desarrollo en el insecto vector. La más primitiva de estas especies, estercoraria, se desarrolla en el intestino del insecto vector y se transmite a través de las heces, al huésped vertebrado. Ejemplos de T. estercoraria incluyen T.theileri (en ganado), T.lewisi (en roedores) y T. cruzi (agente causal de la Enfermedad de Chagas en humanos). Presumiblemente, las especies más evolucionadas (salivaria) se desarrollan en el intestino y/o boca del insecto vector

(Glossina Sp) y son inoculadas directamente en el torrente sanguíneo del huésped vertebrado, durante su alimentación. Dentro de este grupo se encuentran T.vivax, T.congolense, T.brucei, T.rhodesiense y T.gambiense. Estos tres últimos, no son distinguibles morfológicamente, pero presentan especificidad de huésped. El T.brucei causa una enfermedad mortal al ganado, y el T.rhodesiense y el T.gambiense son los agentes etiológicos de la enfermedad del sueño en humanos.

La Enfermedad de Chagas fue descubierta en 1907 por Carlos Chagas, en el estado de Minas Gerais en Brasil y luego se comprobó en toda Latinoamérica, desde el sur de Estados Unidos hasta la Argentina. Grandes regiones de los países involucrados, se han convertido en áreas endémicas, donde el número de personas infectadas llega a 25 millones, de las cuales, aproximadamente 2 millones han sido localizadas en la Argentina. Sin embargo, no todas son enfermas, sólo el 15% presentan lesiones cardíacas o viscerales y el resto está constituido por portadores, que pueden considerarse como personas sanas.

Esta enfermedad representa un grave problema sanitario que afecta especialmente a las zonas rurales; allí se combinan factores socioeconómicos derivados de las malas condiciones de vida, que permiten que numerosos insectos, incluido el transmisor de la enfermedad de Chagas, encuentren un lugar favorable para su desarrollo.

El T.cruzi tiene afinidad por las células del parénquima del corazón y las células nerviosas del plexo mesentérico.

La enfermedad se inicia en forma aguda y posteriormente pasa a formas crónicas. Una de las complicaciones más frecuentes, como resultado del ataque del parásito al músculo cardíaco, es la cardiopatía chagásica que tiene una mortalidad muy elevada.

En la actualidad se realizan grandes esfuerzos para controlar la enfermedad de Chagas a través de programas nacionales, que consisten en la desinfección domiciliaria, particularmente de ranchos y otro tipo de locales precarios, en el mejoramiento de las viviendas, en la educación popular y en el desarrollo de compuestos activos contra el T.cruzi. Hasta el presente no se han logrado resultados satisfactorios, debido a que las campañas no alcanzaron la efectividad indispensable, por el alto costo de las mismas y por el hecho que hasta el momento, no se ha encontrado un agente quimioterápico adecuado. Se ha avanzado en el tratamiento de la enfermedad aguda, pero la enfermedad crónica, sigue aún sin resolverse.

2. Ciclo biológico del T. cruzi

El ciclo biológico del parásito consiste en dos fases bien diferenciadas; una ocurre en el insecto vector, y la otra en el huésped vertebrado. El invertebrado es un insecto hematófago perteneciente a la familia Reduviidae al que comúnmente se designa vinchuca. Tanto las larvas y ninfas como los insectos adultos, necesitan sangre para su desarrollo; si un insecto se alimenta con sangre que contiene parásitos, se vuelve infeccioso de por vida. En el intestino medio del

vector, el T.cruzi se transforma en epimastigote, el cual se multiplica por fisión binaria longitudinal. En el recto del insecto se desarrollan epimastigotes más chicos, que se convierten en tripomastigotes metacíclicos infectantes. La transmisión se produce por contaminación; cuando el insecto se alimenta, deposita las heces y los parásitos se inoculan en la picadura misma o en las mucosas (conjuntival, bucal o nasal).

En el vertebrado, el T.cruzi sigue un proceso discontinuo de multiplicación en la sangre y los tejidos del sistema retículo endotelial. Luego de penetrar en las células, los tripomastigotes se transforman en amastigotes de 2-4 micrones de diámetro. Por fisión binaria y diferenciación, se forman tripomastigotes que se liberan desde las células parasitadas hacia la sangre, donde circulan un cierto período sin multiplicarse y penetran nuevamente en las células para iniciar un nuevo ciclo tisular.

Como se describió, el parásito sigue una multiplicación discontinua en el hombre, donde se alternan las forma amastigotes en los tejidos y los tripomastigotes en la sangre. La fase aguda se caracteriza por la presencia de un gran número de parásitos en los estadios tisular y sanguíneos, esta fase es seguida por otra crónica con parasitemia sublatente y escasas formas tisulares. El desarrollo de agentes quimioterápicos es complicado por varios hechos inherentes al ciclo de vida del T.cruzi. Hasta el presente se han hecho avances en el tratamiento de las infecciones agudas, cuando los organismos son más accesibles a la acción de los compuestos, pero la

enfermedad crónica aún continúa sin solución.

En el laboratorio se pueden obtener cultivos de T.cruzi. El parásito crece en medios complejos (Taylor y col., 1968) y hasta el momento no ha sido cultivado en un medio completamente definido. La forma de cultivo es la de epimastigote, la diferenciación en las formas tripomastigotes metacíclicos infectantes, ocurre durante la fase estacionaria de los cultivos. Sólo las formas metacíclicas son infectantes para el huésped vertebrado y su infectividad depende de la cepa, el número de tripomastigotes inoculados y el tiempo de cultivo en un medio artificial (Chiari, 1971).

3. Organización y estructura del DNA nuclear y kinetoplástico del T.cruzi

El DNA de los tripanosomas está localizado en dos regiones: en el núcleo y extranuclearmente, en la única mitocondria presente en estos parásitos.

El DNA nuclear, nDNA, tiene un tamaño entre $2-3 \times 10^7$ pares de bases y posee características similares al de las células de eucariotes superiores. Esto es, presenta tres componentes fundamentales cuando se lo analiza por medio de técnicas de desnaturalización y renaturalización. Ellos son:

a) Componente de renaturalización rápida: consiste en secuencias repetidas un gran número de veces, del orden de 10^6 veces por genoma, como el DNA satélite observado en gradientes de CsCl (Smith, 1979; Ohno, 1971). Esta clase de DNA se encontró primero en tripanosomas diskinetoplás-

ticos y por ello se lo consideró una forma alterada de kDNA, debido a que sedimenta a igual densidad que éste, en gradientes de CsCl (Riou y col.,1978). Borst y col.(1980), Frasch y col.(1980) demostraron recientemente que el DNA satélite de T.cruzi posee 170-190 pares de bases y no tiene secuencias homólogas con el kDNA y que está presente aún en tripanosomas con kinetoplasto.

b) Componente de renaturalización intermedia: contiene secuencias repetidas en el orden de 10^1 - 10^5 veces, las secuencias de este tipo están intercaladas entre elementos no repetitivos. En esta fracción están contenidos los genes para el RNA ribosomal, rRNA, presentes aproximadamente 200 veces por genoma haploide (Castro y col.,1981a).

c) Componente de renaturalización lenta: representa las secuencias contenidas sólo una vez por genoma, "copias únicas de DNA". Estas secuencias constituyen una pequeña porción del DNA total. Es probable que en este grupo se incluyan genes ya descritos en otras células eucariotas así como algunos propios de estos parásitos. De este último grupo, los mejores estudiados son los correspondientes a las proteínas de superficie de los tripanosomas africanos(Hoeijmakers y col., 1980; Vickerman, 1978).

Los experimentos de renaturalización en el T.cruzi demostraron que el nDNA de estos tripanosomas, contiene 12% de secuencias altamente repetitivas, 20% medianamente repetitivas, además de las copias únicas de DNA (Borst y col.,1980b).Trabajos recientes de Castro y col (1981) y Frasch y col (1983) usando tecnología de DNA recombinante,

presentan evidencias que indican que en el T.cruzi, las secuencias repetitivas están organizadas en familias de repeticiones largas distribuidas en todo el genoma del parásito.

Por otro lado, el DNA extracromosomal está localizado en una región especializada de la mitocondria llamada kinetoplasto. El DNA kinetoplástico, kDNA, es uno de los DNA más extraños de la naturaleza. Fue el primer DNA extranuclear descubierto (Bresslau y col.,1924). Consiste en una gran malla de 10000 círculos encadenados, en la que se pueden distinguir 2 componentes, los maxicírculos y los minicírculos (Englund, 1981; Figura 1). El kDNA comprende entre el 5 y el 30% del DNA total dependiendo de las especies (Simpson, 1972; Vickerman y col,1976; Wolstenholme y col,1974).

Los maxicírculos representan entre el 5 y el 10% de la masa del kDNA. El tamaño de los mismos es específico para cada especie y varía entre 5 y 14 μm (13-40 kbp, Tabla 1) son homogéneos y poseen una secuencia rica en A y T (Kleisen y col.,1976; Borst y col.,1979a; Masuda y col., 1979; Borst y col., 1979c; Steinert y col., 1975; Simpson, 1979; Stuart, 1979). Los minicírculos son el mayor componente y determinan el tamaño y la forma de la malla, representan el 90% del kDNA (Englund, 1981; Borst y col., 1979a; Fairlamb y col., 1978; Weislogel y col.,1977). El tamaño de los minicírculos varía entre 0.2 μm en Leishmania y 0.8 μm en Crithidia (Tabla 1). La mayoría de los minicírculos estudiados tienen secuencias heterogéneas (Frasch y col.,1981).Excepcionalmente se han descrito

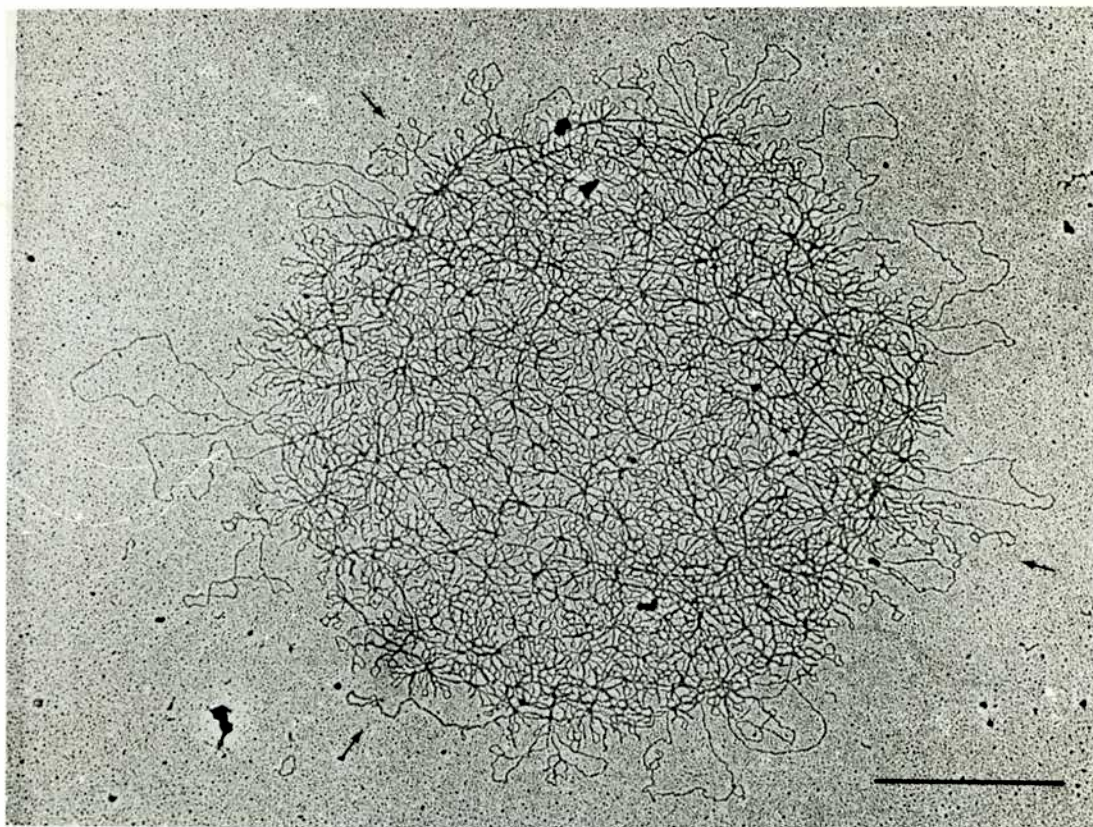


Figura 1. Fotografía de la malla de kDNA al microscopio electrónico. De los bordes de la malla de micróculos se observan maxicículos más extendidos, superenrollados (flechas). La barra es 1 μ m. Tomado de Borst y Hoeijmakers (1979).

aislamientos con minicírculos homogéneos (Frasch y col., 1980).

A partir del análisis de la secuencia del kDNA y de los transcriptos del mismo, se ha llegado a la conclusión que el componente de maxicírculos representa el verdadero DNA mitocondrial. La estructura en forma de malla sería necesaria para el funcionamiento de los maxicírculos y en consecuencia la biogénesis de la mitocondria. Hasta el momento no se le ha asignado ninguna función al minicírculo aunque se han hecho varias especulaciones, entre ellas se propone: a) una función estructural para la malla, que serviría como punto de amarre para los maxicírculos a fin de asegurar su posición a una parte determinada de la mitocondria, b) contribución a la segregación ordenada de las dos mitocondrias hijas durante la división celular y c) una función mecánica en la segregación del complejo mitocondria-flagelo.

4. Formación y toxicidad de los productos de la reducción parcial del oxígeno.

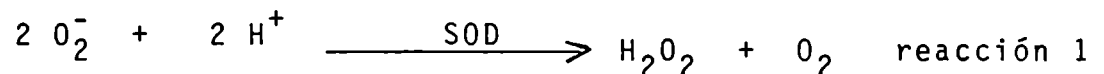
Los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno, el O_2^- y el H_2O_2 , se generan en múltiples sitios subcelulares por transferencia de electrones en sistemas redox enzimáticos unidos a membranas (Tyler, 1975). El agua oxigenada, (H_2O_2) y el anión superóxido (O_2^-), se encuentran en las células normales en concentraciones muy bajas. El nivel de anión superóxido, la especie más reactiva, se mantiene entre 10^{-11} - 10^{-12} M por medio de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

TABLA I. PROPIEDADES DEL kDNA DE ALGUNOS KINETOPLASTIDOS

Organismos	Minicirculo tamaño(µm)	Maxicirculo tamaño (µm)	kDNA densidad(gr/cm ³)	Referencias
<u>Crithidia</u>				
<u>C. acanthocephali</u>	0.8	11	1.702	Fouts y col.(1975)
<u>C. fasciculata</u>	0.8	11	1.702	Steinert y col.(1980)
<u>C. luciliae</u>	0.8	11	1.703	Kleisen y col. (1976)
<u>Leishmania</u>				
<u>L. tarentolae</u>	0.2	10	1.703	Wesley y col. (1973)
<u>Trypanosoma (Schizotrypanum)</u>				
<u>T. cruzi</u>	0.5	12	1.698	Riou y col. (1977)
<u>Trypanosoma (Trypanosoon)</u>				
<u>T. brucei brucei</u>	0.3	6	1.692	Steinert y col. (1980)
<u>T. brucei equiperdum</u>	0.3	6	1.691	Steinert y col. (1980)
<u>T. brucei evansi</u>	0.3	-	1.691	Steinert y col. (1980)

(Tyler, 1975), mientras que el nivel de H_2O_2 , está regulado hasta concentraciones de 3 órdenes de magnitud mayor, 10^{-9} - 10^{-7} M, dependiendo de la producción de H_2O_2 (Mishine y col., 1976).

El anión superóxido se genera en varios sistemas biológicos que reducen al oxígeno molecular. Ellos son: la autooxidación de las hidroquinonas, catecolaminas, tioles, tetrahidropterinas, hemoproteínas y ferredoxinas (Nugteren y col., 1973; Misra y col., 1972; Fridovich, 1974). El O_2^- también se produce por la acción de enzimas oxidativas, xantino-oxidasa y aldehído oxidasa; en organelas subcelulares, mitocondrias y cloroplastos; y en macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (Hemmerich y col., 1970; Matthews y col., 1969; Flohé y col., 1976). La dismutación del anión superóxido se lleva a cabo por la enzima superóxido dismutasa (SOD), esta enzima se encuentra en el citoplasma y también en la matriz mitocondrial. La actividad de la enzima fue descubierta por Mc Cord y Fridovich en 1969. La reacción catalizada por la SOD es la siguiente:



El anión superóxido también puede dismutar en forma no enzimática en una reacción de segundo orden, la reacción tiene un tiempo medio de 7 seg a pH: 9.5 (Klug y col., 1972) cuando la concentración de O_2^- es de 1.5×10^{-7} M. Este tiempo disminuye a 0.5 msec en presencia de 3.5×10^{-7} M de SOD (Klug y col., 1972) debido a la alta constante de velocidad para la reacción: $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Klug y col., 1972; Rotilio

y col., 1972; Rotilio y col., 1974). La SOD está presente en aquellos compartimientos donde se produce anión superóxido. En hígado de rata y de pollo, la mayor actividad de la SOD se encuentra en el citosol, mientras que el 15-20% está asociado a la matriz mitocondrial (Tyler, 1975; Weisiger y col., 1973a; Weisiger y col., 1973b; Panchenko y col., 1975; Peeters-Joris y col., 1975).

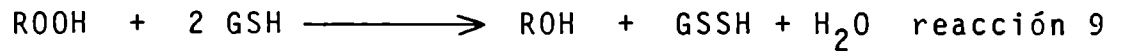
El nivel de H_2O_2 intracelular está regulado por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa. Ambas enzimas tienen una función metabólica importante en el control de la concentración de H_2O_2 a diferentes niveles y lugares dentro de la célula.

La catalasa está presente en todas las células de mamífero (Theorell, 1951). En muchos casos, la enzima está localizada en organelas subcelulares como los peroxisomas, en hígado y riñón, o en microperoxisomas (Nicholls y col., 1963; Brill, 1966; Chance, 1951). En tejidos desprovistos de actividad de catalasa, el H_2O_2 difunde a través de la corriente sanguínea, hasta la catalasa de los eritrocitos, siendo éste el principal mecanismo de eliminación de H_2O_2 .

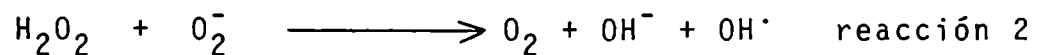
También existen otras peroxidases como la glutatión peroxidasa, citocromo c peroxidasa de levadura y peroxidasa de rábano, que permiten la eliminación de H_2O_2 acoplada a la oxidación de ciertas sustancias.

La glutatión peroxidasa utiliza los hidroperóxidos y los puede metabolizar en el citoplasma y la mitocondria. Esta enzima que fue descubierta en 1960 por Mills, catali-

za la descomposición del H_2O_2 asociada a la oxidación de glutatión reducido (GSH)

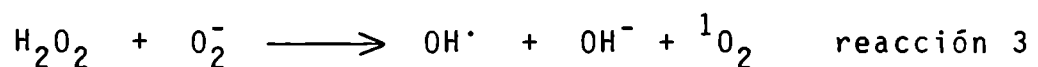


El agua oxigenada que no es degradada por alguna de las enzimas anteriores puede, a través de la reacción de Haber Weiss (Haber y col., 1934; McCord y col., 1978; Halliwell, 1976), generar el radical oxhidrilo ($\text{OH}\cdot$)



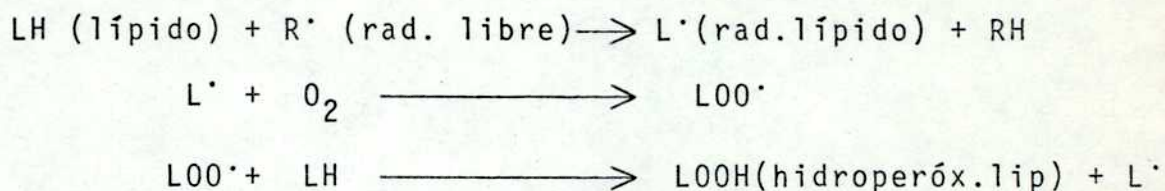
La reacción anterior necesita un metal como catalizador. Se propone la formación de un complejo entre el Fe (III)- O_2^- ó H_2O_2 -Fe(III) en la formación del $\text{OH}\cdot$ (Koppenoe y col., 1977; Ilan y col., 1977). Si se tiene en cuenta la velocidad de producción de O_2^- y de H_2O_2 , la generación de $\text{OH}\cdot$ en el hígado de rata se estima en 10^{-12} - 10^{-9} $\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$. El radical $\text{OH}\cdot$ es muy tóxico y es responsable de la peroxidación lipídica y de lesiones en el DNA (Fridovich, 1974).

También se ha postulado la formación de oxígeno singulete, durante la reacción de Haber Weiss (Haber y col., 1934; Fong y col., 1973)



Este último compuesto, el ${}^1\text{O}_2$, es aún más tóxico que el radical superóxido, y se lo propone junto con el $\text{OH}\cdot$ como iniciador de la peroxidación lipídica (Fong y col., 1973;

Kellog y col., 1975). La abstracción de hidrógeno por un radical libre, lleva a una secuencia autocatalítica, que transforma la molécula lipídica en un radical peróxido.



La peroxidación lipídica trae como consecuencia la desestabilización de la membrana debido a la introducción de funciones hidrofílicas aún luego de la reducción a los hidroxilípidos correspondientes. Por otra parte, el daño provocado por estas reacciones inhibe la actividad enzimática de las proteínas (Tappel, 1973). Todos estos eventos llevan a alteraciones en la permeabilidad de la membrana.

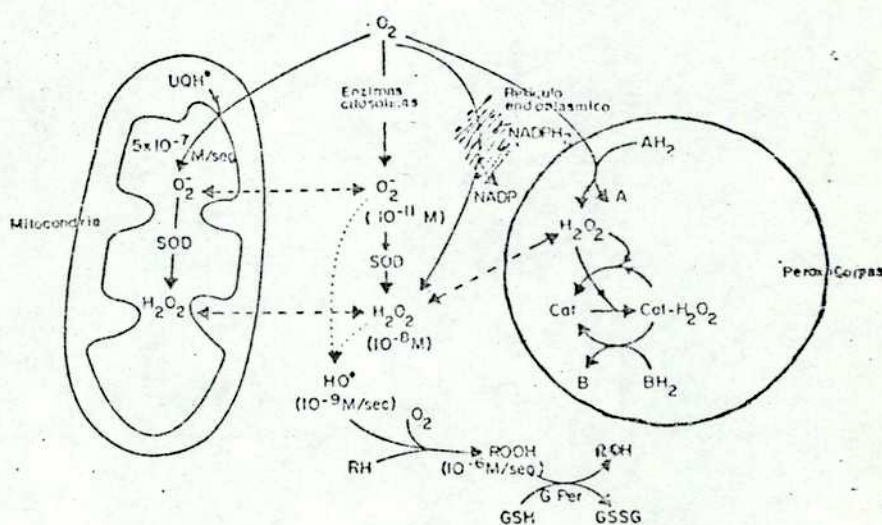


Fig.2. Esquema general de la distribución intracelular y funciones de la catalasa (Cat), glutatión peroxidasa (G Per) y superóxido dismutasa (SOD). Se señalan las concentraciones de los metabolitos en el estado estacionario.

Resumiendo, la célula utiliza diferentes mecanismos de defensa contra los productos tóxicos de la reducción parcial del O_2 . Ellos son: protección contra el aumento de la tensión de O_2 a nivel celular, la localización intracelular de las enzimas adecuadas para la descomposición de los intermediarios tóxicos generados, la presencia de secuestradores fisiológicos de radicales libres como el α tocoferol y el β caroteno; los cuales tienen la ventaja de estar distribuidos en la membrana donde ocurre la peroxidación lipídica y finalmente, la glutatión peroxidasa, que reacciona directamente con los lipoperóxidos.

5. Detoxificación de los productos de la reducción parcial del oxígeno en el *T. cruzi*.

La habilidad de los organismos para prevenir la acción letal de los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno, depende del contenido de superóxido dismutasa, catalasa, y de peroxidasa. En el *T. cruzi*, se genera H_2O_2 por medio de enzimas mitocondriales, microsomales y citosólicas; la producción total de H_2O_2 corresponde al 4% del consumo endógeno de los epimastigotes (Boveris y col., 1977b). Los parásitos contienen superóxido dismutasa, pero no tienen catalasa al igual que los tripanosomas Africanos (Fulton y col., 1956) y tampoco presentan actividad de peroxidasa.

Los resultados obtenidos por Boveris y col., (1980) (Tabla 2), muestran que sólo se detecta actividad de peroxidasa con ascorbato como dador de electrones pero no con pirogalol, guayacol y citocromo c reducido. El cianuro de potasio inhibe la actividad de ascorbato peroxidasa en concentraciones relativamente altas comparada con otras peroxidases típicas. Esta acción peroxidasa es termosensible, se pierde totalmente luego del calentamiento a 100°C durante 5 min o luego de la diálisis de los extractos de epimastigotes.

TABLA II. ENZIMAS METABOLIZADORAS DE H_2O_2 EN EL T. CRUZI

Reacción Enzimática	Sustrato (μ M) e inhibidor (mM)	Actividad (mU/10 ⁸ cél)
Peroxidasa	H_2O_2 (100); ascorbato (50)	7.5 \pm 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 \pm 7 (4)

Datos tomados de Boveris y col., 1980

a. Número de experimentos.

Un proceso alternativo para la utilización metabólica de H_2O_2 , es el sistema de la glutatión peroxidasa (Chance y col., 1979). En hepatocitos de rata, esta enzima es la principal responsable de la descomposición de H_2O_2 generada en el citosol y la mitocondria (Chance y col., 1979). El contenido de glutatión reducido presente en extractos de epimastigotes, es de 4.9 ± 0.7 nmol de GSH/ 10^8 células, este valor es 1/10 del contenido de glutatión hepático en ratas (Tyler, 1975) cuando los resultados se expresan por g de tejido húmedo (Boveris y col., 1980). La actividad de glutatión reductasa, medida en extractos de epimastigotes, se muestra en la Tabla 2. El contenido de esta enzima en T. cruzi es 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 III. GLUTATION REDUCTASA, GLUTATION PEROXIDASA Y OTRAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL T. CRUZI

Reacción enzimática	Oxidante	Actividad (mU/ 10^8 cél.)
Glutatión Reductasa	GSSH	5.3 ± 0.4 (8)
Glutatión Peroxidasa	H_2O_2	0 (8)
	hidroperóxido de tert-butilo	0.4 ± 0.09 (22)
	hidroperóxido de cumeno	0.5 ± 0.3 (6)
NADPH oxidasa	O_2	3.8 ± 0.5 (8)

Tomado de Boveris y col., 1980.

Boveris y col. no pudieron demostrar actividad de glutatión peroxidasa (Tabla 2) usando H_2O_2 como sustrato. Con tert-butil hidroperóxido se pudo medir actividad de glutatión peroxidasa, aunque 1/2500 veces menor que la actividad de la de los hepatocitos. Más aún, la relación tert-butil peróxido/actividad glutatión reductasa en los extractos fue menor que 0.1, esa misma relación en los hepatocitos es de 1.95 (Sies y col., 1979). Esto podría reflejar una reacción no específica, como la catalizada por la glutatión S transferasa B (Burk y col., 1978), donde la oxidación del GSH por los hidroperóxidos ocurre en áreas hidrofóbicas de la proteína.

En homogenatos de T. cruzi, se encontró superóxido dismutasa aunque en concentración 20 veces menor que la de hepatocitos de rata (Tyler, 1975).

De manera que el T. cruzi es un organismo que no está capacitado para detoxificar H_2O_2 ; además de la ausencia de catalasa, no se encuentra actividad de glutatión peroxidasa en extractos de epimastigotes (Boveris y col., 1980). La ascorbato peroxidasa (Sies y col., 1979) parece ser el único mecanismo por el cual el T. cruzi metaboliza el H_2O_2 , sin embargo la inactividad observada con otros sustratos típicos para peroxidasas como el pirogalol, guayacol y citocromo c reducido, hacen dudar del significado fisiológico de la enzima.

6. Diseño de drogas quimioterápicas

Los avances en el campo de la farmacología molecular

han contribuido al diseño de nuevos agentes quimioterápicos, basándose en el mayor conocimiento de los procesos biológicos del huésped y del parásito, y de la relación existente entre ellos. El enfoque racional para el diseño y selección de agentes quimioterápicos, consiste en la detección de mecanismos biológicos o moleculares esenciales para la multiplicación y supervivencia del parásito, que puedan ser afectados por drogas que a la vez resulten inocuas para el huésped. Para ello se preparan compuestos selectivos que penetran e inhiben una reacción específica. Entre las lesiones producidas por las drogas, se incluyen alteraciones en la permeabilidad de las membranas y en un sentido amplio, inhibición de la síntesis de DNA, RNA y proteínas.

La información genética está contenida en las cuatro unidades básicas del DNA, (adenina, timina, guanina y citosina) el cual se sintetiza enzimáticamente por la DNA polimerasa a partir de los cuatro deoxinucleósidos trifosfato y del DNA como templado. La información se transcribe al RNA de cadena simple por medio de la RNA polimerasa-DNA dependiente, que da por resultado el mRNA y se traduce en proteínas celulares. Todos los procesos que llevan a la formación de DNA, RNA y proteínas son regulables, cualquier alteración en el camino biosintético, podría resultar en la formación de componentes macromoleculares sin función, que se traduciría en mutaciones y en la eventual muerte del parásito. La biosíntesis de DNA puede modificarse por productos químicos y por

radiaciones. Así, se puede interferir en la síntesis misma disminuyendo por ejemplo, la disponibilidad de alguno de los nucleósidos trifosfato (inhibición de la timidilato sintetasa por el 5-Fluordeoxiuridina) o modificando directamente el DNA por medio de agentes que se unen covalentemente o se intercalan en la macromolécula formando aductos. La formación de esos aductos, alteran la estructura de doble hélice, previniendo la transcripción al mRNA o produciendo mutaciones.

7. Interacciones físico-químicas entre distintos compuestos químicos y los ácidos nucleicos.

Existen una serie de compuestos de estructura química diferente, algunos de ellos extraídos de microorganismos, que poseen actividad antineoplásica (Cochrane y col., 1975). Estos agentes antitumorales tienen un efecto directo y bien definido sobre los ácidos nucleicos. Interfieren en la síntesis de DNA a través de la intercalación (daunomicina, adriamicina, actinomicina D), remoción de bases (bleomicina) unión covalente y modificaciones en las bases (mitomicina C, ciclofosfamida, cisplatino) y rupturas en una de las cadenas. En varios casos se encontraron paralelismos entre las lesiones causadas por las drogas y las radiaciones, así, las rupturas inducidas por la adriamicina o bleomicina, son semejantes a las lesiones de los rayos X. En forma similar, la mitomicina C produce las mismas lesiones que la luz U.V.

Las propiedades radiomiméticas de los agentes alquilantes sugiere que el DNA es el principal blanco de estas drogas (Elson, 1963). Brookes y Lawley (1960) fueron los primeros en demostrar la acción "in vivo" de una droga alquilante bifuncional en el DNA de células tumorales. Posteriormente, los mismos autores encontraron que el entrecruzamiento en el DNA es debido a la reacción entre el agente alquilante y el N-7 de la guanina en la doble hélice (Brookes y col., 1961; Lawley y col., 1967). La formación de intra o intercruzamientos en el DNA fue confirmado luego por varios autores (Walker, 1971; Kohn y col., 1966). La posición más comunmente modificada, es el N-7 de la guanina del RNA y del DNA y en menor proporción las posiciones 1 y 3 de la adenina, 3 de la citosina y 0-6 de la guanina (Lawley, 1966; Lawley y col., 1970; Loveless, 1969). La ocurrencia y persistencia de la 0-6 metilguanina se correlaciona con la acción carcinogénica de los agentes monofuncionales (Craddock, 1973; Craddock y col., 1974) esta modificación se repara muy lentamente y causa errores en la duplicación del DNA (Gerchman y col., 1973; Lawley y col., 1968). En contraste, la 7-metilguanina es rápidamente escindida y da lugar a un sitio apurínico reparado (Capps y col., 1973; Roberts y col., 1971). Por otro lado, esta base modificada puede aparearse correctamente con la citosina (Wilhelm y col., 1966).

La mitomicina C, aislada del Streptomyces caespitosus (Kirsch y col., 1976), es un inhibidor específico de la síntesis de DNA. En general se reconoce que este antibiótico actúa como un agente alquilante (Schwartz y col., 1963),

además, Iyer y Szybalsky demostraron que la mitomicina C produce entrecruzamientos entre las cadenas complementarias del DNA como resultado de la unión covalente con la macromolécula, luego de la reducción del antibiótico a un derivado hidroquinona (Iyer y col., 1963). Se ha sugerido que la mitomicina C tiene un efecto similar a la radiación U.V., esta hipótesis se basa en que células deficientes en el sistema de reparación, Xeroderma Pigmentosum, muestran gran sensibilidad al antibiótico y a la luz U.V. (Otsuji y col., 1972). Este compuesto se une a la molécula de DNA pero no al RNA de cadena simple, ni al DNA de ϕ X 174 de cadena simple (Kersten y col., 1964; Schwartz y col., 1963), la unión al DNA constituye la base para la inhibición de la DNA polimerasa pero no de la RNA polimerasa.

La bleomicina está comprendida dentro de una familia de antibióticos metaloglicopeptídicos que difieren en la cadena aminoterminal (Umezawa, 1975). Este compuesto inhibe la incorporación de ^3H timidina al DNA en células intactas y causa rupturas en una de las cadenas del DNA (Kohn y col., 1976). La fragmentación de la macromolécula en las células tratadas, se repara cuando las mismas crecen en un medio libre de antibiótico (Byfield y col., 1976; Iqbal y col., 1976). La bleomicina cliva preferencialmente las secuencias GC y GT (Haidle y col., 1972; Takeshita y col., 1978) en una reacción que requiere Fe(II) y O_2 (Burger y col., 1980). Entre los productos de la reacción se incluyen bases libres, oligonucleótidos y varios compuestos que forman cromóforos con el ácido tiobarbitúrico (Sausville y col., 1978). Este

antibiótico inhibe la RNA polimerasa-DNA dependiente y estimula la acción de las DNAsas.

La neocarzinostatina rompe el DNA principalmente en los residuos de timina y en menor grado los residuos de adenina (Hatayama y col., 1978; D'Andrea y col., 1978). Esta especificidad es probablemente debida a la alta afinidad del cromóforo por zonas del DNA ricas en A y T (Kappen y col., 1982). La neocarzinostatina es funcionalmente similar a la bleomicina en que ambas drogas inducen rupturas en el DNA, las que están acompañadas de la liberación de bases libres, principalmente timina (Hatayama y col., 1978; Poon y col., 1977; Ishida y col., 1976). Ambas drogas se activan con O_2 (Goldberg y col., 1981), pero mientras que en la degradación del DNA por bleomicina está involucrada la oxidación del Fe en el complejo Fe(II)-bleomicina (Burger y col., 1979), no hay evidencias de la necesidad de metales de transición en la acción de la neocarzinostatina (Goldberg y col., 1981).

Además de estos antibióticos, existen otros que se intercalan en el DNA como la adriamicina, que también introduce rupturas en una de las cadenas del DNA. Para la adriamicina, una antraciclina quinoide usada en el tratamiento de la leucemia y de tumores sólidos (Bonadonna y col., 1970; Middleman y col., 1971), se sugieren dos mecanismos de toxicidad: intercalación en el DNA (Pigram y col., 1972) y escisión del DNA por los radicales libres que genera la adriamicina (Berlin y col., 1981). El compuesto puede actuar como aceptor de electrones de flavoproteínas microsomales; en presencia de NADPH, la fracción microsomal activa a la adriamicina dando lugar a la formación del radical libre

semiquinona (Berlin y col., 1981; Sinha y col., 1979). Durante este proceso se consume O_2 y se genera anión superóxido (Lown y col., 1977) de acuerdo con el siguiente esquema

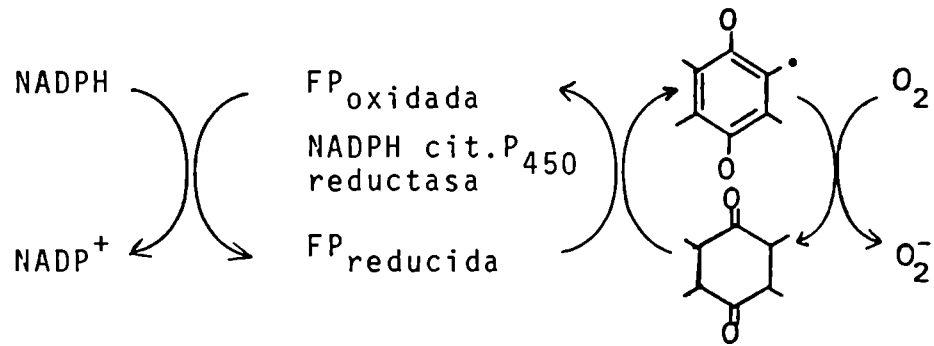


Figura 3: Formación del anión superóxido a partir de la adriamicina.

La intercalación de la adriamicina inhibe la transcripción al RNA y la replicación del DNA (Di Marco, 1968; Goodman y col., 1974; Zunino y col., 1975). Además se producen rupturas en una de las cadenas del DNA como consecuencia de la acción del radical $OH\cdot$. El $OH\cdot$ se forma por la interacción del O_2^- y H_2O_2 según las reacciones 2 y 3. Para esta acción el antibiótico no necesita intercalarse, Berlin y Haseltine (1981) basan esta afirmación en el hecho que el DNA de cadena simple es tan buen sustrato como el de doble cadena. Este efecto no sería el esperado si la intercalación fuera necesaria, en cuyo caso el DNA de doble cadena es mucho mejor sustrato. Es interesante destacar que todos los efectos nocivos sobre el DNA pueden prevenirse con el agregado de SOD y/o catalasa al medio de incubación (Kanter y col., 1979).

8. Agentes quimioterápicos usados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

8.1 Las naftoquinonas como generadores de radicales libres en el T. cruzi.

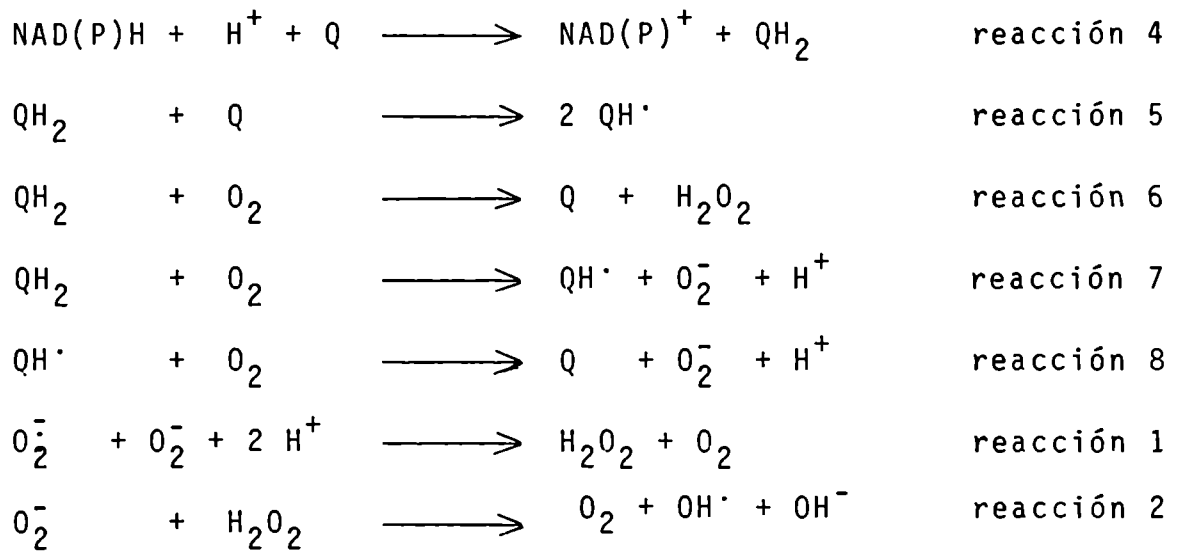
Existen una serie de compuestos químicos que pueden actuar como aceptores de electrones, dando lugar a la formación de productos de la reducción parcial del oxígeno. Incluido en este grupo se encuentran los o y p quinoles, capaces de ser oxidados por el oxígeno molecular, con formación de anión superóxido.

Varios tipos de quinonas existentes en la naturaleza son activas en sistemas biológicos. Si bien las estructuras de estos compuestos son diferentes, la actividad biológica de todos ellos se relaciona a través de propiedades químicas comunes. La base de la función catalítica en el transporte de electrones reside en la estructura responsable de las reacciones de óxido reducción.

La adición de naftoquinonas a diferentes formas de T. cruzi, aumenta la velocidad intracelular de formación O_2^- y H_2O_2 con liberación de los mismos al medio de incubación (Docampo y col., 1978a).

Entre las sustancias que pueden participar en la generación de productos de la reducción parcial del O_2 , se encuentra la β lapachona, una o quinona que se extrae del lapacho junto con el lapachol. La β lapachona produce notables alteraciones estructurales y metabólicas en las distintas formas de T. cruzi (Docampo y col., 1977a; Docampo, 1977b). La adición de esta quinona o sus análogos "in vitro", incrementa la velocidad intracelular de generación de O_2^- y H_2O_2 (Boveris y col., 1978a; Boveris y col., 1978b). Las

reacciones químicas que explican la acción tripanocida de la β lapachona son las siguientes:



La reacción 4, catalizada por la quinona reductasa (Fong y col., 1973; Michaelis, 1951; Zimmerman y col., 1973), tiene lugar en las membranas mitocondriales y en el retículo endoplásmico.

Teniendo en cuenta la distribución de proteínas y la actividad específica de las fracciones subcelulares (Boveris y col., 1978a), las membranas mitocondriales y el NADH son mucho más importantes que el retículo endoplásmico y el NADPH como sistema reductor de la β lapachona. Las formas reducidas de la quinona son enzimáticamente oxidadas por el O_2 obteniéndose H_2O_2 y O_2^- (reacción 6 y 7). Con la β lapachona y las fracciones subcelulares del T. cruzi la reducción de la quinona (reacción 4) es más lenta que la oxidación de la quinona reducida, (reacciones 6-8) quedando la β lapachona en estado predominantemente oxidado (más del 98%) (Boveris y col., 1978a).

La formación de la semiquinona es un proceso muy rápido (reacción 5) (Michaelis, 1951). Las fracciones subcelulares de T. cruzi, producen y liberan O_2^- y H_2O_2 en cantidades similares, lo que implicaría el funcionamiento de las reacciones 6 y 7 (Boveris y col. 1978b). Que el O_2^- y el H_2O_2 se produzcan en cantidades iguales en las fracciones mitocondriales, indica que la autooxidación de la semiquinona (reacción 8) es el paso limitante del grupo de reacciones. La detección del radical libre semiquinona en epimastigotes de T. cruzi tratados con β lapachona, (Docampo y col., 1978a) está de acuerdo con esta afirmación. La dismutación del anión superóxido (reacción 1) lleva a la formación de H_2O_2 , el cual por medio de la reacción de Haber-Weiss (reacción 2) (Haber y col., 1934) genera radical hidroxilo (Haber y col., 1934; Fong y col., 1973; Zimmerman y col., 1973) responsable del daño biológico causado por las radiaciones ionizantes (Fridovich, 1975). El radical hidroxilo, reacciona con cualquier tipo de moléculas, atacando los grupos metilénicos de los ácidos grasos y de los ácidos nucleicos, dando origen a reacciones en cadena. Existen evidencias que el radical OH^{\cdot} actúa iniciando los procesos de peroxidación lipídica (Fong y col., 1973; Kellog y col., 1975; Docampo y col., 1976) y causando rupturas en una de las cadenas del DNA (Misra y col., 1972; Meneghini, 1976).

El esquema de las reacciones mencionadas se encuentra en la Figura 4.

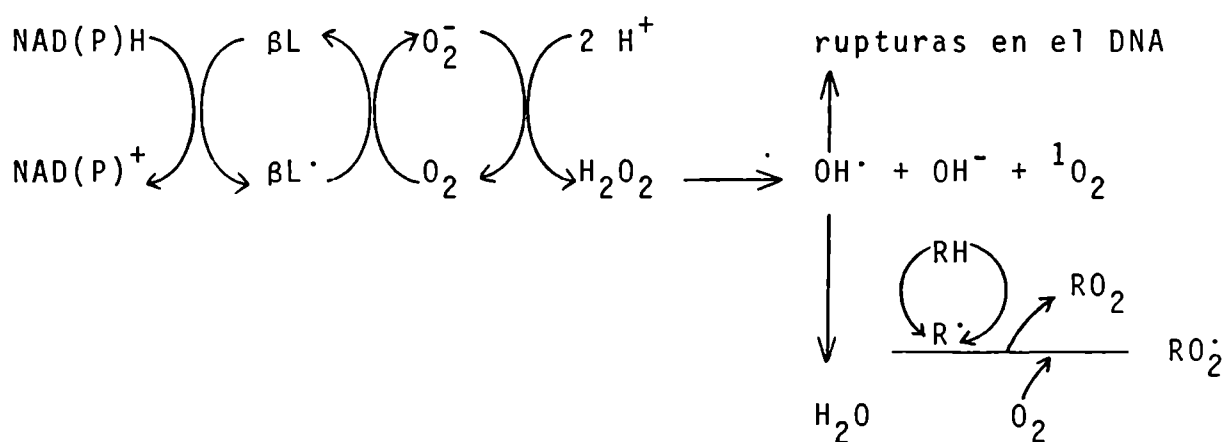


Figura 4. Mecanismos de toxicidad de la β lapachona

8.2 NITRODERIVADOS

8.2.1. Generalidades

Las drogas nitroheterocíclicas entre las que se incluyen los nitrofuranos y los nitroimidazoles, cobran día a día más importancia, sobre todo los nitroimidazoles debido a su uso como agentes antimicrobianos y radiosensibilizantes de tumores hipóxicos.

A pesar de la gran cantidad de nitroderivados que aparecen en la literatura, el mecanismo de acción de los mismos, hasta el momento, no está claramente dilucidado. La base para la acción de estas drogas reside en la habilidad de las células para reducirlos, a través del grupo nitró, a metabolitos no totalmente identificados y que son más tóxicos que el compuesto original (Talley y col., 1978; Lindmark y col., 1976; Coombs, 1976). La eficiencia clínica y la selectividad de estas drogas como agentes antimicro-

bianos es específica para los anaeróbios (Edwards y col., 1970) debido a que estos microorganismos tienen potencial de reducción suficiente como para reducir el grupo nitro dando lugar a la formación de productos responsables de lesiones en el DNA (Edwards y col., 1973).

El mecanismo de radiosensibilización y de citotoxicidad de las drogas es diferente. Si bien la reducción del grupo nitro es un prerrequisito para ambos efectos, la citotoxicidad en anaeróbios ocurre por mecanismos de reducción enzimática y es relativamente lento (Edwards y col., 1970; Edwards y col., 1973), mientras que la radiosensibilización ocurre por radicales libres y es más rápida (Mason y col., 1975; Pérez-Reyes y col., 1979).

Como consecuencia de estos efectos, las drogas disminuyen la viscosidad, la renaturalización térmica, y el valor de T_m del DNA ; y aumentan el contenido de rupturas en una de las cadenas del DNA (Knight y col., 1979; Knight y col., 1978). La lesión en el DNA sería la acción primaria que resultaría en la pérdida de la estructura de hélice con la concomitante disminución del peso molecular.

La efectividad de metronidazol (5-nitroimidazol) en el tratamiento de la tricomoniasis humana causada por la Trichomonas vaginalis (Cosar y col., 1959), provocó una intensa búsqueda de otros agentes antitricomonas de actividad superior al metronidazol mismo (timidazol, ornidazol, dimetridazol) (Knight y col., 1979) y de nitroderivados de espectro de acción mayor, lo que produjo com-

puestos con aplicaciones terapéuticas como radiosensibilizantes (misonidazol, 2-nitroimidazol) (Knight y col., 1979) o como agentes quimioterapéuticos (benznidazol) (Polak y col., 1978).

Los nitrofuranos son tóxicos para una variedad de organismos eucariotas y bacterias, y en algunas situaciones son útiles con fines profilácticos o terapéuticos. La nitrofurazona y la furazolidina se usan como agentes anticoccideos en la comida de las aves (Anon, 1976). El SQ 18506 y el nifurtimox se usan en la terapia de la enfermedad de Chagas (Sims y col., 1978). Gutteridge estudió el SQ 18506 y concluyó que el sitio de acción más importante de ese compuesto en el T. cruzi, es el DNA, y que las lesiones al DNA provocarían inhibición de la síntesis de macromoléculas (Sims y col., 1978).

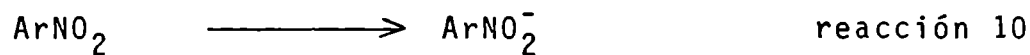
Desafortunadamente, la eficacia de los nitrofuranos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas se reduce a la supresión de las formas circulantes, rara vez se produce la completa eliminación del parásito. Más aún, las concentraciones a las cuales se suministra la droga, producen efectos colaterales no tolerables para muchos pacientes.

8.2.2 Los nitroderivados como generadores de productos de la reducción parcial del oxígeno.

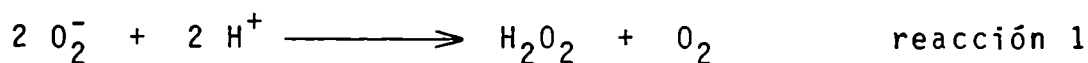
La toxicidad de los nitroderivados se atribuye a la metabolización del compuesto a especies químicas muy reactivas (Biaglow y col., 1976), que producen alteraciones de las macromoléculas y/o peroxidación lipídica, que pueden llevar a

la necrosis celular (Wang y col., 1977; Docampo y col., 1981a). Estos compuestos son reducidos "in vitro" por enzimas solubles como la aldehído oxidasa (Wolpert y col., 1973), la xantino-oxidasa (Thayer, 1977) o por enzimas microsomales que contienen flavina como la citocromo c reductasa (Wang y col., 1974). La reducción de los grupos nitro es esencial para activar la droga (Peterson y col., 1979), ya sea a la forma hidroxilamina (Mason y col., 1975) o a un derivado del radical aniónico. Por analogía con las aminas aromáticas, donde la oxidación y conversión al derivado N hidroxilado constituye un importante paso en la activación (Akao y col., 1971), se sugirió que la hidroxilamina formada por la reducción del nitroderivado; sería el mutágeno. Sin embargo, el mismo no ha sido aislado hasta el momento, y el producto final de la reducción, el aminofurano no tiene actividad biológica.

Los trabajos recientes de Mason (1975) y Docampo (1981b), han centralizado su atención en los nitroderivados aniónicos formados por la adición de un electrón a los nitrocompuestos, un proceso catalizado por una serie de flavoproteínas. Por medio de Resonancia de Spin Electrónico, E.S.R., se ha demostrado que la concentración de los radicales libres en el estado estacionario puede llegar a micromolar en condiciones de anoxia. En presencia de oxígeno, el nitroradical aniónico rápidamente se reoxida al compuesto original (reacción 11)



Al mismo tiempo el oxígeno se reduce a O_2^- . El anión superóxido se convierte en agua oxigenada espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa.



Una de las drogas más frecuentemente empleadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, es el nifurtimox. Este compuesto es un nitrofurano cuya fórmula está representada en la Figura 5. Concentraciones farmacológicas de nifurtimox, son capaces de producir una máxima estimulación de O_2^- por las fracciones mitocondriales, microsomales y por homogenatos de T. cruzi (Docampo y col., 1981b); Moreno y col., 1982), promoviendo la difusión de H_2O_2 fuera de la célula. El siguiente esquema ha sido propuesto como mecanismo de toxicidad del nifurtimox en el T. cruzi.

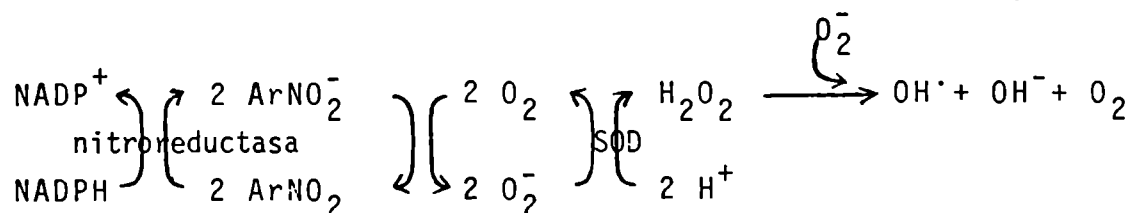
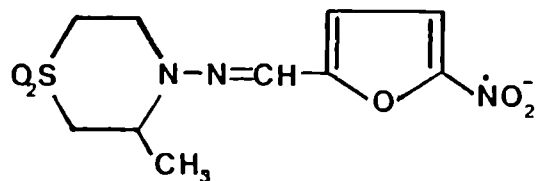
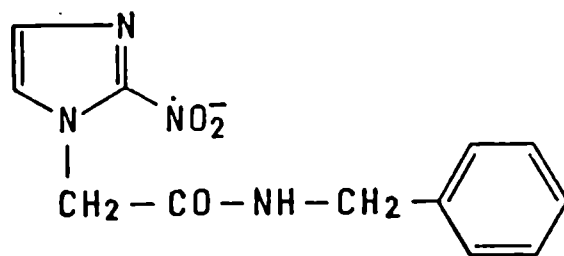


Figura 6. Mecanismo de toxicidad del nifurtimox en el T. cruzi.



NIFURTIMOX



BENZNIDAZOL

Figura 5. Estructura química del nifurtimox y el benznidazol

El radical OH^\cdot generado a partir de H_2O_2 y Fe (III) (reacción de Haber-Weiss) (Haber y col., 1934), actúa como iniciador de los procesos de peroxidación lipídica. La estimulación de la lipoperoxidación por el nifurtimox, es inhibida en presencia de agentes secuestrantes de radicales libres OH^\cdot , como el manitol (Docampo y col., 1981b), lo que demuestra que los derivados de la reducción parcial del O_2 están involucrados en este proceso estimulado por el nitrofurano.

El benznidazol, un 5-nitroimidazol, (Figura 5), es junto con el nifurtimox, la droga de elección en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Este compuesto tiene un mecanismo similar al nitrofurano para la generación de productos de la reducción parcial del oxígeno por microsomas de hígado de rata. La reacción del benznidazol con el oxígeno bloquea la reducción posterior del grupo nitro, de ese modo se inhibe la formación de intermediarios que se unirían al DNA, como se ha descrito para otros nitroimidazoles (Knight y col., 1979). La toxicidad selectiva del benznidazol en el T. cruzi (Moreno y col., 1982) puede explicarse a través de la reacción de detoxificación entre el oxígeno y su radical aniónico. La reducción por cesión de un electrón, ocurre solamente en los tejidos de mamífero, donde 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 el radical se reduzca a otros derivados de estado de oxidación intermedios entre nitro y amina, los que aparentemente son responsables de efectos mutagénicos (Akao y col., 1971) y rupturas del DNA (Tu y col., 1975; Olive y col., 1977).

La presente investigación se llevó a cabo con el objeto de determinar: a) la acción del nifurtimox y el benznidazol, los dos nitroderivados usados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, sobre los ácidos nucleicos del T. cruzi, correlacionando los resultados obtenidos con la generación o no de productos de la reducción parcial del oxígeno, producidos durante la metabolización de los nitroderivados en el parásito; b) analizar las lesiones producidas por los compuestos en el DNA nuclear y kinetoplástico del T. cruzi; y c) estudiar el efecto del nifurtimox, benznidazol y otras drogas tripanocidas, sobre la biosíntesis de macromoléculas y el crecimiento del tripanosoma.

MATERIAL Y
METODOS

1. Cultivo y mantenimiento de T. cruzi

Los epimastigotes, cepa Tulahuén 0, se cultivaron en medio líquido de Warren, a 28°C, modificado por el uso de suero bovino al 4% en lugar del 10% (Warren, 1960).

2. Fraccionamiento subcelular

2.1 Fracción microsomal de T. cruzi

Los epimastigotes se recogieron por centrifugación a 3000 g durante 10 min a 4°C y se lavaron con NaCl 0.15 M. Las células se mezclaron con perlas de vidrio (de 150-200 μ de diámetro) en la proporción 5.0 g por g de células (peso húmedo) y luego se rompieron en un mortero durante 5 min a 4°C. La mezcla 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. La fracción microsomal se sedimentó a 105000 g durante 60 min.

2.2 Fracción microsomal de hígado de rata

El hígado se suspendió en buffer TRIS-HCl, 50 mM, KCl, 150 mM, pH: 7.4. La desintegración celular se llevó a cabo en un homogeneizador tipo Potter con vástago de teflón. Los homogenatos fueron sometidos a centrifugación diferencial a 4°C. Los núcleos y restos celulares se precipitaron a 680 g durante 10 min. El sobrenadante se centrifugó a 12000 g durante 30 min para separar la fracción mitocondrial, y el sobrenadante resultante se centrifugó a 105000 g durante 60 min, para separar la fracción microsomal. Esta última fracción luego se lavó con KCl 0.15 M

y se centrifugó nuevamente a 105000 g durante 60 min. La fracción microsomal se guardó a -70°C y se usó dentro de los tres días de preparada.

3. Preparación del DNA de *T. cruzi* marcado con ^3H timidina

Cultivos de *T. cruzi*, cepa Tulahuén 0, de un día de crecimiento fueron incubados en presencia de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H timidina. Al tercer o cuarto día de crecimiento se recogieron los parásitos por centrifugación (5000 rpm durante 10 min), se lavaron 2 veces con medio fresco y se resuspendieron en medio nuevo a una concentración de 10^6 cél/500 μl . Los parásitos marcados con ^3H timidina se trataron con nifurtimox, benznidazol, y β lapachona a las concentraciones y tiempos indicados. Una vez finalizada la incubación, se recogieron los epimastigotes por centrifugación (5 min a 3500 rpm). Se separaron el nDNA y el kDNA.

4. Aislamiento y purificación del n y kDNA del *T. cruzi*

Los tripanosomas se resuspendieron en TRIS-HCl, 10 mM; NaCl, 100 mM; EDTA, 100 mM pH: 7.8 (0.1 g peso seco/ml). Se lisaron con SDS 1% concentración final, agitando suavemente (Borst y col., 1980). Se agregó 1 mg/ml de pronasa. La suspensión se incubó 30 min a 37°C . Luego se hicieron 4-5 extracciones con igual volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50:49:1) hasta desaparición de la interfase. La malla de kDNA se separó del nDNA por centrifugación a 16000 g durante 30 min a 4°C . El sobrenadante de nDNA y el precipitado de kDNA resuspendido en TRIS-HCl,

10 mM; EDTA, 0.1 mM pH: 7.5, se digirieron nuevamente con SDS 1% y pronasa 0.5 mg/ml a 37°C durante 30 min. Luego las suspensiones se extrajeron con igual volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50:49:1) hasta desaparición de la interfase. Ambos DNAs se precipitaron, llevando las soluciones a 0.3 M en AcONa y agregando 2,5 volúmenes de EtOH absoluto a 0°C.

5. Incorporación de precursores radiactivos a macromoléculas

Al cabo del cuarto día de cultivo, fase exponencial, los epimastigotes se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en medio fresco para dar una concentración de 10^6 parásitos/ml. En los experimentos de incorporación de ^3H leucina, se usó Krebs-Ringer como medio de cultivo. A alícuotas de esta suspensión, se les agregaron nifurtimox, benznidazol, α y β lapachona, tingenona o miconidina preparados en el momento, y los precursores radiactivos, ^3H timidina, ^3H uridina o L ^3H leucina (2 $\mu\text{Ci/ml}$); y se incubaron a 37°C con agitación. A distintos tiempos, se tomaron alícuotas de 1 ml y se filtraron en seguida sobre filtros de nitrocelulosa de 0.45 μm . Las muestras en las que se midió la radiactividad incorporada a proteínas, se calentaron 10 min a 100°C para descargar el tRNA, antes de filtrarlas. Las muestras utilizadas para la medición de la incorporación de precursor radiactivo a las macromoléculas, se lavaron sobre el filtro con 10 ml de NaCl, 9% frío, 2 veces, luego con 10 ml de TCA 10% frío, y finalmente con igual volumen de TCA 5% frío.

Las muestras utilizadas para la medición de incorporación total del precursor al parásito, se lavaron con 10 ml de NaCl 9% frío, repitiéndose el lavado 4 veces. En los dos casos los filtros se secaron y se determinó la radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido Nuclear Chicago. La mezcla de centelleo contenía PPO, 2.5 g; POPOP, 0.05 g en un litro de tolueno. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Los valores son el promedio de 3 experimentos.

6. Determinación de MDA por el método del TBA

La mezcla de incubación contenía: 0.2 ml de homogenato de hígado de rata; MgCl, 250 μ M; un sistema generador de NADPH compuesto por: NADP, 500 μ M; Glucosa 6-P, 5 mM y 3.5 U de Glucosa 6-P deshidrogenasa; 100 μ l de DNA de timo de ternera (5 mg/ml en PBS), nifurtimox o benznidazol; en un volumen final de 2.5 ml en buffer TRIS-HCl, 50 mM; KCl, 150 mM pH: 7.4. Los tubos se incubaron a 37°C con vigorosa agitación para asegurar la aereación. A los intervalos indicados se tomaron alícuotas de la mezcla de incubación y se paró la reacción en baño de hielo. A 1 ml de cada muestra se le agregó igual volumen de TCA 10% y se centrifugó a 3000 rpm 5 min. En el sobrenadante se determinó GSH por el Método de Ellman (1959) modificado por Sedlack y Lindsay (1968). No se observaron diferencias en el contenido de GSH medido enzimáticamente o con el reactivo de Ellman. El MDA proveniente de la peroxidación

lipídica o de la degradación del DNA, se midió por el método del ácido 2-tiobarbitúrico, TBA, propuesto por Placer y col., (1966) y Gutteridge (1979). El desarrollo del color se llevó a cabo agregando a 1 ml de la mezcla de incubación (en frío, sin TCA) 1 ml de TBA 1%, 1 ml de HCl 25% V/V y calentando a 100°C durante 15 min. Se midió la absorbancia a 532 nm. El MDA correspondiente a la degradación del DNA se obtuvo por diferencia entre el MDA total y el presente en una mezcla de incubación sin DNA.

7. Análisis de las lesiones causadas por nifurtimox y benznidazol en el DNA "in vitro".

Para la detección de la degradación del DNA, se usó DNA del plásmido pBR 325 (Bolívar, 1978) de doble cadena, super-enrollado. Se colocaron 25 μ l equivalente a 0.5 μ g de DNA en una bolsa de diálisis, la cual se depositó dentro de un tubo de vidrio conteniendo la siguiente mezcla de incubación: microsomas de hígado de rata o de T. cruzi, 2 mg/ml; glucosa 6-fosfato, 5 mM; glucosa 6-P-deshidrogenasa, 7.5 U; NADP, 5 mM; MgCl₂, 250 μ M; buffer TRIS-HCl, 50 mM; KCl, 150 mM pH: 7.4, hasta completar 5 ml, y las drogas nifurtimox, 10 μ M o benznidazol, 40 μ M preparadas en DMSO-EtOH (50:50) en el momento de la incubación. Luego de la reacción (1 hora a 37°C) las muestras se analizaron en geles horizontales de agarosa 1.1%. El buffer de electroforesis fue TRIS-Borato 90 mM, EDTA 2.5 mM pH: 8.3, con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio para visualizar las bandas. Los geles se fotografiaron por transiluminación con luz U.V. con filtro color naranja (Kodak Pantomic-X). La concentración de proteínas en los microsomas

se midió por el método de Biuret.

8. Análisis de las lesiones en el DNA del T. cruzi

8.1 Análisis de las rupturas en el nDNA

Las rupturas en el nDNA del T.cruzi se analizaron por medio de gradientes alcalinos de sacarosa. Una muestra de 100 μ l (10000 cpm) se sembró sobre un gradiente lineal de sacarosa de 5-20% (P/V) en SDS, 0.1%; NaOH, 0.1 N; NaCl, 0.9 M; EDTA, 0.001%; pH: 12.4. Luego de 90 min a temperatura ambiente, los gradientes se centrifugaron a 36000 rpm durante 3,5 horas en un rotor SW 65 a 20°C. Se recogieron 24 fracciones desde el fondo del tubo por medio de una bomba peristáltica. Las muestras se precipitaron sobre discos de papel Whatman 3 MM mojados con TCA 5%. Una vez secos se midió la radiactividad contenida en los mismos.

8.2 Cálculo del número de rupturas

El coeficiente de sedimentación, S_i , de cada fracción del gradiente se determinó a partir de la ecuación:

$$S_i = \frac{\beta d_i}{\omega^2 T}$$

donde d_i es la distancia en cm entre la fracción i y la primera fracción, ω es la velocidad angular en rpm, T es el tiempo de sedimentación en horas, β es una constante hallada calibrando los gradientes con el DNA de T_7 ($S = 37.2$) (Studier, 1965). El peso molecular, M_i , de cada fracción se calculó como (Studier, 1965):

$$S = 0.0528 M_i^{0.40}$$

El peso molecular promedio, M_n del DNA control y del tratado se calculó con la ecuación:

$$M_n = \frac{\sum f_i}{\sum f_i / M_i}$$

donde f_i es la fracción de la radiactividad total en la fracción i .

Finalmente se calculó el número de roturas, N , a partir de la siguiente ecuación:

$$N = \frac{M_n \text{ DNA control}}{M_n \text{ DNA fragmentado}} - 1$$

El número de rupturas se refirió a 10^6 nucleótidos.

8.3 Análisis de las rupturas en el kDNA

Las rupturas en el kDNA se determinaron por dos métodos: un ensayo con filtros de nitrocelulosa y en geles alcalinos de agarosa.

El análisis de las rupturas por medio del ensayo con filtros de nitrocelulosa, fue descrito por Center (1970) y modificado por Kuhnlein (1979). A alícuotas conteniendo 50 μ l de kDNA tratado con las drogas tripanocidas, se le agregaron 150 μ l de solución conteniendo SDS, 0.01%; EDTA, 2.5 mM; pH: 7.0. Luego se desnaturalizaron con 200 μ l de KH_2PO_4 , 0.3 M; KOH pH: 12.8 y se neutralizaron con 200 μ l de NaCl, 5 M y 5 ml de buffer A (NaCl, 1 M; TRIS-HCl, 50 mM; pH: 8.0).

Las soluciones se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa mojados en el mismo buffer A. Los tubos se enjuagaron con 2 ml de buffer A. Los filtros se lavaron con 2 ml de

buffer A y 5 ml de 2 x SSC. Una vez secos se midió la radiactividad contenida en los mismos en un contador de centelleo líquido como se describió anteriormente. En cada muestra además se determinó la radiactividad total. Los resultados se expresaron como el porcentaje de DNA retenido, en cada muestra, con respecto a la radiactividad total de la misma.

8.4 Electroforesis en geles alcalinos de agarosa

El análisis de los kDNAs extraídos de tripanosomas tratados con nifurtimox, benznidazol o βlapachona, también se realizó en geles alcalinos de agarosa. Se usaron geles horizontales de agarosa al 2%. La agarosa utilizada fue de baja electroendosmosis. El buffer de electroforesis fue: NaOH, 30 mM; EDTA 2 mM (McDonnell y col., 1977).

Se sembraron 0.5 µg de DNA/slot aproximadamente. A cada muestra se le agregó Ficoll, 30%; Orange G, 0.25%, 1:10, antes de sembrar. El Orange G migra con el frente haciéndolo visible. Una vez finalizada la electroforesis, 6 horas a 200 mA (10 cm) el gel se cortó en 20 fracciones iguales en las que se determinó la radiactividad.

9. Inducción de "síntesis no programada de DNA"

9.1 Efecto de inhibidores de la síntesis de DNA

Cultivos de T. cruzi en la fase exponencial (10^6 células/ml) se trataron con hidroxiaurea, fluorodeoxiuridina, cafeína o cicloheximida en distintas concentraciones y tiempos. Luego de la incubación, se añadió ^3H timidina (5 µCi/ml) y se continuó la incubación 2 horas más a 37°C. Se determinó la

radiactividad incorporada al DNA pasando las muestras a través de filtros de Millipore de nitrocelulosa de 0.45 μm de poro. Los filtros se lavaron con 10 ml de NaCl 9% P/V frío, dos veces, luego con 10 ml de TCA 10% frío y finalmente con igual volumen de TCA 5% frío. Los filtros se secaron y se midió la radiactividad. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Los resultados son el promedio de tres determinaciones independientes.

9.2 Inducción de "síntesis no programada de DNA" en el T. cruzi

Para medir "síntesis no programada de DNA" en el T. cruzi, se inhibió la síntesis semiconservativa de DNA en el parásito con hidroxurea, 10 mM y cicloheximida, 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 16 horas. Luego de la incubación se tomaron alícuotas (10^6 cél/500 μl) a las que se agregó ^3H timidina (5 $\mu\text{Ci/ml}$) y nifurtimox, benznidazol o β lapachona preparadas en DMSO-EtOH (50:50) en el momento. Las muestras se incubaron 5 horas a 37°C con agitación para permitir la reacción con el DNA y la incorporación de ^3H timidina. La radiactividad incorporada se determinó como antes.

Reactivos

NADP, glucosa 6-fosfato, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, glutatión (forma oxidada y reducida), ácido 2-tiobarbitúrico, perlas de vidrio, SDS, TRIS, agarosa (tipo I, baja electroendosmosis), bromuro de etidio, proteinasa K (tipo XI), DNA de timo de ternera (tipo I), cicloheximida, fluordeoxiuridina e hidroxurea, fueron obtenidos de Sigma

Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA. El manitol fue de Merck, A.G. El nifurtimox fue de Bayer por cortesía del Dr. A. Haberkorn. El benznidazol fue cedido por Hoffman-La Roche y Co., Basilea, Suiza. La α y β lapachona fueron provistas por el Dr. S. Albónico, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. La miconidina y tingenona fueron aisladas por el Dr. Marini-Bettolo de la Universidad de Turín, Italia.

La ^3H timidina (25 Ci/mmol; 1 mCi/ml); ^3H uridina (40 Ci/mmol, 1 mCi/ml) y la L ^3H leucina (68 Ci/mmol, 1 mCi/ml) se obtuvieron de Radiochemical Centre, Amersham, U.K.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

RESULTADOS

1. Análisis de las rupturas inducidas por el nifurtimox y benznidazol en el DNA "in vitro"

La generación de O_2^- y H_2O_2 durante la autooxidación del nifurtimox y benznidazol previamente metabolizados por la fracción microsomal de hígado de rata, sugirió la posibilidad que el DNA se degrade en este proceso. Para detectar las rupturas en las cadenas se usó el DNA del plásmido p BR 325 covalentemente cerrado y superenrollado (forma I). El DNA forma I se relaja cuando se introducen rupturas en una de las cadenas (forma II) o en las dos cadenas (forma lineal L) cambiando en consecuencia, la movilidad electroforética. Se estudió el efecto del tratamiento del nifurtimox y benznidazol sobre el DNA del pBR 325 metabolizado por la fracción microsomal de a) hígado de rata y b) del T. cruzi. Para prevenir la degradación inespecífica de las nucleasas, el DNA se separó de la mezcla de incubación, por medio de una bolsa de diálisis. En la Figura 7, se observa que ambas drogas tripanocidas incrementaron la forma L del DNA del pBR 325 (líneas B y C). A pesar que el benznidazol no genera productos de la reducción parcial del oxígeno cuando es metabolizado por microsomas de T. cruzi, también se observaron rupturas en el DNA del pBR 325 (línea E). Este hecho estaría de acuerdo con la formación de un metabolito reducido de estado de oxidación intermedio entre el nitro y la amina que causa rupturas en una de las cadenas del DNA. El nifurtimox reducido por la fracción microsomal del T. cruzi, también produjo lesiones en el DNA del pBR 325, que se tradujeron en

un aumento de la forma L (Figura 7, línea D). La omisión del sistema generador de NADPH previno la ruptura del DNA, mostrando la necesidad de la reducción del nifurtimox y benznidazol por la fracción microsomal de hígado de rata (Figura 8, líneas B y C) o la fracción microsomal de T. cruzi (Figura 8, líneas D y E).



Fig. 7. Electroforesis en gel de agarosa del DNA de pBR 325. Las bandas corresponden a las siguientes conformaciones: I, superenrollado, covalentemente cerrado; II, duplex con 1 corte; L, forma lineal. Muestras A, control; B y C tratados con nifurtimox 10 μ M y benznidazol 38 μ M respectivamente, metabolizados por la fracción microsomal de hígado de rata y un sistema generador de NADPH; D y E tratados con nifurtimox 10 μ M y benznidazol 38 μ M respectivamente, metabolizados por la fracción microsomal de T. cruzi y un sistema generador de NADPH. Las condiciones de incubación se describen en Material y Métodos.

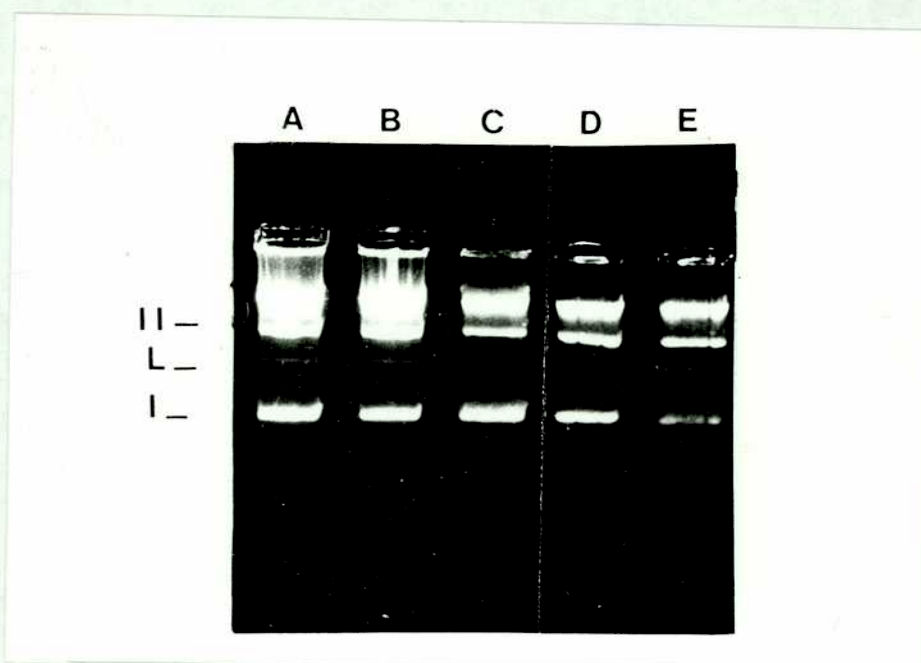


Fig. 8. Electroforesis en gel de agarosa del DNA de pBR 325. Las bandas corresponden a las siguientes conformaciones: I, superenrollado, covalentemente cerrado; II, duplex con un corte; L, forma lineal. Muestras A, control; B y C tratados con nifurtimox 10 μM y benznidazol 38 μM respectivamente, metabolizados por la fracción microsomal de hígado de rata sin NADPH; D y E, tratados con nifurtimox 10 μM y benznidazol 38 μM respectivamente, metabolizados por la fracción microsomal de *T. cruzi*, sin NADPH. Las condiciones de incubación se describen en Materiales y Métodos.

2. Relación entre las rupturas en el DNA, peroxidación lipídica y contenido hepático de glutatión reducido.

El aducto coloreado característico del malondialdehído MDA, se forma a partir de los productos de la degradación del DNA (Burger y col., 1979a) y de la peroxidación de ácidos grasos (Waravdekar, 1959) sometidos a radiaciones ionizantes o soluciones aeróbicas de Fe(II). Se usó la generación de MDA para medir la producción de rupturas en el DNA y en los lípidos causadas por los radicales provenientes de la metabolización del nifurtimox y benznidazol por homogenatos de hígado de rata. Se relacionó el daño en el DNA y la peroxidación lipídica con el contenido hepático de glutatión reducido; GSH.

El aducto TBA-MDA formado a partir del DNA luego del agregado del nifurtimox o benznidazol, aumentó con el tiempo de incubación, llegándose al máximo luego de los 30 min. (Figura 9). La Figura 10 muestra que la formación del complejo TBA-MDA fue dependiente de la concentración de nifurtimox y de benznidazol en el medio de incubación. Con el nitroimidazol el efecto fue de menor magnitud y sólo se observó con la mayor concentración.

Se ha establecido que durante la autoxidación de los radicales aniónicos del nifurtimox y benznidazol, se generan secuencialmente O_2^- y H_2O_2 . La interacción entre el O_2^- y H_2O_2 en presencia de iones metálicos, produce OH^\cdot . Se estudió cuál o cuáles de los productos de la reducción parcial del oxígeno están implicados en la producción de lesiones en el DNA, observado como el aumento de MDA. Para ello se usó superóxido

dismutasa, catalasa y secuestrantes de radicales libres OH^\cdot , para suprimir los efectos de O_2^- , H_2O_2 y OH^\cdot respectivamente. La degradación del DNA se inhibió en presencia de SOD o catalasa, sugiriendo que ambos productos de la reducción parcial del oxígeno están involucrados en las lesiones (Tabla 4). El requerimiento de H_2O_2 para la degradación del DNA, sugirió la posibilidad que el OH^\cdot sea la especie activa. En efecto, el manitol y el benzoato, dos secuestrantes de radical OH^\cdot , previnieron las rupturas del DNA en un 70 y 79% respectivamente. (Tabla 4).

TABLA IV. EFECTO DE INHIBIDORES DE LOS PRODUCTOS DE LA REDUCCION PARCIAL DEL OXIGENO SOBRE LA GENERACION DE MDA PROVENIENTE DEL DNA DE TIMO DE TERNERA.

	A_{532}	% inhibición
Control	$276 \pm 18^*$	
Superóxido dismutasa (150 U)	0	100
Catalasa 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 ± 0.6	97
Manitol (150 mM)	83 ± 8	70
Benzoato (150 μM)	57 ± 7	79

Todas las muestras contenían nifurtimox 500 μM y el inhibidor indicado.

*Los resultados son el promedio de 6 experimentos realizados por duplicado.

Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

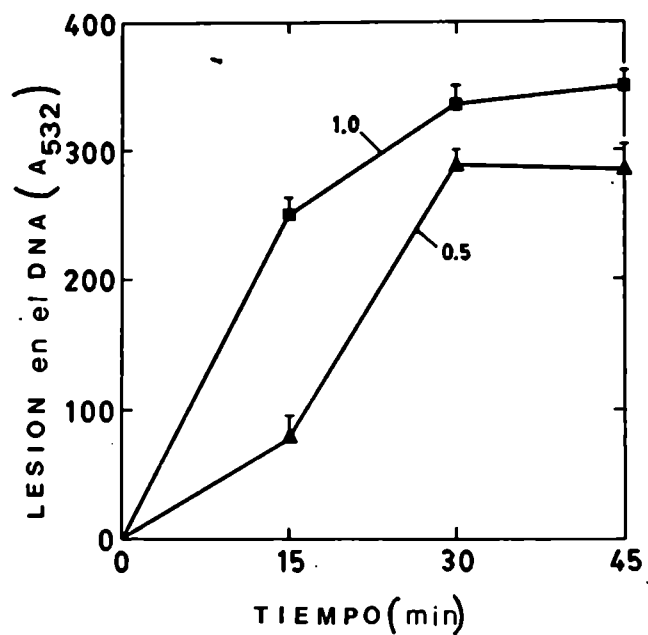


Fig. 9. Formación del aducto TBA-MDA inducida por nifurtimox 0.5 y 1.0 mM. La mezcla de incubación contenía: homogenato de hígado de rata 500 μ l; sistema generador de NADPH; DNA de timo de ternera, 500 μ g; nifurtimox. La concentración de MDA se determinó como se describió en Materiales y Métodos.

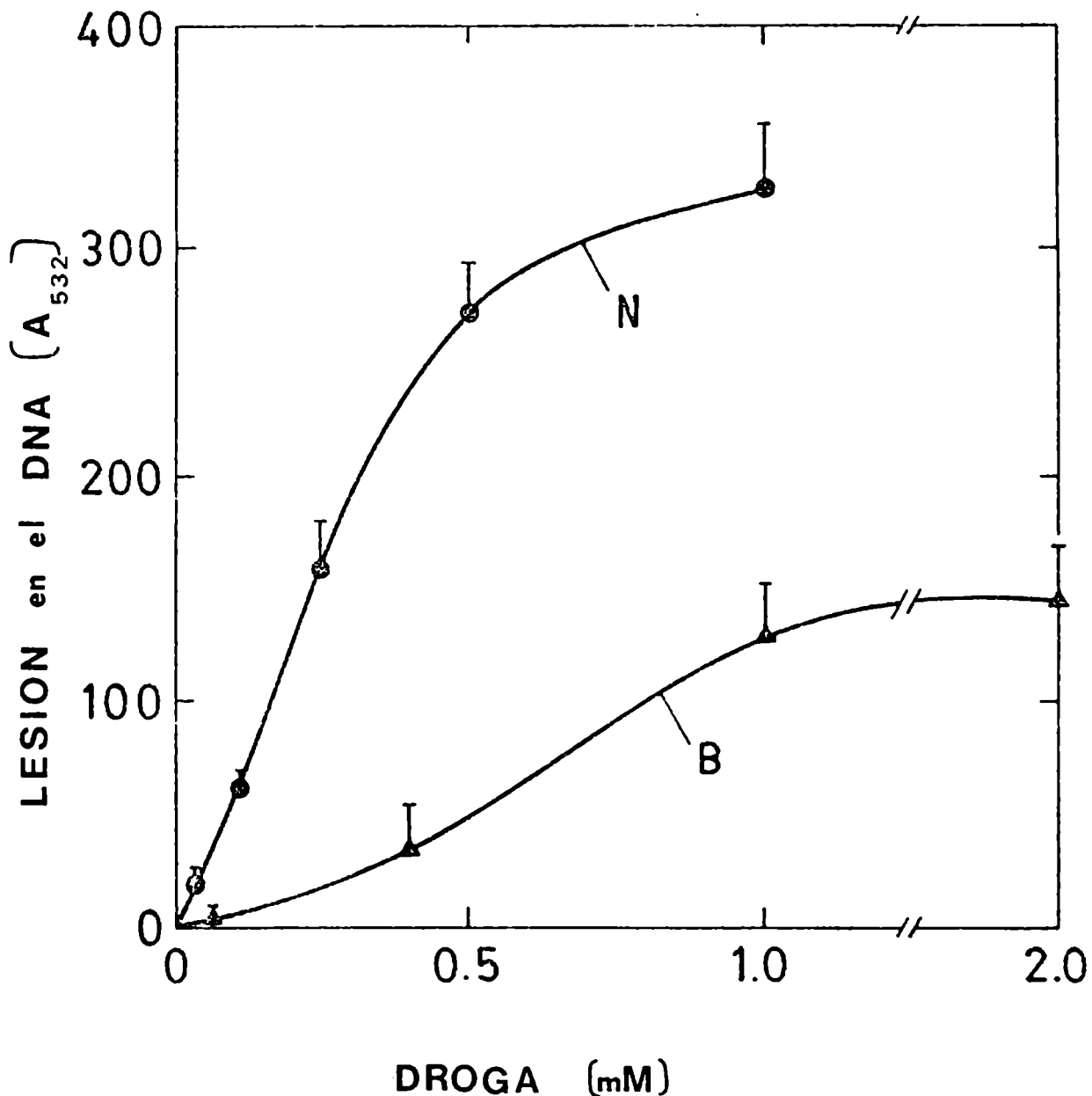
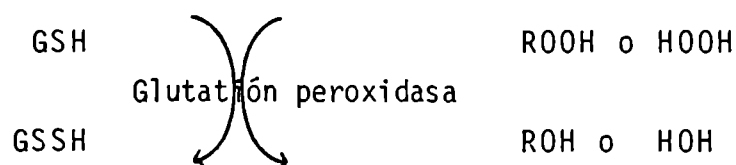


Fig. 10. Efecto de la concentración de nifurtimox (N) y benznidazol (B) sobre la producción de MDA proveniente del DNA de timo de ternera. La mezcla de incubación contenía: homogenato de hígado de rata 500 μ l; sistema generador de NADPH compuesto por NADP, 500 μ M; Glucosa 6-P, 5 μ M; y Glucosa 6-P deshidrogenasa, 3.5 U; DNA de timo de ternera, 5 μ g; nifurtimox y benznidazol en las concentraciones indicadas; en un volumen final de 2.5 ml en buffer TRIS-HCl, 50 mM, KCl, 150 mM pH: 7.4. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 30 min. La concentración de MDA se determinó como se describió en Materiales y Métodos.

En general, se reconoce que varios compuestos son tóxicos para la célula luego de su metabolización a compuestos electrofílicos que también pueden resultar en la formación de OH^\cdot y H_2O_2 . Estos compuestos atacan a moléculas ricas en electrones como los ácidos nucleicos y estimulan la peroxidación lipídica. La presencia de GSH en la célula es un sistema de defensa contra el ataque oxidativo. El GSH junto a la glutatión peroxidasa contribuyen a la remoción de H_2O_2 y los hidroperóxidos ROOH (Sies y col., 1978)



Por otro lado, el glutatión reacciona con diversos intermediarios electrofílicos para formar conjugados. Estas reacciones de conjugación son catalizadas por la glutatión S-transferasa y resultan en la depleción de los niveles de GSH.

La adición de nifurtimox y benznidazol al homogenato de hígado de rata determinó una disminución del contenido de GSH, de distinta magnitud (Figura 11). En la Figura 11 se muestra que el efecto depletor del nifurtimox comenzó desde los primeros minutos de la incubación.

El GSH continuó disminuyendo hasta llegar a niveles no dosables a los 150 min. No se encontró correlación entre la depleción de GSH y la concentración de nifurtimox. El benznidazol también descendió el contenido de GSH en el homogenato de hígado de rata con respecto al control pero en forma menos marcada. La tendencia del nitroimidazol a disminuir el GSH se

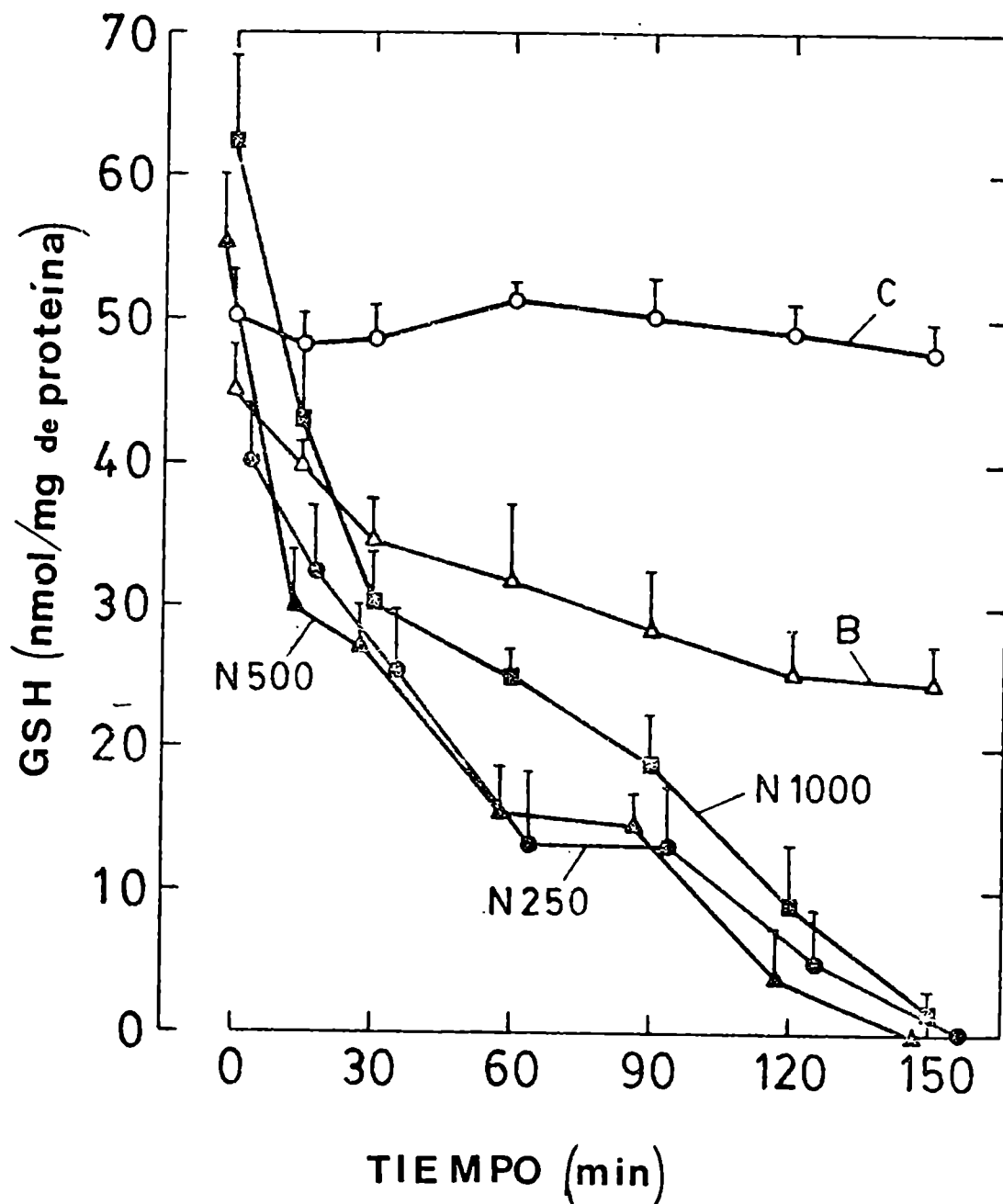


Fig. 11. Efecto del nifurtimox (N) y benznidazol (B) sobre el contenido hepático de GSH. La mezcla de incubación contenía: homogenato de hígado de rata, 500 μ l; un sistema generador de NADPH compuesto por NADP, 500 μ M; Glucosa 6-P, 5 mM; y Glucosa 6-P deshidrogenasa, 3.5 U; nifurtimox y benznidazol en las concentraciones indicadas, en un volumen final de 2.5 ml en buffer TRIS-HCl, 50 mM-KCl, 150 mM pH: 7.4. Las mezclas se incubaron a 37°C a los tiempos indicados. El GSH se determinó por el método de Ellman.

observó a lo largo de los 150 min.

La estimulación de la lipoperoxidación por el nifurtimox y benznidazol se hizo notable a partir de los 30 min. Luego de este tiempo se observó un rápido aumento del MDA dependiendo de la concentración de nifurtimox en el medio de incubación. El mismo efecto se observó con benznidazol pero en concentración 4000 μM . El material que reacciona con el ácido tiobarbitúrico aumentó luego de la disminución del contenido hepático de GSH (Figura 12).

3. Análisis de las rupturas inducidas por el nifurtimox y benznidazol en el DNA del *T. cruzi* "in vivo"

Se estudió el efecto del nifurtimox y benznidazol sobre el DNA del *T. cruzi* "in vivo". A efectos de comparación, se usó otra droga tripanocida, la β lapachona, que también da origen a O_2^- y H_2O_2 en el *T. cruzi* (Docampo y col., 1978b; Boveris y col., 1978a). Se analizaron las lesiones en el DNA nuclear y kinetoplástico.

3.1 Lesiones en el nDNA

El análisis de las lesiones en el nDNA se realizó por medio de gradientes alcalinos de sacarosa. Esta técnica se basa en el cambio del comportamiento de la macromolécula en solución alcalina cuando hay rupturas presentes en las cadenas. Además permite cuantificar las lesiones en el DNA pre-marcado con ^3H timidina. Se encontró que las tres drogas tripanocidas causaron rupturas en una de las cadenas del nDNA, luego de 2 horas de incubación. En la Figura 13 se observa el perfil de sedimentación del nDNA control y de los

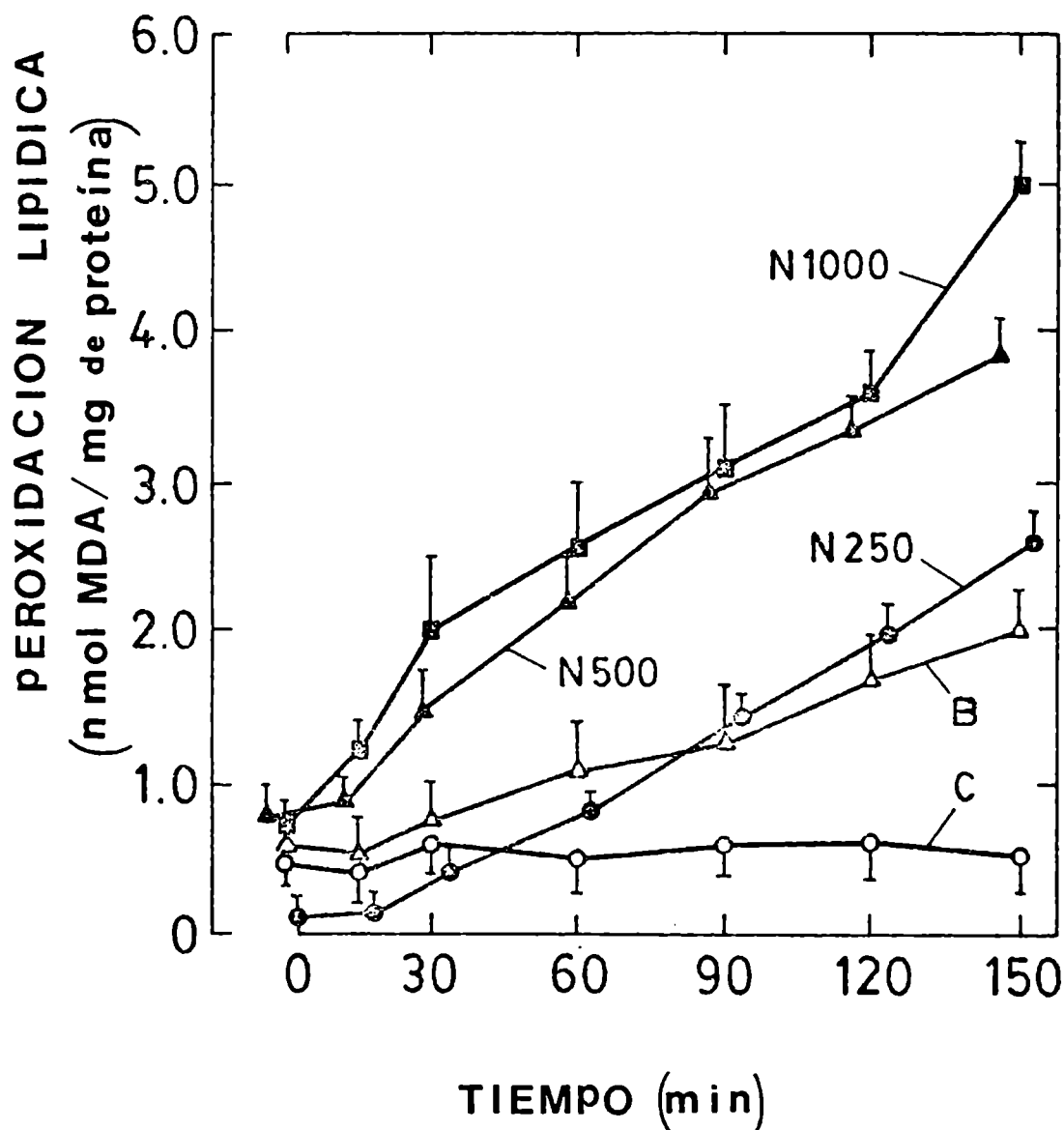


Fig. 12. Cinética de la estimulación de la peroxidación lipídica por nifurtimox (N) y benznidazol (B) en homogenatos de hígado de rata. La mezcla de incubación contenía: homogenato de hígado de rata, 500 μ l; un sistema generador de NADPH compuesto por NADP, 500 μ M; Glucosa 6-P, 5 mM; y Glucosa 6-P deshidrogenasa, 3.5 U; nifurtimox y benznidazol en las concentraciones indicadas, en un volumen final de 2.5 ml en buffer TRIS-HCl, 50 mM; KCl, 150 mM pH: 7.4. Las mezclas se incubaron a 37°C a los tiempos indicados. La concentración de MDA se determinó como se describió en Materiales y Métodos.

nDNAs extraídos de tripanosomas tratados con nifurtimox, benznidazol y βlapachona (Figura 14-15).

Luego de la incubación se encontró una disminución del peso molecular del nDNA que corresponde a un aumento de las rupturas en una de las cadenas. El nDNA de los tripanosomas expuestos a la βlapachona sedimentó más lentamente que el tratado con benznidazol, decreciendo también la velocidad de sedimentación con el aumento de la concentración de la quinona. Los valores de las rupturas se expresaron como: número de rupturas/ 10^6 nucleótidos en una cadena del DNA de T. cruzi.

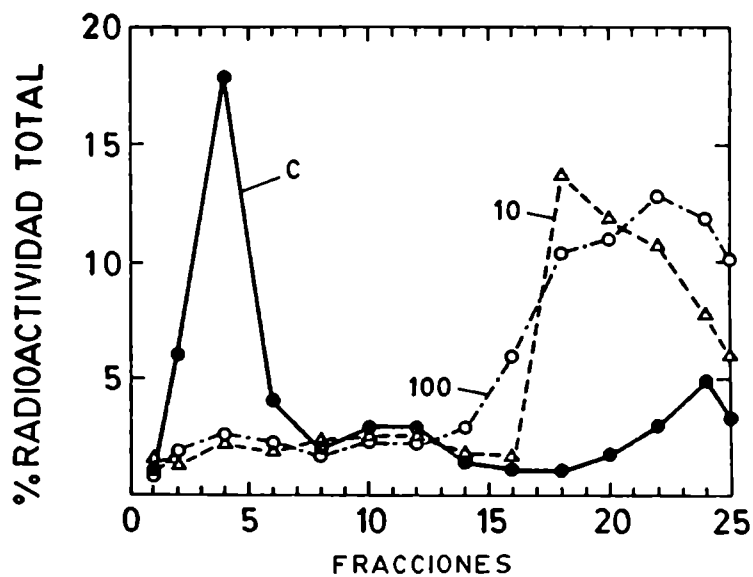


Fig.13. Sedimentación del nDNA obtenido de epimastigotes de T.cruzi incubados con nifurtimox 10 y 100 μ M. T, muestra testigo. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

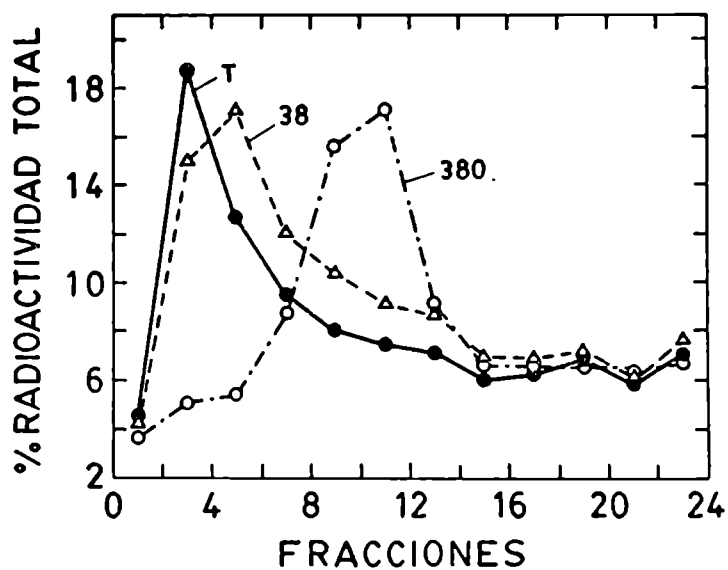


Fig. 14. Sedimentación del nDNA de *T. cruzi* incubado con benznidazol 38 y 380 μM . T, muestra testigo. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

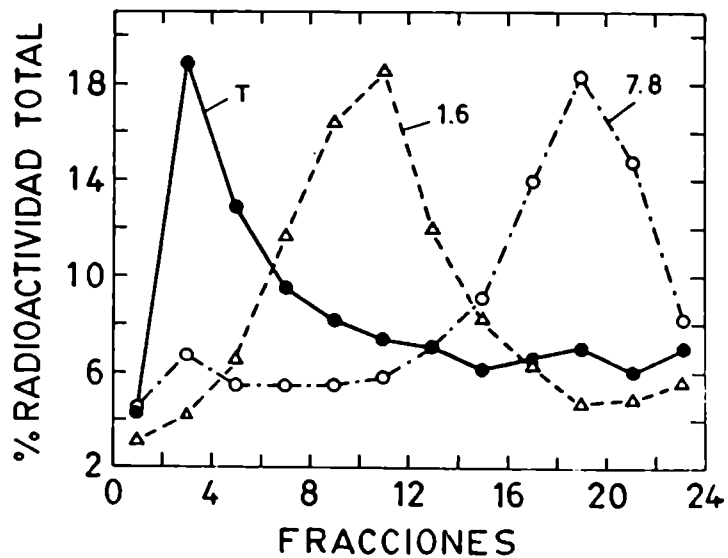


Fig. 15. Sedimentación del nDNA obtenido de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con β lapachona 1.6 y 7.8 μM . T, muestra testigo. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

(Tabla 5). Se observó un incremento de las rupturas de 32 a $65/10^6$ nucleótidos cuando la concentración de nifurtimox aumentó de 10 a 100 μM . El benznidazol fue el compuesto que indujo menos lesiones, aún con la mayor concentración usada. Las rupturas causadas en una de las cadenas del nDNA desaparecieron cuando los parásitos expuestos a las drogas se resuspendieron en medio fresco y se analizaron luego de 20-24 horas para permitir la reparación. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5. No se observó reparación completa en el nDNA proveniente de los tripanosomas tratados con 7.8 μM de β Lapachona.

TABLA V. NUMERO DE RUPTURAS EN UNA DE LAS CADENAS DEL nDNA INDUCIDAS POR EL NIFURTIMOX, BENZNIDAZOL Y β LAPACHONA.

Droga (μM)		Número de rupturas/ 10^6 nucleótidos 24 horas de reparación	
Nifurtimox	10 μM	32	
	100 μM	65	
Benznidazol	38 μM	0.12	
	380 μM	1.4	
β Lapachona	1.6 μM	1	
	7.8 μM	41	41

Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

3.2 Lesiones en el kDNA

Las lesiones inducidas por el nifurtimox, benznidazol y β lapachona en el kDNA del T. cruzi, se analizaron por dos métodos: a) como el porcentaje de DNA de una cadena retenido en filtros de nitrocelulosa y b) en geles desnaturizantes de agarosa.

Como en el ensayo de los filtros de nitrocelulosa descrito por Center y Richardson (1970), el DNA covalentemente cerrado de los mini y maxicírculos del kDNA extraído de los parásitos tratados con las drogas tripanocidas, se desnaturizó y renaturalizó rápidamente en condiciones poco estrictas. El DNA que no renaturalizó, se unió al filtro de nitrocelulosa que retiene DNA de cadena simple y deja pasar al de doble cadena. Cuanto mayor es el porcentaje de DNA retenido; mayor es el número de rupturas en una de las cadenas del kDNA.

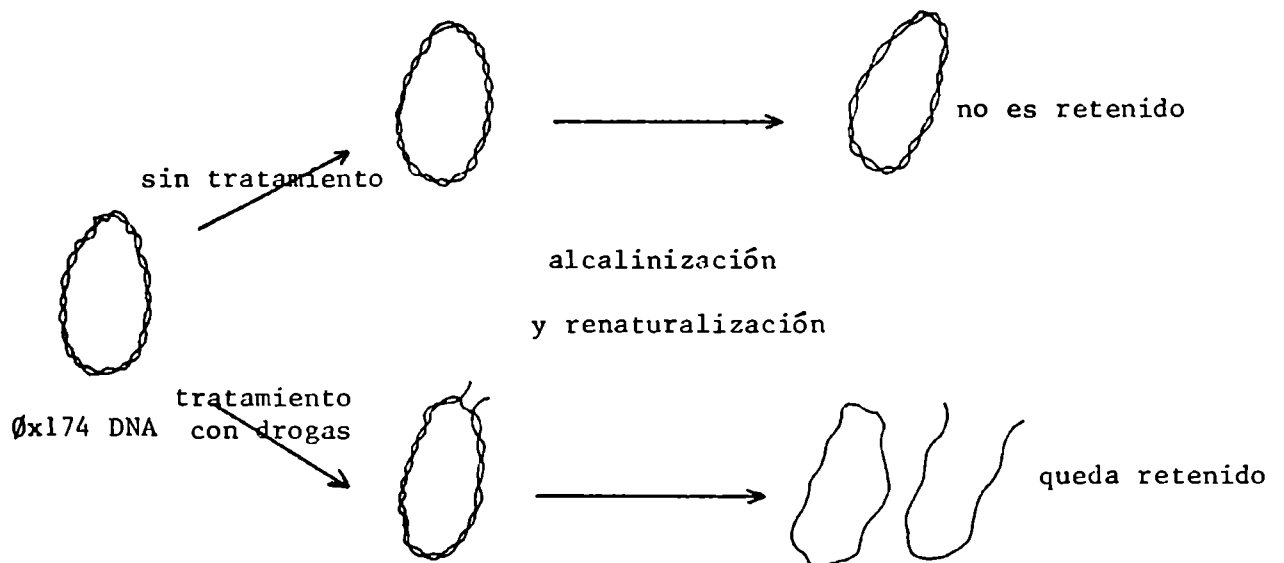


Fig. 16. Efecto del tratamiento alcalino sobre la desnaturización y renaturalización de un DNA covalentemente cerrado.

En la Tabla 6 se muestra el porcentaje de retención de DNA por filtros de nitrocelulosa. Con los tres compuestos se observaron aumentos en el porcentaje de retención respecto del kDNA control, en forma dependiente de la concentración empleada. En el kDNA de los tripanosomas tratados con nifurtimox, benznidazol y β lapachona, y resuspendidos en medio de incubación fresco durante 20-24 horas, se observó disminución en el porcentaje de retención. Con la mayor concentración de β lapachona, 7.8 μ M, se obtuvieron los mayores índices de rupturas, 53%, y los parásitos no se recuperaron totalmente a las 24 horas, 46%.

TABLA VI
INFLUENCIA DEL NIFURTIMOX, BENZNIDAZOL Y β LAPACHONA EN LA PRODUCCION DE RUPTURAS EN EL kDNA DE T. CRUZI

Concentración de agentes lesivos (μ M)		% de DNA dañado antes de la depuración y trat. alcalino	% de DNA dañado después de la depuración y trat. alcalino	
		% de retención 24 hs sin droga		
Control		5.4	4.5	10
Nifurtimox	10	20	5	29
	100	47	7	58
Benznidazol	38	15	4	22
	380	35	3	47
β lapachona	1.6	24	5	30
	7.8	53	46	79

Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos

Con los geles desnaturalizantes de agarosa, se observó un aumento de los fragmentos de peso molecular pequeño, en el kDNA de los tripanosomas tratados con las drogas respecto al control (Figura 17). La relación kDNA de bajo peso molecular/kDNA control aumentó con el aumento de la concentración de las drogas, especialmente de la β lapachona. En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos con el kDNA proveniente de los tripanosomas a los cuales se les permitió recuperarse de las lesiones durante 24 horas. Se observó una disminución del pico radiactivo correspondiente a los fragmentos de bajo peso molecular. El kDNA de los parásitos tratados con β lapachona, 7.8 μ M, no se reparó totalmente.

También se estudió si estas drogas actuaban como agentes alquilantes del kDNA. Se sabe que la metilación aumenta la velocidad de depurinación del DNA en varios órdenes de magnitud. Esta propiedad se usó para medir la cantidad de DNA metilado. Para ello, primero se calentó el DNA a 70°C a pH 7.5 y luego se lo incubó en medio alcalino. El calentamiento libera las bases metiladas y el tratamiento alcalino cliva los sitiosapurínicos (Center y col., 1970). Como se observa en la Tabla 6, ninguna de las drogas actuó a través de este mecanismo, la relación entre los porcentajes de DNA retenidos antes y después del tratamiento alcalino se mantuvieron.

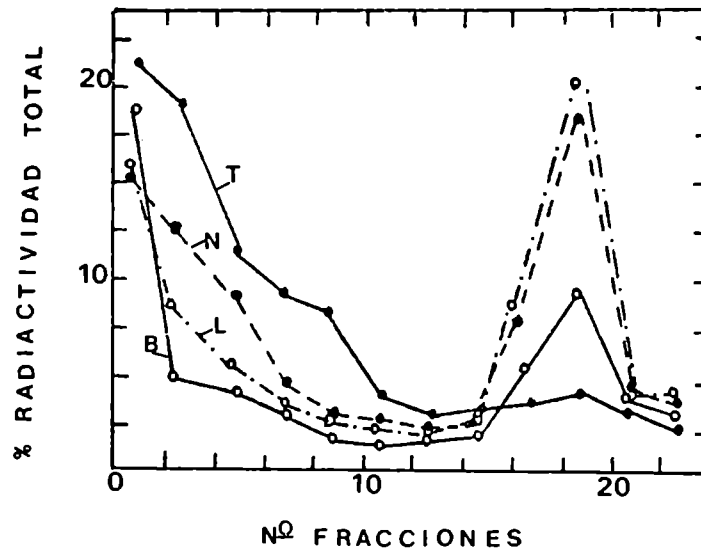


Fig. 17. Análisis del kDNA de *T. cruzi* en gel alcalino de agarosa. T, muestra testigo; N, tratado con Nifurtimox 100 μM ; B, tratado con benznidazol 380 μM ; L, tratado con β lapachona 7.8 μM . Las condiciones experimentales se describen en Material y Métodos.

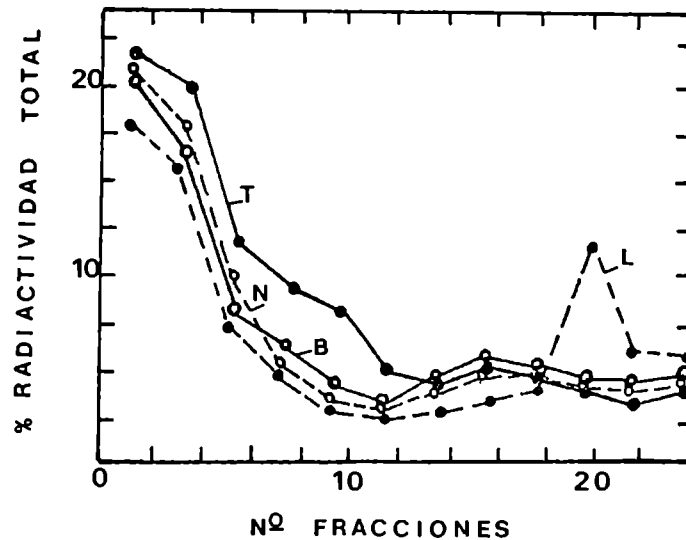


Fig. 18. Análisis del kDNA de *T. cruzi* en gel alcalino de agarosa. El kDNA se extrajo de epimastigotes tratados con las drogas indicadas y reincubados 24 hs en ausencia de las mismas. T, muestra testigo; N, tratado con nifurtimox 100 μM ; B, tratado con benznidazol 380 μM ; L, tratado con β lapachona 7.8 μM . Las condiciones experimentales se describen en Material y Métodos.

4. Inducción de "síntesis no programada de DNA"

El benznidazol, nifurtimox y βlapachona son metabolizados por el T. cruzi a compuestos tóxicos que reaccionan con el DNA, en el cual introducen rupturas. Como consecuencia de la reacción con el DNA, el tripanosoma debería remover los aductos covalentemente unidos y las bases degradadas, por el proceso de escisión y reparación dentro de la célula. Un método para medir reparación como consecuencia de la reacción de un compuesto con el DNA, es la "síntesis no programada de DNA". Este método consiste en cuantificar la incorporación de ^3H timidina en células arrestadas en la fase S. Para ello, fue necesario inhibir primero la síntesis semiconservativa de DNA en el T. cruzi.

4.1 Efecto de inhibidores de la síntesis de DNA en el T. cruzi

Se estudió el efecto de varios compuestos que inhiben la síntesis semiconservativa de DNA. Los compuestos fueron: hidroxurea, fluordeoxiuridina, cafeína y cicloheximida. La adición de estas drogas a los tripanosomas en la fase exponencial, causó inhibición en la incorporación de ^3H timidina al material insoluble en TCA (Tabla 7). La máxima inhibición, 85% respecto al control, se obtuvo con los parásitos expuestos a 10 mM hidroxurea durante 16 horas. Con cicloheximida 1 mg/ml, se observó una drástica disminución en la incorporación de ^3H leucina, 92%, mientras que la incorporación de ^3H timidina disminuyó a un 34%. La cafeína en concentraciones entre 1 y 10 mM no disminuyó la síntesis semiconservativa de DNA en forma significativa. Con la F d-uridina a tiempos cortos, 1 y 2 horas, se obtuvieron resultados simila-

res a los de la hidroxiaurea.

TABLA VII

EFFECTO DE DISTINTOS INHIBIDORES SOBRE LA INCORPORACION DE ^3H | timidina y ^3H | leucina AL MATERIAL INSOLUBLE EN TCA

	% del control	
	^3H timidina	^3H leucina
Control	100	
Hidroxiaurea		
10 mM (1 hora)	37	
10 mM (2 horas)	31	
10 mM (16 horas)	15	
20 mM (2 horas)	33	
Hidroxiaurea 10 mM y cicloheximida 100 $\mu\text{g/ml}$		
(1 hora)	35	22
(2 horas)	30	18
Fluorodeoxiuridina 10^{-5}M		
(1 hora)	40	
(16 horas)	20	
Fluorodeoxiuridina 10^{-5}M y cicloheximida 100 $\mu\text{g/ml}$		
(1 hora)	45	25
Fluorodeoxiuridina 10^{-5}M e hidroxiaurea 10 mM		
(1 hora)	39	
Cafeína		
10^{-2}M (1 hora)	84	
10^{-3}M (1 hora)	80	
Cicloheximida		
10 g/ml (2 horas)	49	41
100 g/ml (2 horas)	42	26
500 g/ml (2 horas)	34	13
1000 g/ml (2 horas)	30	8

Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

4.2 Inducción de "síntesis no programada de DNA"

Para medir la capacidad del nifurtimox, benznidazol y β lapachona para inducir "síntesis no programada de DNA", se arrestaron los tripanosomas con hidroxiaurea 10 mM y cicloheximida 100 μ g/ml, durante 16 horas. De ese modo se disminuyó la incorporación de ^3H timidina debida a la duplicación del DNA. Luego los parásitos se incubaron con las drogas tripanocidas mencionadas en presencia de ^3H timidina. Los resultados se presentan en la Tabla 8. Se observó una estimulación en la incorporación de ^3H timidina en los parásitos tratados respecto al control. El tratamiento con las drogas productoras de radicales libres en el T. cruzi, resultó en un aumento de 9 veces y de 8 veces para el nifurtimox y la β lapachona respectivamente, el nivel de incorporación de ^3H timidina. El benznidazol, por otro lado, indujo "síntesis no programada de DNA", pero el incremento fue sólo el triple del control. A efecto de comparación se usó la α lapachona, este compuesto es un isómero biológicamente inactivo de la β lapachona del cual se sabe que no genera productos de la reducción parcial del oxígeno en el T. cruzi. La α lapachona no indujo "síntesis no programada de DNA", como se esperaba.

TABLA VIII

INDUCCION DE SINTESIS NO PROGRAMADA DE DNA EN EL T. CRUZI

	dpm/10 ⁶ parásitos	incremento
Hidroxiurea 10 mM + cicloheximida 100 µg/ml	170*	
+Nifurtimox 100 µM	1527	9 veces
+Benznidazol 380 µM	457	3 veces
+βlapachona 7.8 µM	1005	8 veces
+αlapachona 7.8 µM	140	

Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

* Los resultados son el promedio de tres experimentos por duplicado.

5. Efecto del nifurtimox, benznidazol, α y β lapachona, tingenona y miconidina sobre la biosíntesis de macromoléculas.

Se estudió el efecto de drogas tripanocidas de distinta estructura química, sobre la biosíntesis de macromoléculas de T. cruzi, midiendo la incorporación de ³H|timidina, ³H|uridina y L|³H|leucina al DNA, RNA y proteínas respectivamente.

5.1 Efecto del nifurtimox

La acción del nifurtimox sobre la incorporación de ³H|

timidina, ^3H uridina y L^3H leucina al DNA, RNA y proteínas se muestra en la Figura 19. Se observó que el nifurtimox inhibió la incorporación de precursores radiactivos a la fracción precipitable con TCA. La magnitud de la inhibición fue dependiente de la concentración del nitrofurano. La incorporación de ^3H timidina, ^3H uridina y L^3H leucina se vió modificada desde la primera hora de incubación. Luego de la primera hora y con la concentración más alta de nifurtimox, 100 μM . La curva de incorporación de ^3H uridina se hizo bifásica.

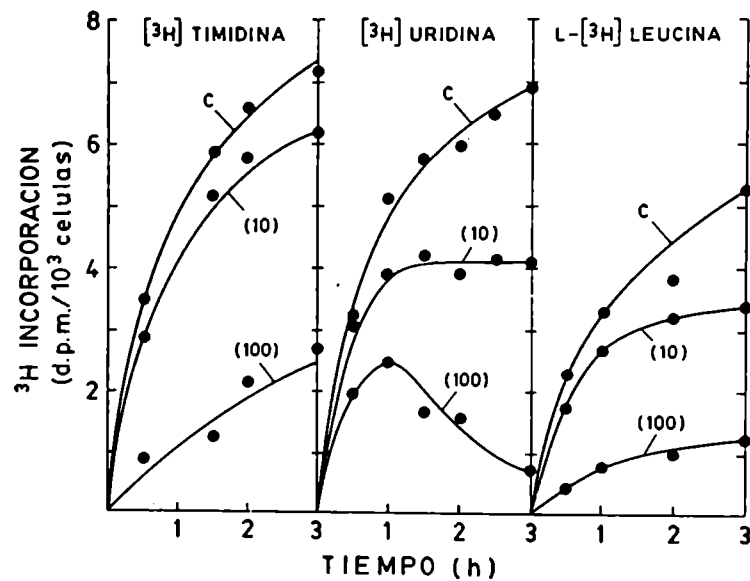


Fig. 19. Efecto del nifurtimox sobre la incorporación de ^3H timidina, ^3H uridina y L^3H leucina al DNA, RNA y proteínas de *T. cruzi* respectivamente. El nifurtimox se usó en concentraciones 10 y 100 μM , (C), muestra control. Las condiciones experimentales se describen en Material y Métodos. Los puntos representados son el promedio de tres experimentos realizados por duplicado.

Si bien la disminución en la incorporación de precursores radiactivos a macromoléculas puede reflejar interferencias en la biosíntesis de las mismas, también se debe considerar la disminución en la entrada, "uptake", de los precursores radiactivos. Para ello se midió la radiactividad total en las células por una parte y la incorporada al DNA, RNA y proteína por la otra. La radiactividad total representa la incorporación de los precursores radiactivos a las fracciones metabólicas solubles más la incorporación al DNA, RNA o proteínas respectivamente, mientras que la incorporación al material insoluble en TCA, representa exclusivamente la síntesis de macromoléculas. La comparación de estos dos parámetros en función del tiempo y de la concentración de nifurtimox se presenta en la Figura 20. Se observó que la inhibición en la síntesis de macromoléculas fue siempre mayor que la inhibición en la entrada de los respectivos precursores (Tabla 9).

El efecto del nifurtimox sobre la síntesis de DNA se confirmó en condiciones excluyentes de otras acciones metabólicas como lo son la inhibición del transporte de ^3H timidina, o la transformación deficiente de timidina a timidina trifosfato. Se utilizó un modelo experimental semejante al de Plagemann (1975) para la inhibición de procesos biosintéticos en hepatomas. Los epimastigotes se incubaron primero con ^3H timidina, 30 min a 6°C , en estas condiciones el nucleótido penetra en la célula pero no se incorpora al DNA (Figura 21, izq), luego se lavaron y se resuspendieron

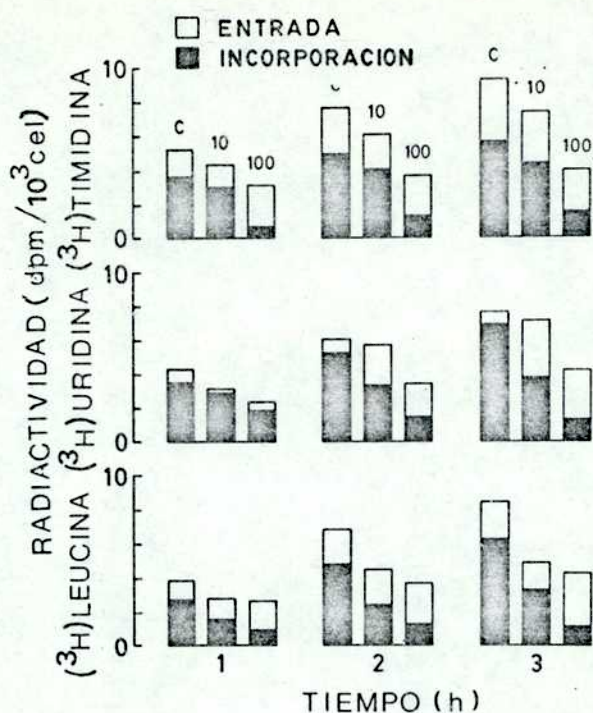


Fig. 20. Cinética de la incorporación a macromoléculas y entrada a la célula de precursores radiactivos a epimastigotes de *T. cruzi* tratados con nifurtimox 10 y 100 μM , (C), muestra control. Las condiciones experimentales se describen en Material y Métodos.

en medio de incubación nuevo y se trataron con nifurtimox 10 y 100 μM a 37°C. Se observó que la ^3H timidina en el interior de los parásitos se incorporó rápidamente al DNA (curva testigo), el nifurtimox inhibió esa incorporación en forma proporcional a su concentración (Figura 21, derecha). Sin embargo, al cabo de las tres horas de incubación las inhibiciones de la incorporación fueron menores, 13 y 41%, que las calculadas en base a los datos de la Figura 20 para igual tiempo de incubación. Las diferencias representan la inhibición del transporte de ^3H timidina por el nifurtimox.

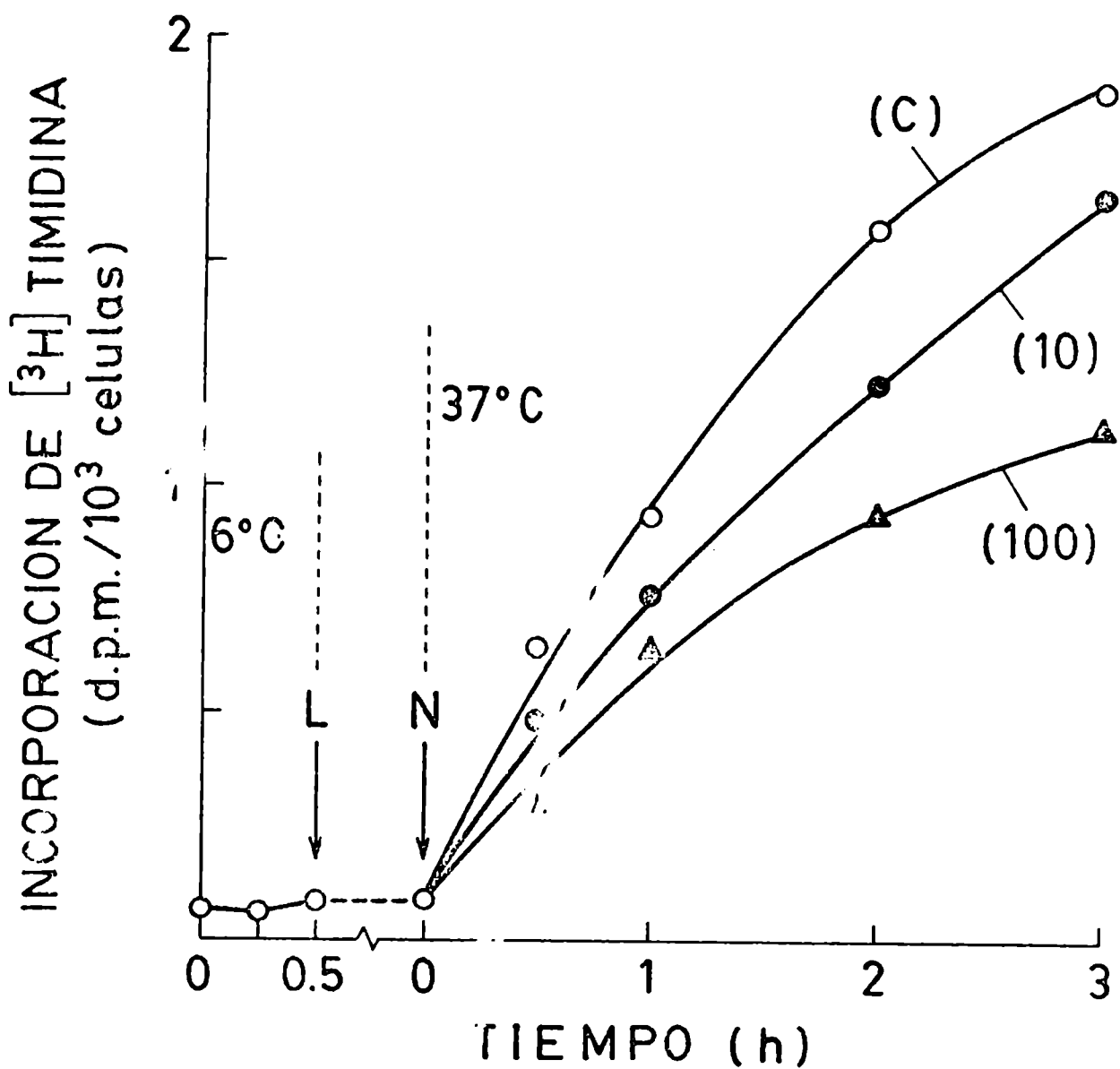


Fig. 21. Efecto del nifurtimox sobre la biosíntesis de DNA en epimastigotes de *T. cruzi*. Los tripinosomas se preincubaron con $[^3\text{H}]$ timidina durante 30 min a 6°C , luego se lavaron, se resuspendieron en medio de incubación nuevo y se trataron con nifurtimox 10 y 100 μM a 37°C . L, lavado; N, nifurtimox; C, muestra control. Los valores son el promedio de los experimentos aislados realizados por duplicado.

TABLA IX

INHIBICION DE LA BIOSINTESIS DE MACROMOLECULAS EN T. CRUZI
 POR NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL*

Droga (μ M)	Precursor	Inhibición de la incorporación de macromoléculas(%)	Inhibición de la incorporación total (%)
Nifurtimox (10)	^3H Timidina	33**	20**
(100)		83	52
Nifurtimox (10)	^3H Uridina	32	4
(100)		75	49
Nifurtimox (10)	L- ^3H Leucina	49	33
(100)		72	47
Benznidazol(38)	^3H Timidina	10	9
(380)		54	39
Benznidazol(38)	^3H Uridina	9	6
(380)		42	39
Benznidazol(38)	L- ^3H Leucina	48	45
(380)		80	82

* Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.
 Tiempo de incubación, 2 horas.

** Promedio de dos determinaciones; la diferencia con los valores individuales fue < 5%.

5.2 Efecto del benznidazol

El benznidazol disminuyó la entrada total y la incorporación de ^3H timidina al DNA. Los resultados se muestran en la Figura 22. Se observaron diferencias en la magnitud de esas inhibiciones con la concentración de nitroimidazol 380 μM . Pero aún a esa concentración correspondiente a la mayor empleada, la diferencia fue menor que la obtenida para el nifurtimox.

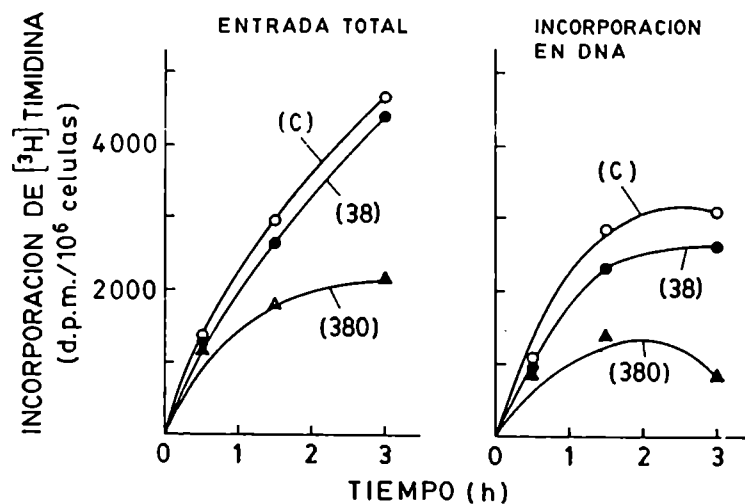


Fig. 22. Efecto del benznidazol sobre la entrada a la célula y la incorporación de ^3H timidina al DNA de epimastigotes de *T. cruzi*. Las concentraciones de benznidazol fueron 38 y 380 μM . (C) muestra control. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los resultados son el promedio de tres experimentos aislados realizados por duplicado.

También se estudió el efecto de esta droga sobre la entrada e incorporación de ^3H uridina y L^3H leucina (Figura 23). Los valores porcentuales de esas inhibiciones se incluyen en la Tabla 9. Se observó que el porcentaje de disminución en la entrada de los precursores radiactivos a los parásitos fue similar al de la inhibición de la síntesis de DNA, RNA y proteínas. El efecto del benznidazol varió según el precursor estudiado, observándose máximas inhibiciones con la L^3H leucina.

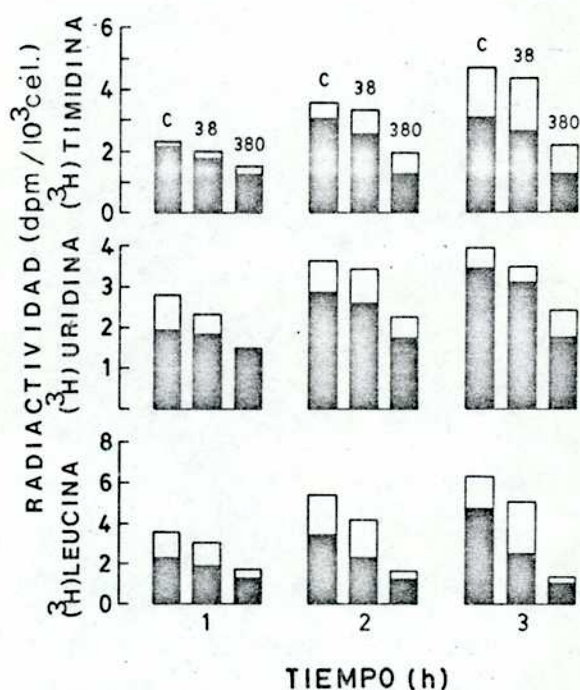


Fig. 23. Cinética de la incorporación de macromoléculas y entrada a la célula de precursores radiactivos en epimastigotes de *T. cruzi* tratados con benznidazol 38 y 380 μM . (C), muestra control. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los valores son el promedio de tres experimentos aislados realizados por duplicado.

5.3 Efecto de las α y β lapachonas

La β lapachona es un generador positivo de O_2^- y H_2O_2 en el T. cruzi, existiendo buena correlación entre esa capacidad y la acción tripanocida "in vitro" (Boveris y col., 1980). La β lapachona disminuyó la incorporación de precursores radiactivos a las macromoléculas. La Figura 24 muestra que la β lapachona 1.6 μ M produjo una inhibición significativa en la incorporación de 3H timidina mientras que con la concentración 7.8 μ M, la inhibición fue casi total. Para confirmar la intervención de los radicales del oxígeno es estos efectos, se realizó un experimento paralelo con la α lapachona, que es un isómero biológicamente inactivo de la β lapachona (Boveris y col., 1978). Los resultados de la Figura 24 confirman la especificidad del isómero β con respecto al α . Estas observa-

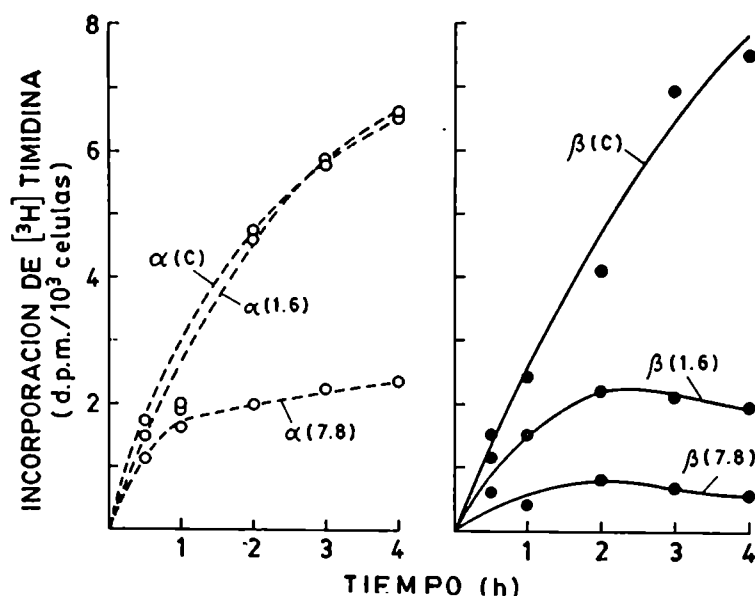


Fig. 24. Cinética de incorporación de 3H timidina al DNA de T. cruzi tratados con α y β lapachona 1.6 y 7.8 μ M (C) muestra control. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los resultados son el promedio de tres experimentos realizados por duplicado.

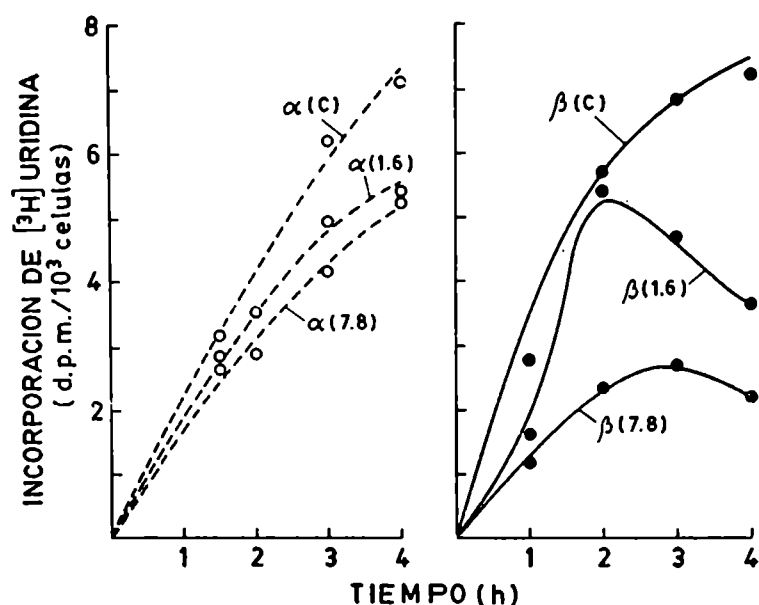


Fig. 25. Cinética de la incorporación de ^3H uridina al RNA de *T. cruzi* tratados con α y β lapachona 1.6 y 7.8 μM . (C) muestra control. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los resultados son el promedio de tres experimentos realizados por duplicado.

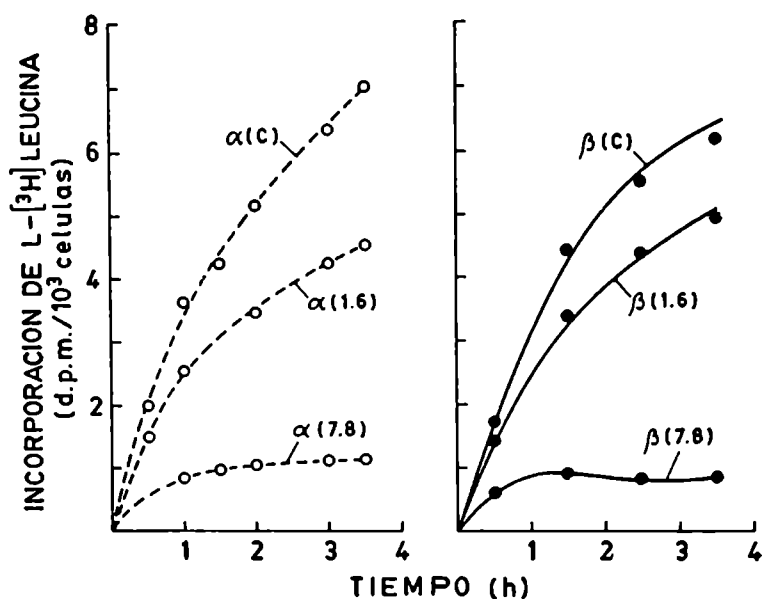


Fig. 26. Cinética de incorporación de L- ^3H leucina a las proteínas del *T. cruzi* tratados con α y β lapachona 1.6 y 7.8 μM . (C) muestra control. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los resultados con el promedio de tres experimentos realizados por duplicado.

ciones se complementaron con el examen del efecto de ambas lapachonas sobre la incorporación de ^3H uridina y ^3H leucina. (Figuras 25-26). Al igual que con el nifurtimox, para la β lapachona, se observó una curva bifásica para la incorporación de ^3H uridina, con un máximo a la hora de incubación. Los resultados en la Tabla 10, muestran que la β lapachona inhibió la incorporación de ^3H timidina más eficazmente que la α lapachona. La β lapachona inhibió más intensamente la incorporación de ^3H timidina que la de los otros precursores. En cambio la α lapachona inhibió en mayor grado la incorporación de ^3H leucina que la de los otros precursores, siendo esta inhibición comparable a la que produjo la β lapachona (Figuras 24-25-26). En el caso de la α lapachona, la disminución en la incorporación de ^3H timidina, se debió a una menor entrada del precursor radiactivo al parásito. La β lapachona, no sólo afectó la entrada de precursor radiactivo sino que además inhibió la síntesis de DNA.

5.4 Efecto de la tingenona y miconidina

El efecto de la tingenona y miconidina sobre la incorporación de ^3H timidina se muestra en la Figura 27. En ambos casos se observó inhibición en la incorporación que fue proporcional a la concentración de la droga y al tiempo de incubación. La miconidina fue más potente que la tingenona, pues concentraciones menores produjeron efectos similares o mayores que los obtenidos con la tingenona. La Figura 28 muestra el efecto de estas drogas sobre la incorporación de

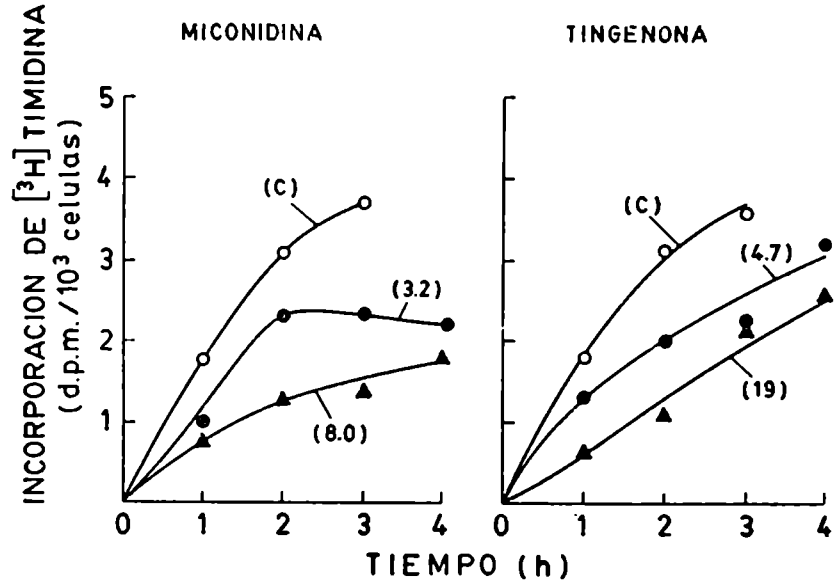


Fig. 27. Cinética de la incorporación de ^3H timidina al DNA de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con miconidina 3.2 y 8.0 μM (izq.) y tingenona 4.7 y 19 μM (derecha). (C) muestra control. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los resultados son el promedio de tres experimentos realizados por duplicado.

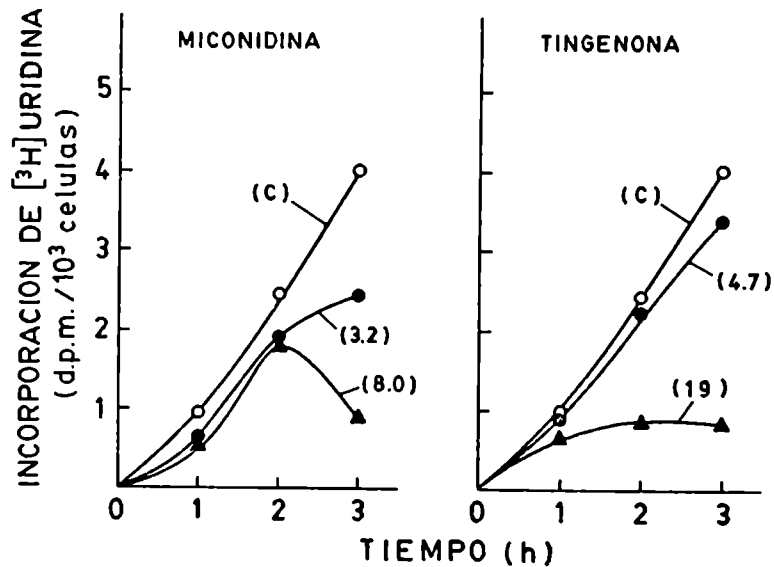


Fig. 28. Cinética de la incorporación de ^3H uridina al RNA de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con miconidina 3.2 y 8.0 μM (izq.) y tingenona 4.7 y 19 μM (derecha). (C), muestra control. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los resultados son el promedio de tres experimentos realizados por duplicado.

^3H uridina en epimastigotes de T. cruzi. También se observó inhibición en la incorporación. Con miconidina $0.8\ \mu\text{M}$, luego de la primera hora de incubación, disminuyó la actividad incorporada al RNA dando lugar a una curva bifásica. Este efecto no se observó con la tingenona no obstante la inhibición de la incorporación del precursor radiactivo. Las dos drogas también tienen acción inhibitoria sobre la incorporación de $\text{L-}^3\text{H}$ leucina (Figura 29).

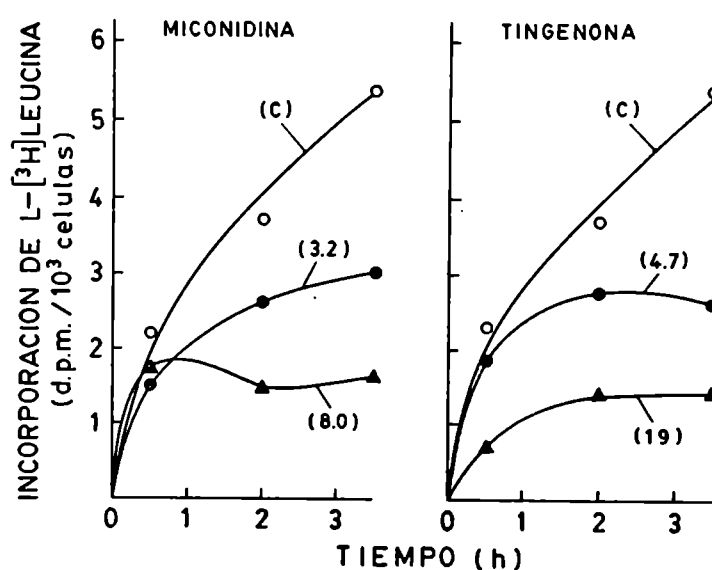


Fig. 29. Cinética de la incorporación de $\text{L-}^3\text{H}$ leucina a las proteínas del T. cruzi tratados con miconidina 3.2 y $8.0\ \mu\text{M}$ (izq) y tingenona 4.7 y $19\ \mu\text{M}$ (derecha). Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los resultados con el promedio de tres experimentos aislados realizados por duplicado.

Se midieron los porcentajes de inhibición en la síntesis de macromoléculas con respecto a la inhibición en la entrada de los respectivos precursores (Tabla 11). En general se encontró una inhibición de igual magnitud entre la entrada de los precursores radiactivos y la biosíntesis de DNA, RNA y proteínas para la tingenona. Mientras que para la miconidina, el primer proceso fue menos disminuído que el segundo.

TABLA XI

INHIBICION DE LA BIOSINTESIS DE MACROMOLECULAS EN T. CRUZI
POR TINGENONA Y MICONIDINA*

Droga (μ M)	Precursor	Inhibición de la incorporación de macromoléculas	Inhibición de la incorporación total
Tingenona 4.7 19	^3H timidina	30** 62	25** 45
Tingenona 4.7 19	^3H uridina	12 65	8 68
Tingenona 4.7 19	L ^3H leucina	41 62	37 49
Miconidina 3.2 8.0	^3H timidina	35 67	21 36
Miconidina 3.2 8.0	^3H uridina	42 83	10 58
Miconidina 3.2 8.0	L ^3H leucina	62 67	24 31

* Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Tiempo de incubación: 3 horas. ** Promedio de dos determinaciones, la diferencia de los valores individuales fue < 5%.

5.5 Potencia relativa de las drogas tripanocidas como inhibidores de la síntesis de DNA.

Se midieron las concentraciones que produjeron un 50% de inhibición en la incorporación de ^3H timidina al DNA. En la Figura 30 se muestra la relación concentración-efecto para las seis drogas, nifurtimox, benznidazol, α y β lapachona, tingenona y miconidina.

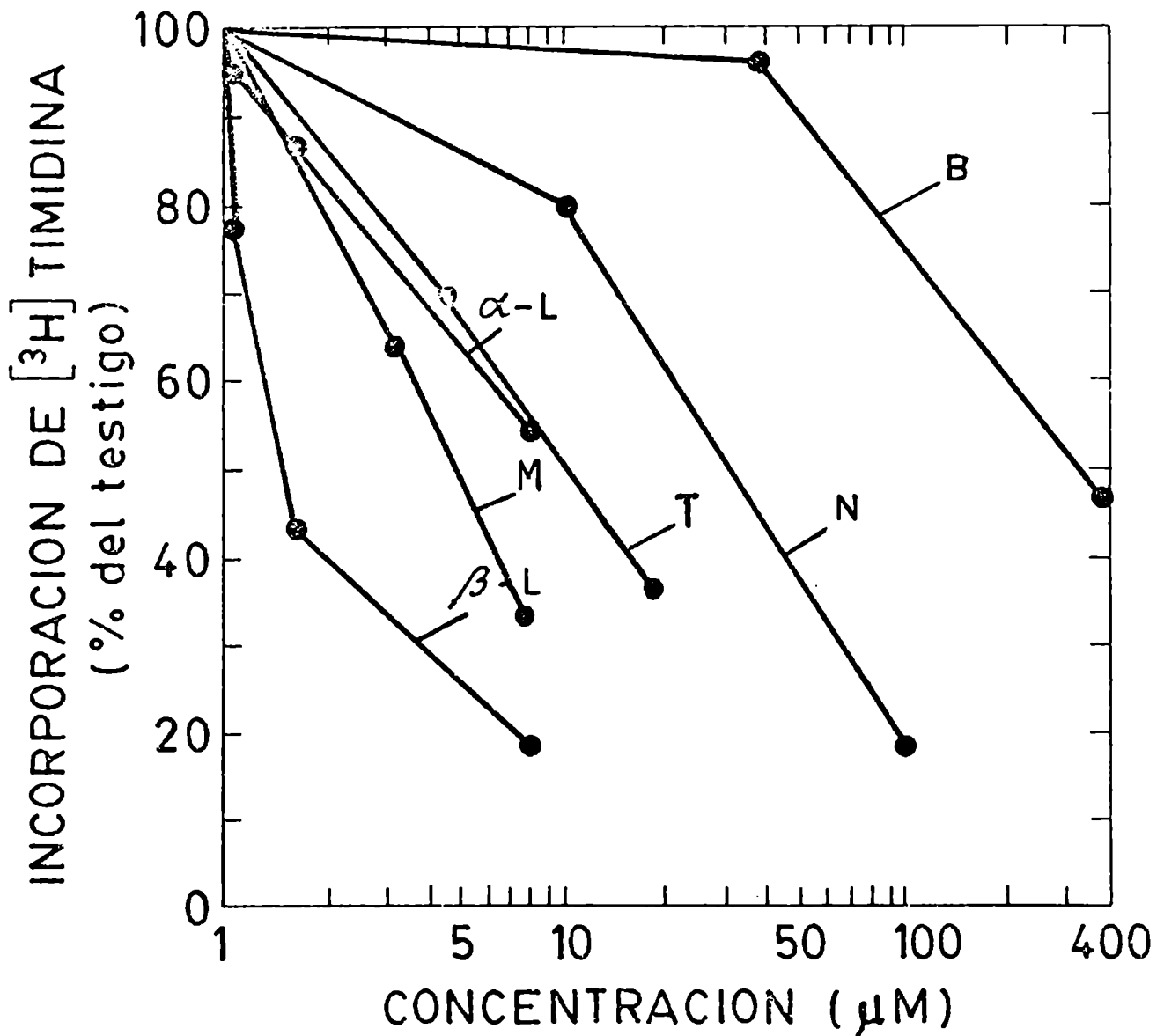


Fig. 30. Relación concentración-efecto para inhibidores de la incorporación de ^3H timidina. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. β -L, β lapachona, α -L, α lapachona, N, nifurtimox, B, benznidazol, T, tingenona y M, miconidina.

Los resultados obtenidos fueron: nifurtimox, 60 μM ; benznidazol, 300 μM ; α lapachona 10 μM (extrapolado); β lapachona 1.5 μM ; miconidina 7 μM ; y tingenona 12.6 μM . Comparando las drogas de estructura química semejante, el nifurtimox fue 5 veces más potente que el benznidazol, la β lapachona 6 veces más efectiva que el isómero α .

5.6 Efecto del nifurtimox y β lapachona en epimastigotes preincubados con las drogas

Se estudió el efecto que tuvo la preincubación de epimastigotes de T. cruzi sobre la incorporación de ^3H timidina al DNA. Para ello se incubaron los parásitos con nifurtimox 100 μM o β lapachona 1.5 μM , los tiempos indicados, luego de eliminar el compuesto por lavados, se reincubaron con ^3H timidina durante una hora, para permitir la incorporación del nucleótido al DNA. Los resultados se muestran en la Figura 31. Los efectos más notables se obtuvieron con el nifurtimox, pues la incorporación de ^3H timidina disminuyó un 85% en las muestras preincubadas dos horas con el nitrofurano. Resultados semejantes aunque de menor magnitud, se obtuvieron con la β lapachona.

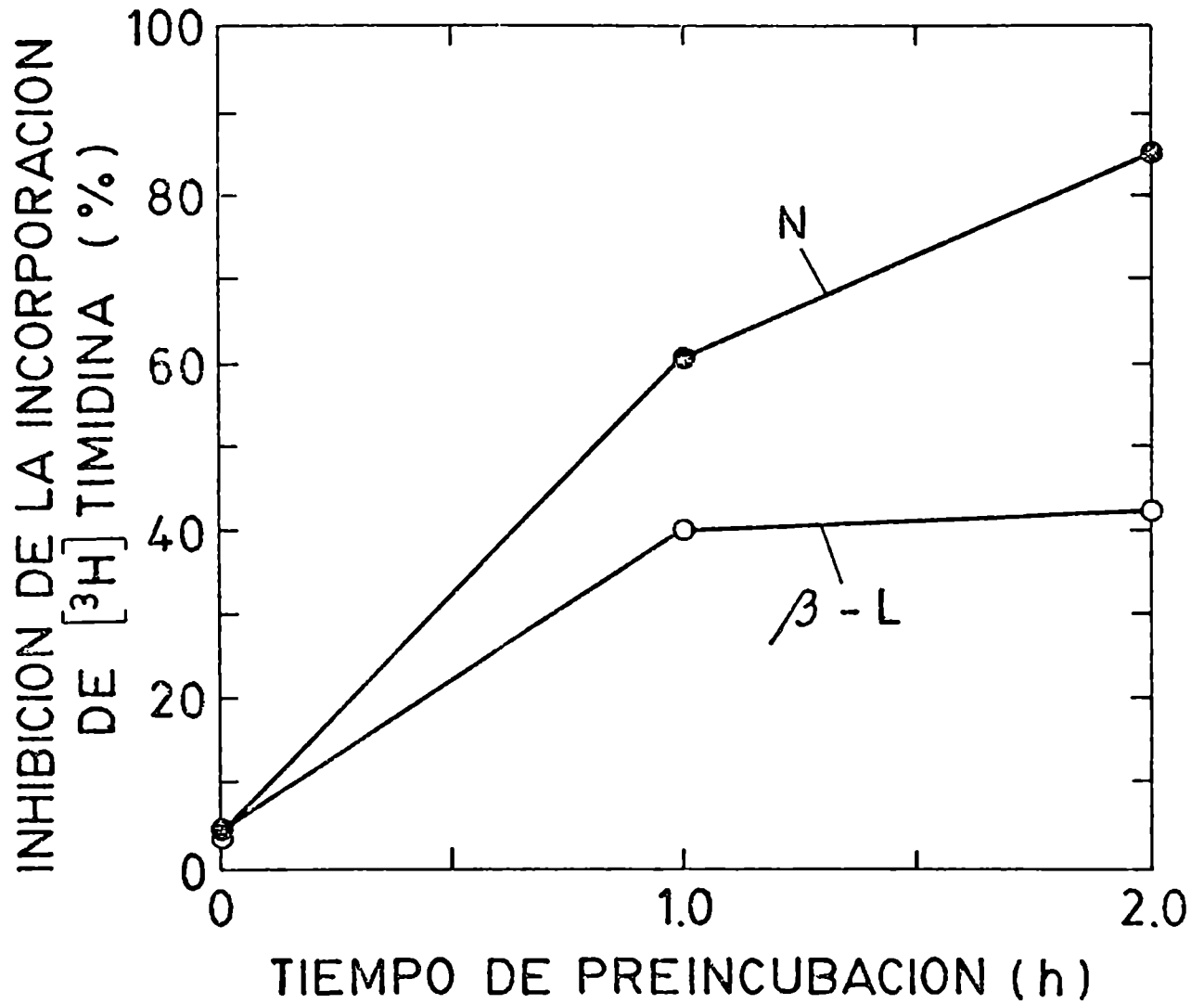


Fig. 31. Efecto del tiempo de preincubación con nifurtimox o β lapachona sobre la inhibición de la incorporación de $[^3\text{H}]$ timidina en el DNA. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. N, nifurtimox, $100 \mu\text{M}$; β -L, β lapachona, $7.8 \mu\text{M}$. Los resultados son el promedio de dos experimentos realizados por duplicado.

6. Efecto del nifurtimox, benznidazol y β lapachona sobre la degradación del DNA, RNA y proteínas.

Las Figuras 32-33 y 34 muestran los efectos del nifurtimox y benznidazol sobre la degradación del DNA, RNA y proteínas del T. cruzi premarcadas con $|^3\text{H}|$ timidina, $|^3\text{H}|$ uridina y $\text{L}|^3\text{H}|$ leucina respectivamente. Para facilitar la comparación con los efectos sobre la incorporación de los precursores radiactivos, las drogas se emplearon en concentraciones iguales a las empleadas en los experimentos de inhibición de la biosíntesis de macromoléculas. Los resultados muestran en primer término la disminución de la actividad específica en función del tiempo, de cada macromolécula premarcada con $|^3\text{H}|$ timidina, $|^3\text{H}|$ uridina y $\text{L}|^3\text{H}|$ leucina, en ausencia de inhibidor. La disminución varió según el precursor. Al cabo de tres horas de incubación, la radiactividad de los epimastigotes marcados con $|^3\text{H}|$ timidina (Figura 32) y $\text{L}|^3\text{H}|$ leucina (Figura 34) disminuyó menos del 5% del valor inicial, mientras que con $|^3\text{H}|$ uridina (Figura 33) la disminución fue de aproximadamente 25% del valor inicial. La adición de nifurtimox y benznidazol, aumentó en todos los casos, la disminución de la actividad específica de la macromolécula correspondiente. Según las Figuras 32 y 34, el nifurtimox estimuló más que el benznidazol la disminución de radiactividad del DNA o de las proteínas celulares, cualquiera que fuesen las concentraciones utilizadas. En cambio, en la Figura 33 se muestra que el RNA fue afectado por ambas drogas con igual intensidad (concentraciones altas) y con mayor intensidad por el benzni-

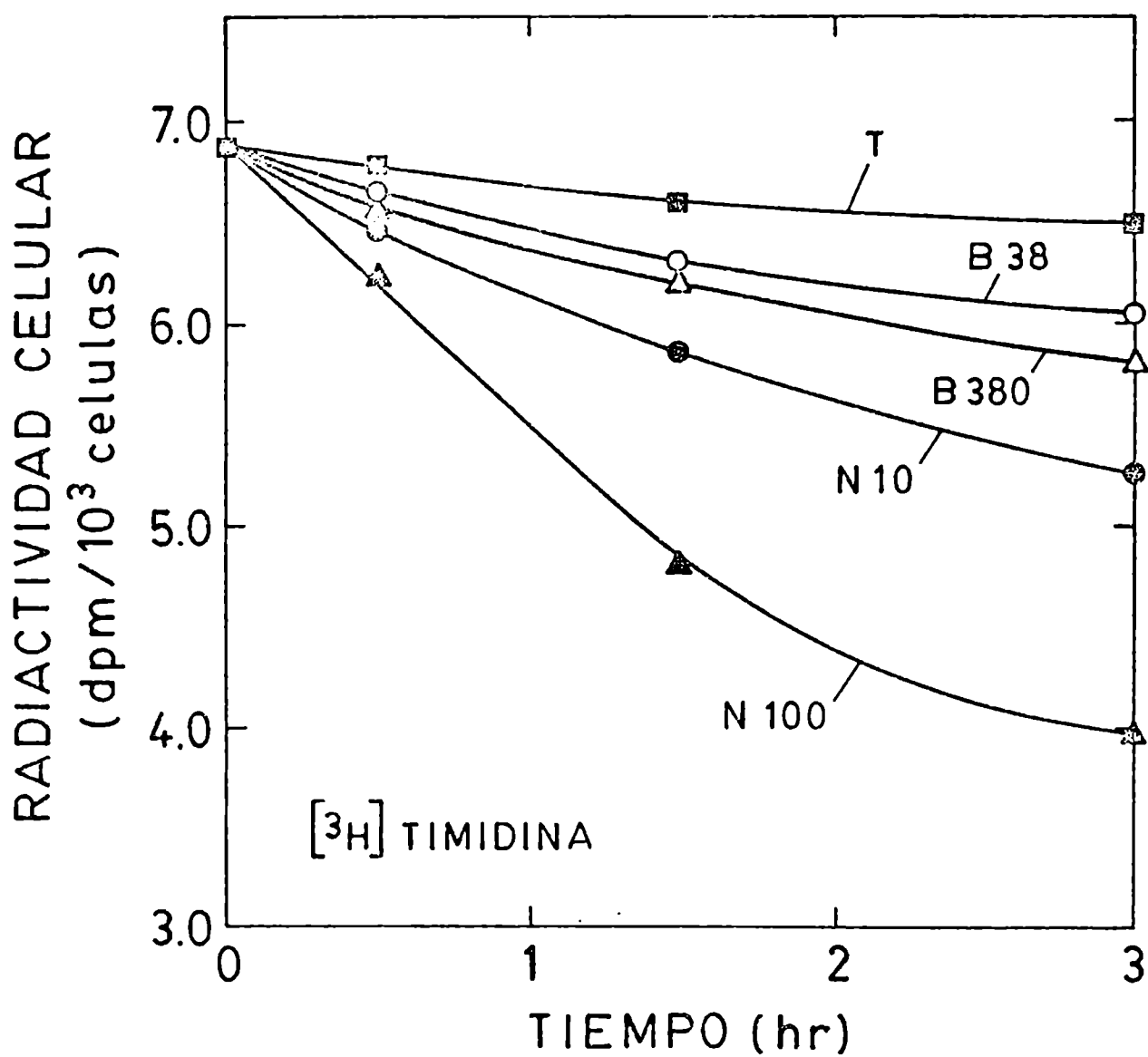


Fig. 32. Efecto del nifurtimox sobre la estabilidad del DNA del *T. cruzi*. Los epimastigotes preincubados con [³H]timidina se incubaron con nifurtimox (N) y benznidazol (B) durante el tiempo indicado en la abscisa. Las condiciones experimentales se describen en el texto. T, muestra testigo. Los números indican la concentración de la droga (μM).

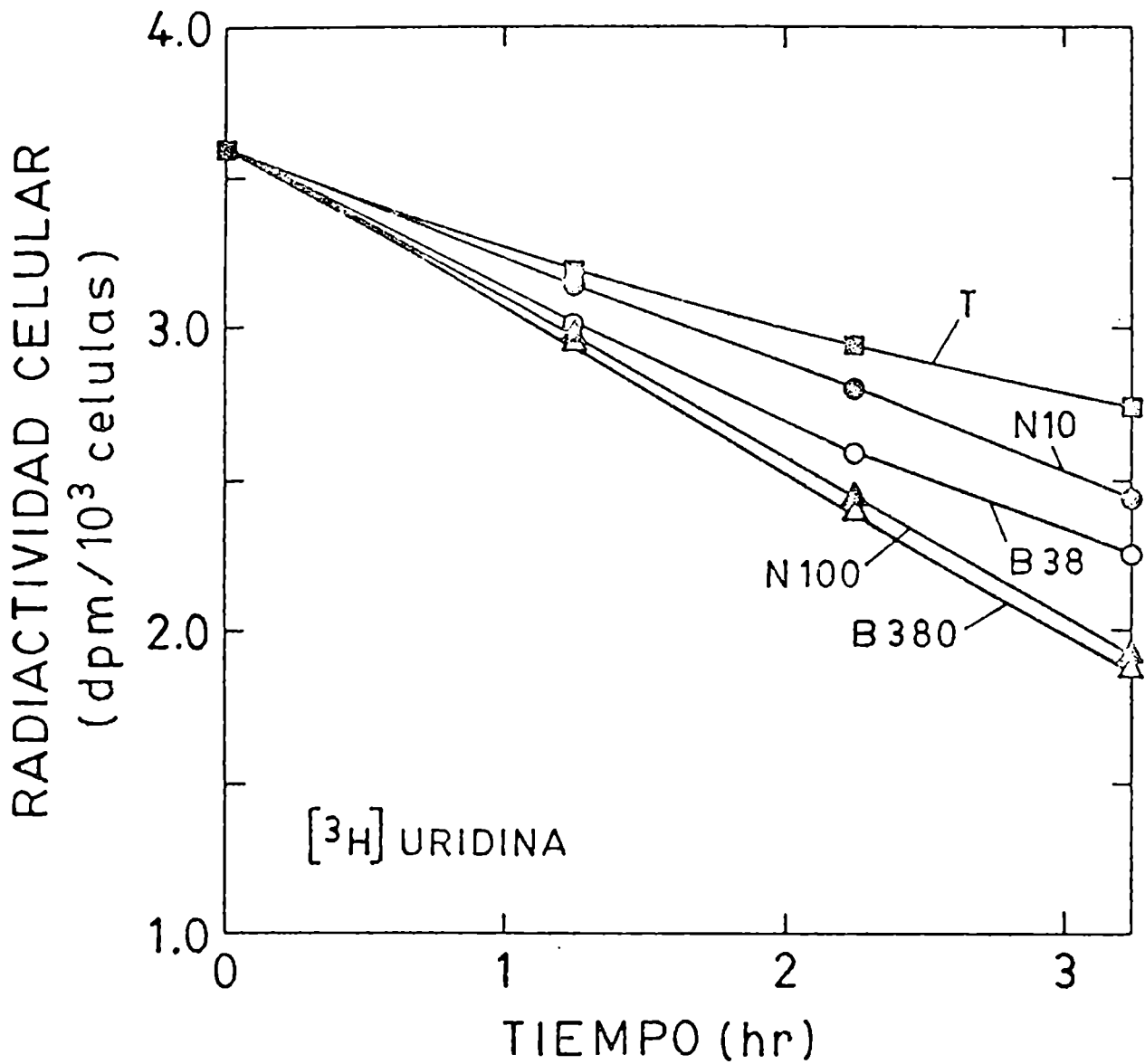


Fig. 33. Efecto del nifurtimox y el benznidazol sobre la estabilidad del RNA del *T. cruzi*. Los epimastigotes preincubados con ³H|timidina se incubaron con nifurtimox (N) y benznidazol (B) durante el tiempo indicado en la abscisa. Las condiciones experimentales se describen en el texto. Los números indican la concentración de droga (μ M).

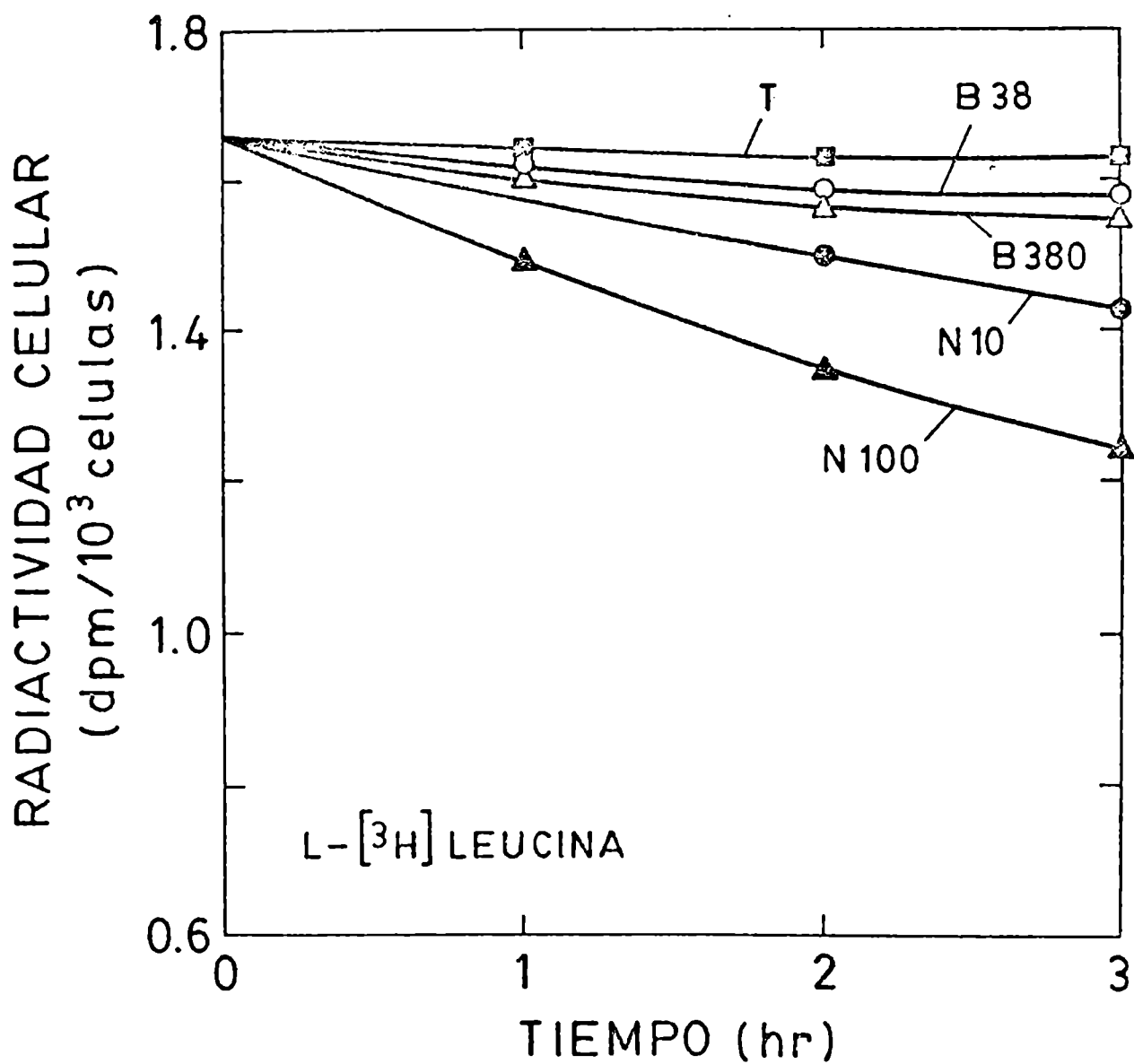


Fig. 34. Efecto del nifurtimox y benznidazol sobre la estabilidad de los componentes proteicos en el *T. cruzi*. Los epimastigotes preincubados con L- ^{3}H leucina, se incubaron con nifurtimox (N) y benznidazol (B) durante el tiempo indicado en la abscisa. Las condiciones experimentales se describen en el texto. Los números indican la concentración de las drogas (μM).

dazol (concentraciones bajas). Dado que en el T. cruzi el nifurtimox genera radicales libres del oxígeno, para verificar el papel de estos radicales en los efectos observados, se ensayó la β lapachona, cuya actividad como generador de "oxígeno activo" es bien conocida. Los resultados en la Figura 35 indican un fuerte efecto sobre la estabilidad del DNA, dependiente de la concentración de la β lapachona. La comparación de las Figuras 32 y 35 demuestra que la β lapachona fue más activa que el nifurtimox y benznidazol. Resultados similares se obtuvieron con epimastigotes marcados con ^3H uridina y ^3H leucina (Figuras 36-37).

Para obtener una expresión cuantitativa de la disminución de la radiactividad celular, los valores presentados en las Figuras 32-37 se aplicaron a la ecuación 1, donde A_0 y A_t son la radiactividad inicial

$$\log A_t = -0.693 k \log A_0 \quad \text{ecuación 1}$$

de los epimastigotes (al tiempo 0) y la radiactividad después de incubar con la droga durante el tiempo t . k es una constante cinética cuyo valor se obtiene de la representación gráfica de la ecuación 1, que es la ecuación de una recta, cuya pendiente negativa es igual a $-0.693 k$. Cuando la radiactividad al tiempo t es igual a la mitad de la radiactividad inicial ($A_t = 0.5 A_0$), el tiempo de incubación ($t_{0.5}$) es igual a $0.693 k$ y representa la vida media de la macromolécula. $t_{0.5}$ es la inversa de la velocidad de recam-

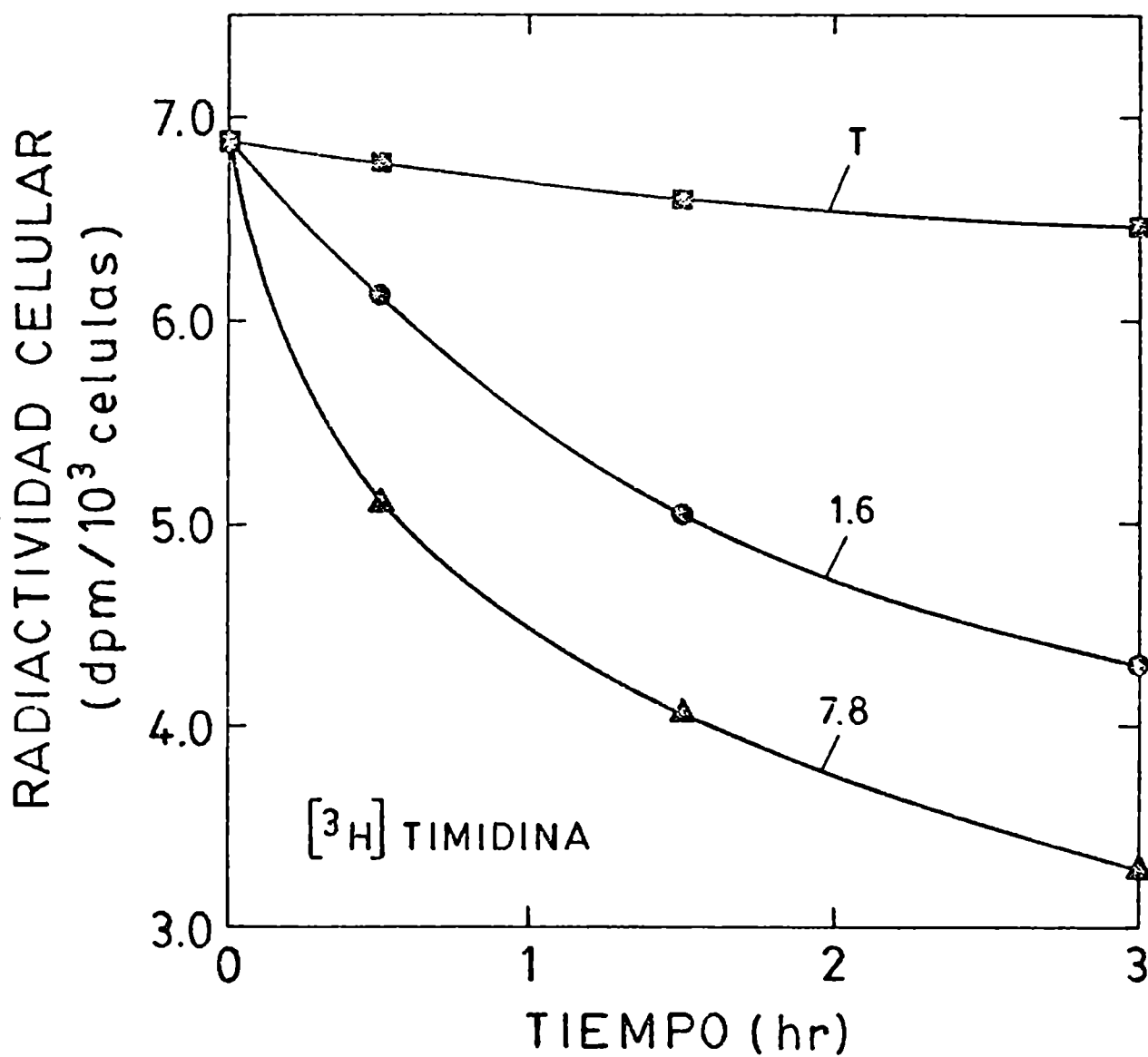


Fig. 35. Efecto de la blapachona sobre la estabilidad del DNA del *T. cruzi*. Los epimastigotes preincubados con [³H]timidina se incubaron con blapachona durante el tiempo indicado en la abscisa. Las condiciones experimentales se describen en el texto. Los números indican la concentración de droga (μM).

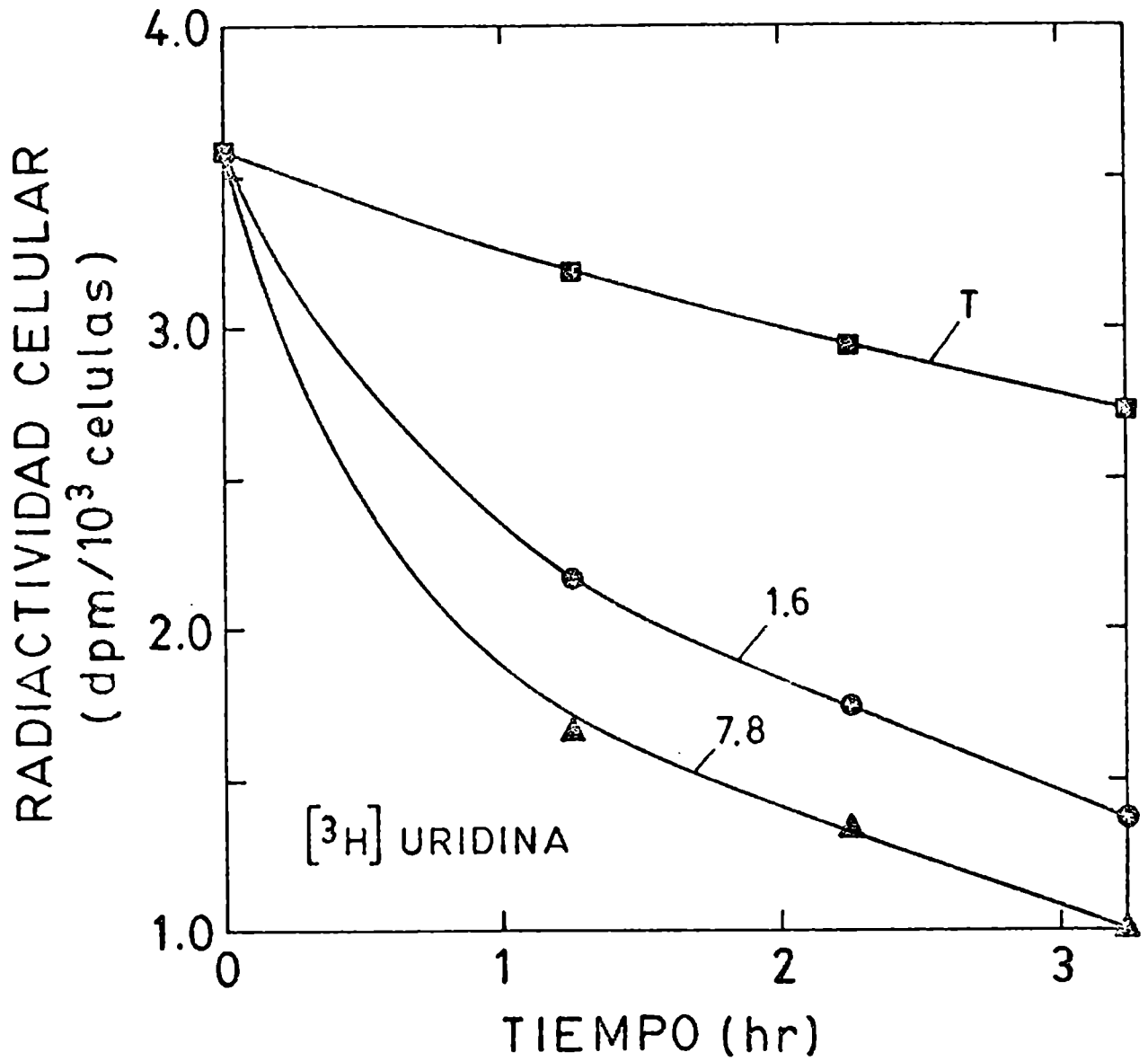


Fig. 36. Efecto de la βlapachona sobre la estabilidad del RNA del *T. cruzi*. Los epimastigotes preincubados con ^3H uridina, se incubaron con la βlapachona durante el tiempo indicado en la abscisa. Las condiciones experimentales se describen en el texto. Los números indican la concentración de la droga (μM).

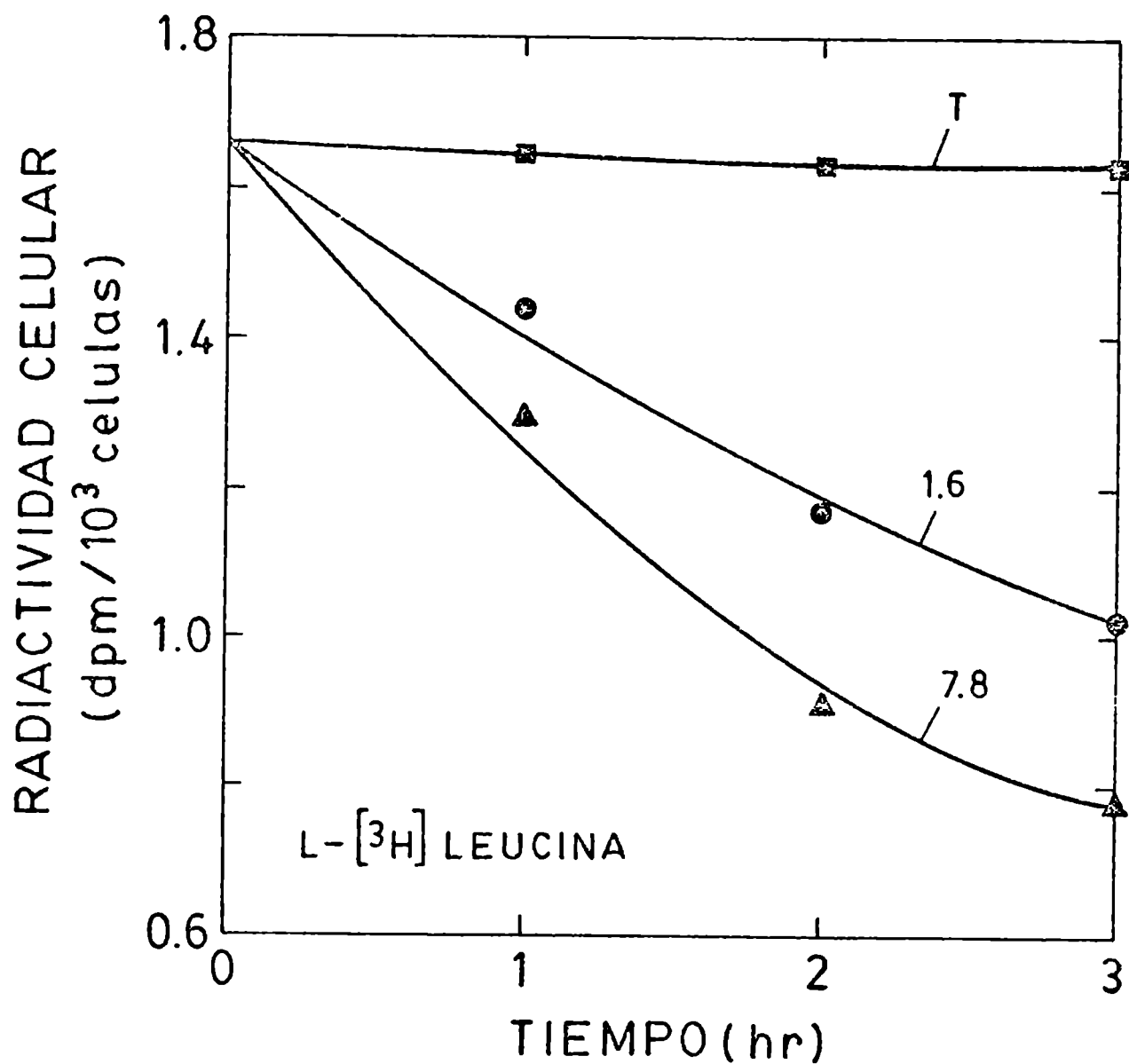


Fig. 37. Efecto de la β lapachona sobre la estabilidad de los componentes proteicos del *T. cruzi*. Los epimastigotes preincubados con L-[³H]leucina se incubaron con la β lapachona el tiempo indicado en la abscisa. Las condiciones experimentales se describen en el texto. Los números indican la concentración de la droga (μ M)

bio metabólico, de manera que cuanto menor es la "vida media" más rápida es la renovación, "turnover" molecular,

La Figura 38 muestra la representación de los datos experimentales primarios según la ecuación 2. Se puede ver que la decadencia natural de las macromoléculas dió en todos los casos rectas, con pendiente de mayor valor en el caso de la ^3H uridina. Lo mismo ocurrió con el benznidazol que incrementó el valor negativo de las pendientes. En cambio, con el nifurtimox se obtuvieron curvas ligeramente hiperbólicas, cóncavas hacia arriba excepto con la ^3H uridina que originó una recta. La β lapachona, produjo los efectos más intensos y dió siempre, curvas polifásicas.

La Tabla 12 muestra el efecto del nifurtimox, el benznidazol y la β lapachona sobre la "vida media" de cada una de las especies moleculares. En todos los casos hubo disminución, pero con modalidades diferentes. Una expresión directa de esas modificaciones, se obtuvo mediante el cociente T/D (T y D son la vida media de la macromolécula en los epimastigotes testigos y en los tratados con las drogas, respectivamente). Conviene notar que cuando $T/D = 1$, no hay modificación en la "vida media". Los valores de T/D en la Tabla 12 (entre paréntesis) prueban que el nifurtimox afectó la estabilidad del DNA mucho más que la de las proteínas y la del RNA, mientras el benznidazol produjo en todos los casos efectos significativamente menores. Por su parte, la β lapachona estimuló fuertemente la degradación del DNA y de las proteínas, y en grado menor la del RNA. En ese sentido, la β lapachona superó siempre al nifurtimox y al benznidazol, mientras

que el nifurtimox superó al benznidazol, excepto sobre el RNA. Los resultados con β lapachona se refieren al componente inicial de la curva de degradación, que es el más rápido. Si se calculan los valores correspondientes al componente lento, también se nota un incremento respecto al testigo, pero significativamente menor que con el primer componente (valores omitidos).

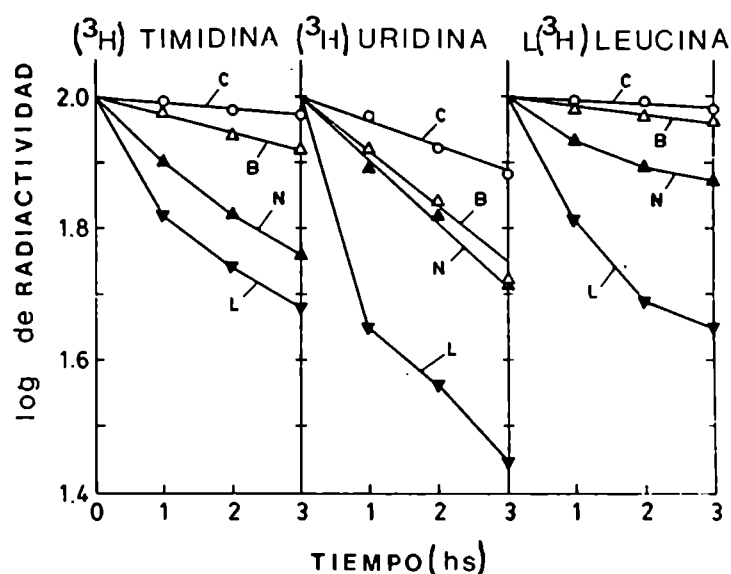


Fig. 38. Representación logarítmica del efecto del nifurtimox, benznidazol y β lapachona sobre la disminución de la radiactividad de los epimastigotes preincubados con $|^3\text{H}|$ timidina, $|^3\text{H}|$ uridina y L $|^3\text{H}|$ leucina. Las concentraciones (μM), fueron nifurtimox, 100; benznidazol, 380; β lapachona, 7.8. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

T A B L A XII

EFFECTO DEL NIFURTIMOX, BENZNIDAZOL Y β LAPACHONA SOBRE LA VIDA MEDIA DEL DNA, RNA Y PROTEINAS DEL
T. CRUZI

Macromolécula	Nifurtimox		Benznidazol		β lapachona	
	Concentración (μ M)	Vida media (h)	Concentración (μ M)	Vida media (h)	Concentración (μ M)	Vida media (h)
DNA	0	30.1	0	30.1	0	30.1
	10	6.3 (4.8)	38	15.0 (2.0)	1.6	3.0 (10.1)
	100	3.8 (7.9)	380	10.0 (3.0)	7.8	1.7 (17.7)
RNA	0	7.5	0	7.5	0	7.5
	10	6.0 (1.2)	38	4.3 (1.7)	1.6	1.4 (5.3)
	100	3.3 (2.2)	380	3.3 (2.3)	7.8	0.9 (8.3)
Proteínas	0	30.1	0	30.1	0	30.1
	10	15.0 (2.0)	38	30.0 (1.0)	1.6	2.7 (11.1)
	100	7.5 (4.0)	380	15.0 (2.0)	7.8	1.7 (17.7)

Las condiciones experimentales se describen en el texto.
 Entre paréntesis, la relación T/D.

DISCUSSION

Efecto del nifurtimox y benznidazol sobre los ácidos nucleicos "in vitro".

Inducción de rupturas en el DNA

Los resultados presentados muestran que el nifurtimox y el benznidazol metabolizados por la fracción microsomal de hígado de rata y de T. cruzi, inducen lesiones en el DNA. Para detectar las rupturas en las cadenas del DNA se usó como modelo el DNA del plásmido pBR325 que es covalentemente cerrado y superenrollado (Forma I). Cuando a este DNA se le introducen rupturas en una de las cadenas (Forma II) o en las dos cadenas (Forma linear L), se relaja y cambia la movilidad electroforética (Korycka Dahl y col., 1980). El tratamiento del DNA del pBR325 con benznidazol y nifurtimox indujo rupturas en las cadenas del plásmido que se tradujo en el aumento de las formas II y L. La degradación del DNA fue dependiente de la presencia de un sistema metabolizante de las drogas. Este requisito se cumplió con microsomas de hígado de rata o de T. cruzi en presencia de un sistema generador de NADPH. Docampo y col. (1981a, 1982) demostraron que la adición de nifurtimox o benznidazol a microsomas de hígado de rata produce los radicales aniónicos nitroaromáticos respectivos, los cuales al reoxidarse al compuesto original, generan productos de la reducción parcial del oxígeno, O_2^- y H_2O_2 . La interacción entre O_2^- y H_2O_2 , en presencia de iones metálicos (reacción de Haber Weiss, 1934), forma los radicales OH^{\cdot} a los que se les asigna un papel importante como iniciadores de reacciones en cadena que llevan a la peroxidación lipídica y la degradación del DNA

(Que y col., 1980 ; Meneghini, 1976; Misra y col., 1972).

La producción de estos intermediarios en la reducción de los nitroderivados por la fracción microsomal de hígado de rata, llevaron a la producción de rupturas en el DNA del pBR325. Sin embargo, la toxicidad selectiva del benznidazol contra el T. cruzi, no involucra el O_2^- , H_2O_2 ni al OH^\cdot , si no a algún metabolito mismo del benznidazol. La activación del compuesto por la fracción microsomal del T. cruzi produce el radical aniónico que podría interactuar con el DNA y/o proteínas directamente o previa reducción a otra especie activa, como ocurre con otro 5-nitroimidazol, el metronidazol (Mason y col., 1975; Knight, y col., 1979). El o los intermediarios responsables de esta reacción son todavía desconocidos, se postula que tienen un estado de oxidación intermedio entre el nitro y la amina (Halliwell, 1976; Koppenoe y col., 1977). La mayoría de los autores piensa que el metabolito activo es la hidroxilamina, el producto de reducción de 4 electrones (Ilan y col., 1977). En este sentido es interesante agregar que la reducción de los nitrocompuestos que tuvo lugar en el medio de incubación, causó rupturas al DNA del pBR325 contenido dentro de una bolsa diálisis, como si los intermediarios activos de los nitroderivados, ya sea el H_2O_2 o compuestos de estado de oxidación intermedio entre el radical nitro y la amina, fueran capaces de por lo menos, limitada difusión. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Olive (en prensa) con un modelo de tumor "in vitro" que contiene células hipóxicas y oxigenadas, donde se sugiere que la reducción de los nitroheterociclos por

las células hipóxicas causa la muerte de las células oxigenadas adyacentes.

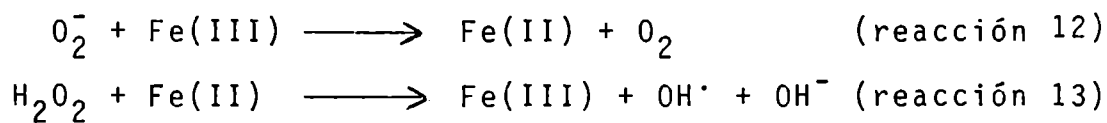
Relación entre peroxidación lipídica, lesiones en el DNA y contenido hepático de glutati6n reducido.

La peroxidaci6n de 6cidos grasos poliinsaturados y la inducci6n de lesiones en el DNA, son dos procesos dependientes de los radicales libres ligados al anion super6xido. El nifurtimox y el benznidazol aumentaron la peroxidaci6n lipídica y las rupturas en el DNA medidas como el malondialdehído derivado a) de los 6cidos grasos insaturados y b) de los carbonos 1'-3' de la desoxirribosa del DNA, en homogenatos de hígado de rata. Este aumento se correlacion6 inversamente con el contenido hepático de GSH, medido en la misma muestra. Estudios realizados "in vivo" por Dubín y col., (1982) muestran una depleci6n del nivel de GSH hepático en ratas tratadas con nifurtimox, pero no observan diferencias en el contenido de conjugados dienos. Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran claramente que la disminuci6n de GSH se asoci6 a un aumento paralelo de conjugados dienos medidos por la formaci6n del aducto coloreado MDA-TBA. Ambas drogas disminuyeron el contenido de GSH de distinta manera. Con el nifurtimox el nivel de GSH se hizo no dosable a los 150 min. mientras que el benznidazol aùn en concentraciones muy altas, 4000 µM, s6lo lleg6 a disminuirlo en un 56%. La dr6stica depleci6n de GSH se asoci6 a la mayor citotoxicidad del nifurtimox con respecto al benznidazol como gene-

rador de radicales libres del oxígeno. Estos resultados están de acuerdo con el rol protector que se le asigna al GSH como removedor de hidroperóxidos y de peróxido de hidrógeno (Sies y col., 1978; Dubin y col., 1982). Se observó estimulación de la peroxidación lipídica por el nifurtimox en forma dependiente de la concentración, y del tiempo de incubación. El benznidazol incrementó el MDA proveniente de la peroxidación lipídica con la mayor concentración empleada. En los dos casos el MDA sólo aumentó luego de la disminución del GSH hepático. La diferencia entre los resultados "in vivo" e "in vitro", puede deberse a que en el presente estudio se usó un modelo experimental diferente y a que "in vivo" opera un eficiente mecanismo de metabolización de hidroperóxidos.

La disminución de GSH hepático se acompañó de un aumento paralelo de MDA proveniente de la desoxirribosa del DNA. El daño al DNA fue una reacción rápida ya que el MDA proveniente de esa macromolécula aumentó a los 15 min de comenzada la reacción, aún antes del aumento de la peroxidación lipídica. La toxicidad de los nitroderivados generalmente se atribuye a los radicales libres generados durante el ciclo redox de la droga. El H_2O_2 y el O_2^- producidos durante la reducción del nifurtimox y benznidazol por homogenatos de hígado de rata estuvieron involucrados en la producción de lesiones en el DNA, el agregado de SOD o catalasa al medio de reacción, impidió la formación de MDA derivado del DNA, sugiriendo que el O_2^- y H_2O_2 son intermediarios

en esta reacción. Los resultados obtenidos también indican que el anión superóxido mismo no es la especie reactiva, de otro modo la degradación del DNA debería haberse prevenido por la SOD pero no por la catalasa. De todos los derivados de la reducción parcial del oxígeno, ¿Cuál es la especie involucrada en la producción de rupturas en el DNA?. El manitol y benzoato, dos secuestrantes de los radicales libres OH·, protegieron al DNA sugiriendo que el OH· es la especie primaria causante de las lesiones. Este radical se puede formar por interacción entre O_2^- y H_2O_2 en presencia de hierro (reacción de Haber Weiss, 1934). Aparentemente esta reacción es lenta. Se conocen otros pasos que requieren O_2^- y H_2O_2 y Fe (III) (Halliwell, 1976) que también llevan a la producción de OH·, de la siguiente forma:



Estas reacciones son más rápidas y también ocurren en el sistema xantina-xantinoxidasa (Fong y col., 1976). La bleomicina causa lesiones en el DNA que llevan a la liberación de oligonucleótidos, bases libres y malondialdehído que reacciona con el TBA dando el aducto coloreado característico. Las lesiones dependen de la presencia de O_2 y Fe(II) y de la formación de OH· durante al autooxidación del Fe(II) (Burger y col., 1979b).

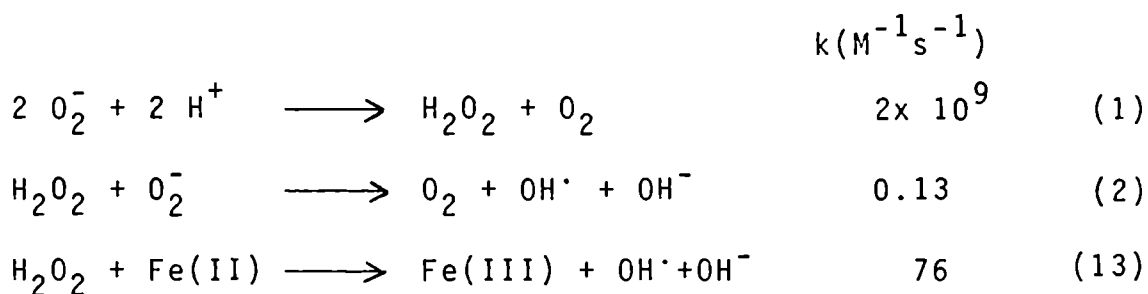
Es importante señalar que la cantidad de anión superóxido y peróxido de hidrógeno generado "in vivo" por el benzimidazol, no sobrepasa los niveles basales, mientras que el ni-

nifurtimox por el contrario, es responsable de alteraciones ultraestructurales en cerebro, testículo, riñón e hígado (Moreno y col., 1980). En estos tejidos, se encontró una elevada producción de O_2^- cuando se los incubaba con nifurtimox. La peroxidación lipídica y la degradación del DNA iniciada por los radicales libres generados a través del ciclo redox del nitrofurano, pueden constituir dos mecanismos para explicar el daño en los tejidos del huésped.

Efecto del nifurtimox y benznidazol sobre los ácidos nucleicos del *T. cruzi* "in vivo"

Al igual que en investigaciones previas que adjudican a los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno y a los nitroderivados el papel de productores de rupturas en las cadenas del DNA, encontramos que el nifurtimox y benznidazol causaron lesiones en el DNA del *T. cruzi* "in vivo". A los efectos de comparación, se usó otro compuesto tripanocida de estructura química diferente a los anteriores, la β lapachona. Este compuesto es una quinona que también es fuente de O_2^- y H_2O_2 en el *T. cruzi*, como el nifurtimox (Boveris y col., 1977a). Las tres drogas introdujeron lesiones en el DNA del parásito, que se extendieron al nDNA y al kDNA. El nDNA fue extensamente degradado por el nifurtimox y la β lapachona. El incremento de las rupturas dependió directamente de la concentración de los generadores de productos de la reducción parcial del oxígeno. Se encontró una buena correlación entre el número de rupturas/ 10^6 nucleótidos en el nDNA producidos por el nifurtimox y la β lapachona

con respecto al benznidazol, teniendo en cuenta el metabolismo diferente de estas drogas en el T.cruzi. El radical aniónico de la estreptonigrina, un antibiótico con estructura aminoquinónica, genera O_2^- (Bachur y col., 1978) al igual que otros citostáticos que contienen estructura semiquinona y que son reducidos por el sistema microsomal NADPH dependiente. Estos agentes anticancerosos actúan como productores de: a) radicales libres que se intercalan en el DNA para la producción de lesiones (Bachur y col., 1979) o b) aumentan el nivel de O_2^- y H_2O_2 durante la reoxidación del compuesto (Goodman y col., 1977). El H_2O_2 y el O_2^- dan lugar a la formación de OH^\cdot según las siguientes reacciones:



Los productos de la ruptura del DNA a partir de reacciones que contienen Fe(II) y H_2O_2 (reacción de Fenton) no son distinguibles de los obtenidos en reacciones con compuestos de distinta naturaleza química pero que generan O_2^- y H_2O_2 y en consecuencia OH^\cdot , como la adriamicina, bleomicina, rifamicina, mitomicina C (Yger y col., 1963; Burger y col., 1980; Sausville y col., 1978; Berlin y col., 1981). La degradación del DNA por la β lapachona y nifurtimox parece

similar a la degradación por los otros agentes antitumorales en que todos dependen de la formación del radical OH^\cdot . El OH^\cdot es un poderoso agente oxidante que: a) introduce rupturas en una de las cadenas del DNA por abstracción de un átomo de hidrógeno de la desoxirribosa, que lleva a la desestabilización del enlace fosfodiéster adyacente (Repine y col., 1981) y b) origina malondialdehído a partir de los carbonos 1'-3' de la desoxirribosa (Burger y col., 1980). El número de rupturas/ 10^6 nucleótidos hallado para el nifurtimox y la β lapachona concuerdan con los hallados en la literatura para drogas productoras de O_2^- y H_2O_2 (Berlin y col., 1981).

El benznidazol por otro lado, no aumenta la concentración intracelular de los productos de la reducción parcial del oxígeno en el T. cruzi (Moreno y col., 1982). A pesar de ello, también se detectaron rupturas en una de las cadenas del nDNA al igual que en el DNA del pBR325. El mecanismo de acción en el parásito implicaría la formación de algún metabolito reducido del nitroimidazol. Se ha demostrado la presencia de aductos nitroderivado-DNA en bacterias (Sugimura y col., 1976; Tanaka y col., 1977), el intermediario activo es el metabolito reducido del nitrocompuesto, el cual se une fuertemente al DNA. Todos estos compuestos al igual que el benznidazol, producen rupturas en una de las cadenas del DNA (Lu y col., 1979; Albertini y col., 1982).

Las lesiones en el kDNA se visualizaron de 2 maneras

1) como un aumento de DNA de cadena simple que no renaturalizó luego de un tratamiento alcalino y quedó retenido en filtros de nitrocelulosa y 2) como el aumento de fragmentos de kDNA de bajo peso molecular detectados por electroforesis en geles alcalinos de agarosa. Con ambos métodos se encontró que el nifurtimox, benznidazol y β lapachona indujeron rupturas en el kDNA. La estructura en forma de malla del DNA de T. cruzi compuesta por maxi y minicírculos concatenados, se asimiló al DNA covalentemente cerrado del \emptyset X 174 RFI. Cuando se introducen rupturas en una de las cadenas del \emptyset X 174, se lo desnaturaliza y renaturaliza rápidamente en condiciones no muy estrictas, el DNA con rupturas no renaturaliza y queda como DNA de una cadena, el cual puede unirse a filtros de nitrocelulosa que retienen específicamente el DNA de una cadena pero no al duplex (Center y col., 1970). El aumento del porcentaje de retención de DNA de cadena simple hallado en los kDNAs tratados con las drogas tripanocidas con respecto al control, indica que estos compuestos indujeron lesiones en el kDNA. Nuevamente el nifurtimox y la β lapachona causaron más rupturas que el benznidazol. Usando geles alcalinos de agarosa, se encontró aumento de fragmentos de bajo peso molecular en los kDNAs provenientes de parásitos tratados con las drogas. Es llamativo que no se hallan encontrado fragmentos de peso molecular intermedio entre la malla de DNA y los fragmentos chicos. Probablemente, debido a la estructura misma del kDNA, en el

tiempo de incubación sólo los círculos ubicados en la periferia de la malla fueron accesibles a los productos tóxicos. Sims y Gutteridge (1978), usando gradientes de CsCl no encontraron diferencia en la densidad ($\delta=1.6988$ g/ml) del kDNA de T. cruzi tratado durante 6 horas con el nitrofurano SQ 18506, tampoco observaron cambios en la apariencia de la malla al microscopio electrónico. Ninguna de las tres drogas se metaboliza a ni espor si misma un agente alquilante del DNA. No se obtuvieron modificaciones significativas en la velocidad de depurinización en el kDNA proveniente de epimastigotes tratados con nifurtimox, benznidazol o β lapachona, o sea que la metilación del DNA no se afectó.

La formación intracelular de O_2^- y H_2O_2 puede considerarse como la causa de la toxicidad del nifurtimox y la β lapachona en el T. cruzi, donde la ausencia de catalasa y glutatión peroxidasa H_2O_2 -dependiente, así como la baja actividad de la ascorbato peroxidasa (Boveris y col., 1980), hace a los epimastigotes de T. cruzi particularmente sensibles al H_2O_2 . La deficiencia de estas enzimas explica el aumento de H_2O_2 por las drogas tripanocidas. La producción de rupturas en el DNA por el nifurtimox y la β lapachona "in vivo" podría explicarse de dos maneras: a) estos compuestos debido a su estructura química podrían unirse o intercalarse en el DNA y generar radicales OH^\cdot en la vecindad de las uniones susceptibles de rupturas, lo que resulta en la degradación del DNA o b) el H_2O_2 generada a través del ciclo redox de la droga

difundiría al núcleo (Meneghini, 1976) donde reaccionaría con Fe(II) o algún complejo metal-macromolécula para generar OH[·], principal causante de lesiones en el DNA. Floyd (1981) demostró que el DNA se une al Fe(II) de manera tal que cuando se agrega H₂O₂, aumenta la concentración de OH[·] detectable por resonancia de spin electrónico. En cambio el benznidazol, reducido por el T. cruzi interactuaría con el DNA al cual se uniría fuertemente induciendo rupturas en una de las cadenas.

Reparación de las rupturas inducidas por el nifurtimox, benznidazol y βlapachona en el DNA del T. cruzi.

La reparación del DNA puede usarse como un método indirecto para detectar lesiones en el DNA (Lett y col., 1967). Los mecanismos de reparación, generalmente involucran, en algún paso del proceso, rupturas en las cadenas. Por lo tanto, la medición de las rupturas en el DNA luego de un tiempo de incubación en ausencia de la droga, da información sobre la capacidad de un organismo para recuperarse. El tripanosoma puede reparar las rupturas inducidas por el nifurtimox, benznidazol y βlapachona. Este proceso se observó en el nDNA y kDNA para las tres drogas. En contraste con estos resultados no se encontró una eliminación total de las rupturas luego del tratamiento con βlapachona 7.8 μM. La razón de esta diferencia no es clara aunque no puede descartarse que con esa concentración, la

magnitud de las lesiones fuese tal que el daño sea irreversible. Una persistencia similar en el número de rupturas se encontró en células de gliosarcoma de ratón luego de la exposición "in vivo" al 1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea (CCNU) (Gutin y col., 1977). Nordenskjold y col., (1979) tampoco observaron eliminación total de las rupturas luego del tratamiento de fibroblastos humanos con ciclofosfamida.

Los organismos eucariotas y procariotas responden de manera diferente para reparar el daño producido en el DNA. En los primeros el sistema de reparación es inducible (funciones -SOS)(Little, 1982; Little y col., 1980) y en el segundo es constitutivo. Este hecho se refleja en las curvas dosis-respuesta para la frecuencia de mutación, que son acumulativas en E. coli (Radman y col., 1977) y lineares en eucariotas (Thacker y col., 1975; Van Zeeland y col., 1976). Se ha demostrado que las células eucariotas pueden desarrollar procesos bioquímicos similares al proceso de reparación por radiación en microorganismos. Estos incluyen a) la re-uni6n de las rupturas causadas por radiaciones ionizantes en una de las cadenas del DNA (Lett y col., 1967) b) la escisi6n de los d6meros de pirimidina luego de la irradiaci6n con luz U.V. (Regan y col., 1968) y c) la inserci6n de bases en las cadenas molde de DNA (reparaci6n replicativa) luego del tratamiento con alg6n compuesto qu6mico, irradiaci6n con luz U.V. (Painter y col., 1967) o rayos X (Rasmussen y col., 1966; Cleaver y col., 1968). Uno de los m6todos m6s sensibles para medir reparaci6n como consecuencia

de la interacción del DNA con un compuesto o radiaciones es la medida de la "síntesis no programada de DNA". Este método se basa en la incorporación de ^3H timidina al DNA en células arrestadas en la fase S (Trostko y col., 1974). Para medir "síntesis no programada de DNA" en el T. cruzi, fue necesario primero disminuir la síntesis semiconservativa del DNA, evitando de ese modo la incorporación de ^3H timidina debida a la duplicación de la macromolécula. Se estudió el efecto de 4 compuestos que inhiben la síntesis de DNA de forma diferente: hidroxiaurea, fluorodeoxiuridina, cicloheximida y cafeína. Los dos primeros disminuyen la síntesis de los nucleósidos trifosfato (Figura 39) (Adams y col., 1967; Young y col., 1967) la cicloheximida inhibe la síntesis de DNA y de proteínas (Cleaver, 1969) y la cafeína inhibe las enzimas involucradas en la síntesis (Cleaver, 1969).

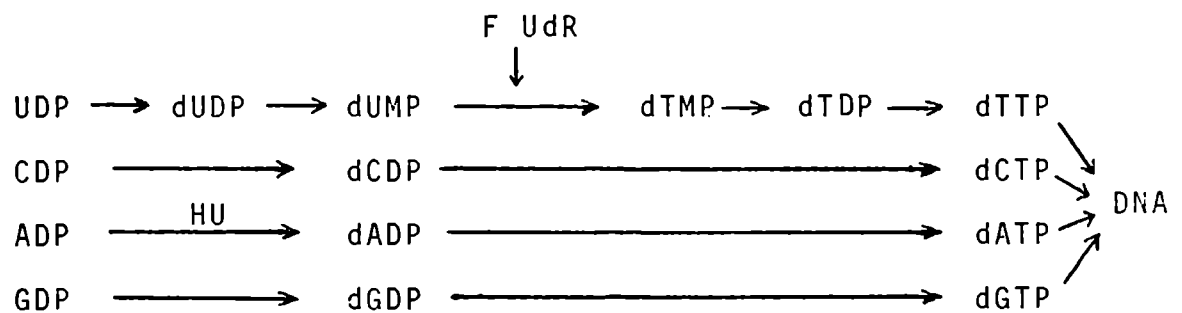


Fig. 39. Inhibición de la síntesis de DNA por 5-Fluor-deoxiuridina, F Udr, hidroxiaurea, HU.

La hidroxiaurea y la fluordeoxiuridina inhibieron la síntesis de DNA, pero no afectaron la reparación replicativa. Se observó un aumento de la actividad específica del DNA de T. cruzi, luego de la exposición a las drogas tripanocidas. Estos compuestos reducen el suministro de precursores para la síntesis de DNA (Regan y col., 1968; Cleaver, 1969), sin embargo no parecen alterar la disponibilidad de precursores para la reparación replicativa. La hidroxiaurea al igual que la fluordeoxiuridina, son inhibidores de la síntesis semiconservativa de DNA (Young y col., 1964) y no tienen acción sobre el proceso de reparación y replicación (Trostko y col., 1974) o reparación replicativa (Cleaver, 1969). La hidroxiaurea es el compuesto que asociado a un inhibidor de la síntesis de proteínas, se usa para disminuir la síntesis semiconservativa de DNA y permitir la medición de "síntesis no programada de DNA" (Martin y col., 1978). La cafeína no tuvo efecto sobre la replicación. Este compuesto reduce la supervivencia de bacterias (Rauth, 1967) y de células L de ratón (Harm, 1967) irradiadas con luz U.V., estas observaciones llevaron a postular la existencia de un mecanismo de reparación cafeína-sensible. Con respecto a la cicloheximida, se encontró una correlación entre la síntesis de proteínas y la replicación semiconservativa de DNA. Estos resultados concuerdan con los de Weintraub y Holtzer (1972) y Schneiderman y col.(1971). En general se observó que cuando los inhibidores limitan la disponibilidad de precursores para la síntesis de DNA,

como la hidroxiaurea y fluorodeoxiuridina, hubo inhibición en la replicación semiconservativa pero no en la reparación replicativa. La reparación replicativa es inhibida principalmente por agentes que se unen al DNA como la cafeína (Rauth, 1967).

En el T. cruzi fue posible inducir "síntesis no programada de DNA". La inducción fue una respuesta del parásito a las lesiones causadas por el nifurtimox, benznidazol y βlapachona. Con el objeto de discriminar el efecto de las drogas tripanocidas sobre la síntesis semiconservativa de DNA de la reparación replicativa, se inhibió el primer proceso con hidroxiaurea y cicloheximida. La detección de "síntesis no programada de DNA" está a favor de la existencia de un mecanismo de reparación en los parásitos. El proceso se observó aún luego de la exposición de los epimastigotes a la cicloheximida durante 16 horas, estos resultados son consistentes con los de Gaustchi y col. (1973) y Trotsko y Yager (1974) en el sentido que las enzimas necesarias para este tipo de reparación tendrían una vida media relativamente larga. Al igual que en otras células eucariotas (Gaustchi y col., 1973) la reparación del DNA no está afectada por la inhibición en la síntesis de DNA ni de proteínas. Un hecho importante es que el método de "síntesis no programada de DNA" mide la reparación inducida a) por radiaciones y b) por compuestos que se unen al DNA y forman aductos, que luego son removidos en el proceso de escisión y reparación dentro de la célula (Martin

y col., 1978). Wentzel encontró aductos nitrofurano DNA en bacterias tratadas con 2-(2-fenil)-3-(5-nitro-2-fenil)acrilamida y con(2 amino)-4-(5-nitro-2-fenil)-tiazol, estos aductos se remueven en bacterias uvr^+ (Wentzel y col., 1982). Los resultados obtenidos están a favor de la existencia del aducto benznidazol-DNA, el cual es reemplazado en el proceso de escisión y reparación dando lugar a la incorporación de 3H timidina en los parásitos arrestados en la fase S. La metabolización del nifurtimox y β lapachona en el T. cruzi da lugar a la formación de OH^\cdot , mimético de radiaciones ionizantes. Entre las lesiones que causa este radical se incluyen la degradación de las bases y el aumento del MDA proveniente de los C 1'-3' de la desoxirribosa, que son sustituidas durante la reparación. Si bien la reparación replicativa es un mecanismo importante para la recuperación del parásito del daño causado por radiaciones o compuestos químicos, se debe tener en cuenta que la reparación observada, no implica necesariamente un mecanismo eficiente para el tripanosoma. A pesar de que el parásito cuenta con sistemas adecuados para eliminar las lesiones causadas por el nifurtimox, benznidazol y β lapachona, la exposición prolongada del T. cruzi a estas drogas podría resultar en mutaciones en el tripanosoma.

Efecto de drogas tripanocidas sobre la biosíntesis de macromoléculas en el T. cruzi

El crecimiento y la multiplicación del T. cruzi son procesos complejos que involucran la duplicación del DNA

la transcripción de la información genética al RNA y la biosíntesis de proteínas. Estos procesos se pueden evaluar usando precursores específicos. Así la $|^3\text{H}|$ timidina se incorpora al DNA, la $|^3\text{H}|$ uridina al RNA y la $\text{L}|^3\text{H}|$ leucina a las proteínas. Con estas bases se construyó un protocolo experimental para la evaluación de drogas tripanocidas. Los compuestos que se consideraron en este estudio fueron de distinta estructura y propiedades físico-químicas. Se usaron el nifurtimox, un nitrofurano; el benznidazol, un nitroimidazol; la α y β lapachona, 2 quinonas derivadas del lapacho; la miconidina, una benzoquinona sustituida y la tingenona que posee una estructura policíclica con 2 acetonas y un OH en C-3 vecino al carbonilo en C-2 (Figura 40). En el T. cruzi la metabolización del nifurtimox, β lapachona (Boveris y col., 1978b; Docampo y col., 1981a) y miconidina (Goijman y col., en prensa), implica una serie de oxido-reducciones que llevan a la generación de O_2^- , H_2O_2 y $\text{OH}\cdot$. Se estudió el efecto de estos compuestos sobre la biosíntesis de las macromoléculas, correlacionando los resultados con la metabolización de los compuestos en el T. cruzi. Todas las drogas empleadas inhibieron la incorporación de precursores radiactivos al parásito, pero los efectos fueron diferentes. El nifurtimox inhibió con intensidad aproximadamente igual la incorporación de $|^3\text{H}|$ timidina, $|^3\text{H}|$ uridina y $\text{L}|^3\text{H}|$ leucina, la β lapachona a la mayor concentración, 7.8 μM , disminuyó la incorporación de $|^3\text{H}|$ timidina y $\text{L}|^3\text{H}|$ leucina, la miconidina inhibió la biosíntesis de DNA, RNA y especialmente proteínas. El benzni-

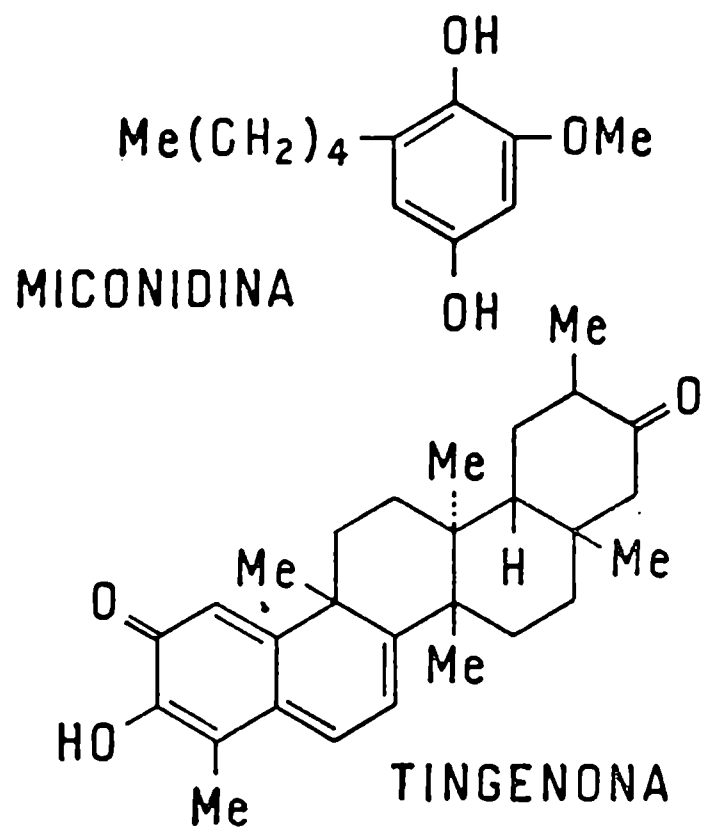


Fig. 40. Estructura química de la tingenona y la miconidina

dazol, α lapachona y tingenona inhibieron más la incorporación de L- ^3H leucina que cualquier otro precursor radiactivo, si bien se observaron disminuciones en la incorporación de ^3H timidina y ^3H uridina. La inhibición en la síntesis de proteínas revelada por la menor incorporación de L- ^3H leucina a la fracción precipitable con TCA, no parece ser un factor esencial en la acción tripanocida, pues la α lapachona que la inhibe selectivamente, es un débil inhibidor del crecimiento del T. cruzi (Boveris y col., 1977a). Con todas las drogas se midieron simultáneamente la entrada total y la incorporación de los precursores radiactivos a las macromoléculas. En general se encontró que el nifurtimox, β lapachona y miconidina, inhibieron ambos procesos con distinta magnitud, mientras que las otras drogas a la menor concentración lo hicieron preferencialmente sobre la entrada del precursor radiactivo al parásito; de manera que la disminución en la biosíntesis de las macromoléculas se debió a una menor disponibilidad del precursor radiactivo.

Si sólo se considera la incorporación de ^3H timidina, la inactivación de este proceso decreció en el orden: β lapachona > α lapachona, nifurtimox > benznidazol, miconidina > tingenona, o sea que en todos los casos la β lapachona, nifurtimox y miconidina fueron los compuestos más eficaces. Dada la capacidad de esos compuestos para generar anión superóxido, es obvio que la presencia de superóxido dismutasa en el T. cruzi (Boveris y col., 1980) aseguró la formación de H_2O_2 y de radical $\text{OH}\cdot$. Con el nifurtimox, β lapachona y miconidina, existió una relación entre 1) generación de

radicales libres del oxígeno; 2) inactivación de la síntesis de DNA; y 3) acción tripanocida "in vitro". En otras palabras, las acciones tripanocidas de los compuestos mencionados debe involucrar, como componente importante, la alteración del DNA mediada por radicales libres, especialmente el radical OH^\cdot , como se observó previamente en la producción de rupturas en una de las cadenas del nDNA y kDNA del T. cruzi y en el aumento del malondialdehído proveniente de los carbonos 1'-3' de la desoxirribosa del DNA. Los resultados obtenidos, también están de acuerdo con el aumento de la inhibición en la síntesis de DNA en tripanosomas pretratados con nifurtimox o β lapachona durante distintos tiempos. El efecto del nifurtimox sobre la biosíntesis de DNA, se comprobó en condiciones excluyentes de otras acciones del nitroderivado como son: peroxidación lipídica, disminución de la entrada del precursor radiactivo a la célula y deficiente transformación de timidina a timidina trifosfato. Con respecto a la incorporación de ^3H timidina al RNA, se obtuvieron curvas bifásicas para la incorporación de este precursor radiactivo en presencia de nifurtimox, β lapachona y miconidina. Después de la primera hora de incubación, los compuestos favorecieron la degradación del RNA previamente sintetizado. Las curvas obtenidas para estas drogas de distinta estructura química, están a favor de la existencia de un metabolito en común en los tres casos, que sería el OH^\cdot . Si los compuestos se comparan en base a su capacidad para inhibir la incorporación del L ^3H leucina, el benznidazol, la α lapachona y la tingenona, resultaron muy eficaces a pesar de su incapacidad

para generar radicales libres (Polak y col., 1978; Boveris y col., 1977a; Goijman y col., en prensa), de lo que se puede inferir que estos últimos no son esenciales para la inhibición de la síntesis de proteínas. Más aún, con la α -lapachona la inhibición en la incorporación de [^3H] leucina superó ampliamente la escasa capacidad de la α -lapachona para inhibir el crecimiento del T. cruzi "in vitro". Ello significa que la inhibición de la síntesis de DNA es la lesión bioquímica de mayor relevancia para la acción tripanocida, como lo confirma la comparación de las concentraciones 50% inhibitoras del crecimiento del T. cruzi para el nifurtimox (10 μM) (Docampo y col., 1980), benznidazol (50 μM) (Polak y col., 1978), β -lapachona (1.5 μM) (Boveris y col., 1977a), α -lapachona (no afecta) (Boveris y col., 1977a), miconidina (5 μM) (Goijman y col., en prensa) y tingenona (15 μM) (Goijman y col., en prensa). Sin embargo, la inhibición en la síntesis de DNA no excluye la de otros procesos metabólicos, especialmente con las concentraciones altas de drogas. La lesión primaria en el DNA finalmente se traducirá en alteraciones en el RNA y las proteínas. Sims y Gutteridge obtuvieron resultados similares con otro 5 nitrofurano, SQ 18506 (Sims y col., 1978) en el T. cruzi. Crithidia fasciculata un protozoario no patógeno dotado de catalasa, también es sensible a la acción de los nitroderivados nifurtimox y MK 436, los cuales actuarían sobre la biosíntesis y causando lesiones ultraestructurales (Gutteridge y col., 1982).

El nifurtimox, benznidazol y β lapachona, acortaron la vida media de cada una de las macromoléculas del parásito, con modalidades dependientes del precursor utilizado. Este acortamiento podría implicar: a) una renovación más rápida de la especie molecular involucrada (mayor recambio o "turnover") o bien b) mayor degradación de las macromoléculas. El primer mecanismo representaría un aumento del proceso normal dentro de la célula mientras que el segundo sería la consecuencia de un daño molecular. Los resultados obtenidos con el nifurtimox, benznidazol y β lapachona como inductores de lesiones en una de las cadenas del DNA y de "síntesis no programada de DNA", estarían a favor del segundo mecanismo.

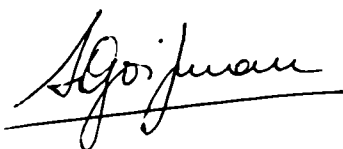
Los diferentes efectos de las drogas tripanocidas sobre la biosíntesis de macromoléculas y la producción de lesiones en el DNA, no implican necesariamente una mayor acción antiparasitaria de los compuestos productores de radicales libres con respecto a los otros. En efecto, ratones inoculados con las cepas Y y CA de T. cruzi, tratados con iguales dosis (100 mg/kg/día) de nifurtimox y benznidazol durante 8 semanas, mostraron un índice de curación parasitológica de 8/20 con el primero y de 20/35 con el segundo (Richtle, comun.personal). Es indudable que estas drogas tienen acciones múltiples sobre el T. cruzi, que finalmente llevarían a la destrucción y muerte del parásito.

CONCLUSIONES

1. La reducción metabólica o "activación" de los nitroderivados es un prerrequisito para la acción tóxica de estos compuestos sobre el DNA.
2. Como consecuencia del tratamiento de los epimastigotes con nifurtimox y benznidazol, se introdujeron lesiones en el DNA del T. cruzi, que se extendieron al nDNA y kDNA.
3. Se produjeron rupturas en una de las cadenas del DNA en los tripanosomas incubados con nifurtimox y benznidazol. El nifurtimox causó mayor número de rupturas/ 10^6 nucleótidos que el nitroimidazol. Esto está de acuerdo con la producción de un metabolito más tóxico en el primer caso que en el segundo, que sería el OH \cdot . Los resultados obtenidos con la β lapachona "in vivo" y con los sequestrantes de radicales OH \cdot "in vitro" confirman esta hipótesis.
4. Se observó un aumento paralelo de la peroxidación lipídica y de las lesiones en el DNA asociado a una disminución en el contenido de GSH hepático. Las lesiones medidas como el incremento de malondialdehído proveniente de los C 1'-3' del DNA, confirman que el radical OH \cdot , tiene un papel importante en la degradación del DNA. Esta afirmación se complementa con la inhibición de los efectos en presencia de SOD, catalasa y sequestrantes de radicales OH \cdot .
5. Ninguno de los dos nitroderivados produjo modificaciones en las bases. No se observó aumento en la velocidad de depuración del DNA, que se interpretó como la ausencia de bases metiladas.
6. El tripanosoma cuenta con mecanismos que le permitieron

reparar las rupturas en el DNA cuando se lo incubó en ausencia de las drogas.

7. El nifurtimox, benznidazol y β lapachona, indujeron "síntesis no programada de DNA". Este hecho indica que las drogas produjeron lesiones en el DNA, las cuales se repararon por el proceso de escisión-reparación. En el caso del nifurtimox y β lapachona el daño puede atribuirse al radical $\text{OH}\cdot$. Con el benznidazol, a la formación de un aducto benznidazol-DNA que es reemplazado en el proceso de reparación.
8. El nifurtimox inhibió la síntesis de DNA, medido en condiciones excluyentes de otras acciones de la droga. Los otros compuestos tripanocidas generadores de O_2^- y H_2O_2 tuvieron un modo de acción similar. El nifurtimox, miconidina y β lapachona inhibieron principalmente la síntesis de DNA y dieron curvas bifásicas en la incorporación de [^3H]uridina al RNA. El benznidazol, α lapachona y tingenona, por otro lado, inhibieron la síntesis de proteínas más que la de DNA y RNA.
9. El nifurtimox y la β lapachona incrementaron en forma marcada la degradación de DNA, RNA y proteínas. El aumento se correlacionó con la habilidad del tripanosoma para metabolizar esos compuestos de forma de generar O_2^- y H_2O_2 .
10. Se encontró correlación entre inhibición en la biosíntesis de macromoléculas e inhibición del crecimiento de los parásitos.




 PROF. DR. ANDRES O. M. STOPPANI
 DIRECTOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOTECNOLÓGICAS
 CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, R.L.P., LINDSAY, J.G. (1967) *J.Biol.Chem.* 242, 1314
- AKAO, M., KIURODA, K., MIYAKI, K. (1971) *Biochem.Pharmacol* 20, 3091.
- ALBERTINI, J.P., GARNIER, A., TORI, L. (1982) *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 104, 557.
- ANON, C. (1976) *Fed.Regist.* 41, 34884
- BACHUR, N.R., GORDON, S.L., GEE, M.V. (1977) *Cancer Res.* 38, 1745.
- BACHUR, N.R., GORDON, S.L., GEE, M.V. KON, H. (1979) *Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 76, 954.
- BERLIN, V., HASELTINE, W.A. (1981) *J.Biol.Chem.* 10, 4747.
- BIAGLOW, J.E., NYGAARD, O.F., GREENSTOCK, C.L. (1976) *Biochem. Pharmacol.* 25, 393.
- BONADONNA, G., MONFARDINI, S., DE LENA, M., FOSSATI-BELLANI, F., BERETTA, G. (1970) *Cancer Res.* 30, 2572
- BOLIVAR, F. (1978) *Gene* 4, 121
- BORST, P., FASE-FOWLER, F. (1979a) *Biochem.Biophys.Acta* 565,1.
- BORST, P., HOEIJMAKERS, J.H.J. (1979b) *Plasmid* 2, 20
- BORST, P., HOEIJMAKERS, J.H.J. (1979c). En: "Extrachromosomal DNA", ICN.UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology (A.J. Cummings, P.Borst, B. David, S.M. Weissman, C.F. Fox, eds.) Academic Press, New York, 15, 515.
- BORST, P. FASE-FOWLER, F., FRASCH, A.C.C., HOEIJMAKERS, J.H.J., WEIJERS, P.J. (1980) *Mol.Biochim.Parasitol.* 1, 221.
- BOVERIS, A., DOCAMPO, R., TURRENS, J.F., STOPPANI, A.O.M. (1977a) *Rev.Asoc.Arg.Microbiol.* 2, 54.
- BOVERIS, A., STOPPANI, A.O.M. (1977b) *Experientia* 33, 1306.
- BOVERIS, A., DOCAMPO, R., TURRENS, J.F., STOPPANI, A.O.M. (1978a) *Biochem.J.* 175, 431.
- BOVERIS, A., STOPPANI, A.O.M., DOCAMPO, R., CRUZ, F.S. (1978b) *Comp.Biochem.Physiol.* 61 C, 327.
- BOVERIS, A., SIES, H., MARTINO, E.E., DOCAMPO, R., TURRENS, J.F. STOPPANI, A.O.M. (1980) *Biochem.J.* 188, 643.
- BRESSLAV, E., SCREMIN, L. (1924) *Archiv.fur Protistenkunde* 48, 509.

- BAILL, A.S. (1966) En: "Peroxidase and catalase:Comprehensive Biochemistry" (M. Florkins, E.H. Stotz, eds.) Amsterdam, Elsvier, 447.
- BROOKES, P., LAWLEY, P.D.(1960) Biochem.J. 77, 4781
- BROOKES, P., LAWLEY, P.D. (1961) Biochem.J. 80, 496
- BURGER, R.M., PEISACH, J., BLUMBERG, W.E., HORWITZ, S.B. (1979a) J.Biol.Chem. 254, 10906
- BURGER, R.M., HORWITZ, S.B., PEISACH, J., WITTEMBERG, J.B. (1979b) J.Biol.Chem. 254, 12299.
- BURGER, R.M., BERKOWITZ, A.R., PEISACH, J., HORWITZ, S.B. (1980) J.Biol.Chem. 254, 11832
- BURK, R.F. Jr., NISHIKI, K., LAWRENCE, R.A., CHANCE, B. (1978) J.Biol.Chem. 253, 43
- BYFIELD, J.E., LEE, Y.C, TAU, L., KULHANIAN, F. (1976) Cancer Res. 36, 1138
- CAPPS, M.J., O'CONNOR, P.J., CRAIG, A.W. (1973) Biochem. Biophys.Acta 331, 33.
- CASTRO, C., HERNANDEZ, R., CASTAÑEDA, M. (1981a) Molec.Biochem. Parasitol. 2, 219
- CASTRO, C., CRAIG, S.P., CASTAÑEDA, M. (1980b) Molec.Biochem. Parasitol. 4, 273
- CENTER, M.S., RICHARDSON, C.C.(1970) J.Biol.Chem. 245, 6285
- CHANCE, B. (1951) En: "The Iron containing enzymes. The enzymes" J.B. Summers, K. Myrback, eds.) New York Academic 428.
- CHANCE, B., SIES, H., BOVERIS, A. (1979) Physiol.Rev. 59, 527
- CHIARI, E. (1971) Tesis, Univ.Fed.Minas Gerais, Belo Horizonte Brasil.
- CLEAVER, J.E., PAINTER, R.B. (1968) Biochim.Biophys.Acta 161, 552.
- CLEAVER, J.E. (1969) Rad.Res. 37, 334
- COCHRAN, J.W., HAHN, F.E. (eds.)(1975)Antibióticos Vol.3. Berlin Heidelberg-New York.Springer
- COOMBS, G.H. (1976) En: "Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationship" (H. Van der Bossche, ed.) North Holland, Amsterdam, 545.
- COSAR, P., JULOU, L. (1959) Ann. de l'Institut Pasteur 96, 238

- CRADDOCK, V.M. (1973) *Nature (London)* 245, 386
- CRADDOCK, V.M., FREI, J.V. (1974) *Br.J.Cancer* 30, 503
- D'ANDREA, A.D., HASELTINE, W.A. (1978) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 75, 3608
- DIMARCO, A. (1968) *Acta Genet.Med.Gemellool.* 17,102
- DOCAMPO, R., BOISO, J.F., BOVERIS, A., STOPPANI, A.O.M. (1976) *Experientia* 32, 972
- DOCAMPO, R. (1977a) Tesis, Univr.Fed.de Río de Janeiro, Brasil.
- DOCAMPO, R., LOPEZ, J.N., CRUZ, F.S., DE SOUZA, N. (1977a) *Exp.Parasitol.* 42, 142
- DOCAMPO, R. CRUZ, F.S., BOVERIS, A., MUÑIZ, R.P.A., ESQUIVEL, A.M.S. (1978c) *Arch.Biochem.Biophys.* 186, 292
- DOCAMPO, R., DE SOUZA, W, CRUZ, F.S., ROITMAN, I., COUER, B., GUTTERIDGE, W.E. (1978a) *Z.Parasitenkr.* 57, 189
- DOCAMPO, R., STOPPANI, A.O.M. (1980) *Medicina (Bs.As.)* 40,10
- DOCAMPO, R., MORENO, S.N.J., STOPPANI, A.O.M. (1981a) *Arch. Biochem.Biophys.* 207, 316
- DOCAMPO, R., MORENO, S.N.J., STOPPANI, A.O.M., LEON, W., CRUZ, P.S., VILLALTA, F., MUÑIZ, R.P.A. (1981b) *Biochem.Pharmacol.* 30, 1947
- DUBIN, M., MORENO, S.N.J.; MARTINO, E., DOCAMPO, R., STOPPANI, A.O.M. (1982) *Biochem.Pharmacol.* 32, 483
- EDWARDS, D.I., MATHISON, G.E. (1970) *J.Gen.Microbiol.* 63, 297
- EDWARDS, D.I., DYE, M., CAINE, H. (1973) *J.Gen.Microbiol.* 76, 135.
- ELSON, L.A. (1963) *Radiation and Radiomimetre Chemicals.* Butterworth, London
- ELLMAN, G.L. (1959) *Arch.Biochem.Biophys.* 82, 70.
- ENGLUND, P.T. (1981) En: "Biochemistry and Physiology of Protozoa" (M. Leucadowsky, S.H. Hutner, eds.) 2nd ed. Vol.4, Academic Press, New York, 333.
- FAIRLAMB, A.H., WEISLOGEL, P.O., HOEIJMAKERS, J.H.J., BORST, P. (1978) *J.Cell.Biol.* 76, 293.
- FLOHE, L., GUNZEER, W.A., LADENSTEIN, R. (1976) En:"Glutathione: Metabolism and Function" (M. Arias, W.B. Jacoby, eds.) Raven, New York, 115.

- FLOYD, R.A. (1981) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 99, 1209
- FONG, K.L., Mc CAY, P.B., FOYER, J.L., KEELE, B.B., MISRA, H. (1973) *J.Biol.Chem.* 248, 7792
- FONG, K.L., Mc KAY, P.B., FOYER, J.F., MISRA, H., KEELE, B.B. (1976) *Chem.Biol.Interact.* 15, 77
- FOUTS, D.L., MANNING, J.E., WOLSTENHOLME, D.R. (1975) *J.Cell. Biol.* 67, 378
- FRASCH, A.C.C., HAJDUK, S.L., HOEIJMAKERS, J.H.J., BORST, P. BRUNEL, F., DAVISON, J. (1980) *Biochim.Biophys.Acta* 607, 397.
- FRASCH, A.C.C., GOIJMAN, S.G., CAZZULO, J.J., STOPPANI, A.O.M. (1981) *Molec.Biochem.Parasitol.*
- FRASCH, A.C.C., CARRASCO, A.E., GOIJMAN, S.G., SANCHEZ, D.G. (1983) *Mol.Biochem.Parasitol.* 8, 227
- FRIDOVICH, I. (1974) *Adv.Enzymol.* 41, 35
- FRIDOVICH, I. (1975) *Horizons Biochem.Biophys.* 1, 1
- FULTON, J.D., SPOONER, D.F. (1956) *Biochem.J.* 63, 475
- GAUSTCHI, J.R., YOUNG, B.R., CLEAVER, J.E. (1973) *Exptl. Cell. Res.* 76, 87
- GERCHMAN, L.L., LUDLUM, D.B. (1973) *Proc.Am.Assoc.Cancer Res.* 14, 13
- GOIJMAN, S.G., TURRENS, J.F., MARINI-BETTOLO, G.B., STOPPANI, A.O.M. (1983) *Medicina (Bs.As.) en prensa*
- GOLDBERG, I.H., HATAYAMA, T., KAPPEN, L.S., NAPIER, H.A., POI-VIRK, L.F. (1981) En: "Second Annual Bristol-Myers Symposium in Cancer Research" Academic Press, New York, 163
- GOODMAN, N.F., BRESSMAN, M.J., BACHUR, N.R. (1974) *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A* 71, 1193
- GOODMAN, J., HOCHSTEIN, P. (1977) *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 77, 797
- GUTIN, P.H., HILTON, J., FEIN, V.J., ALLAN, A.E., ROTTMAN, A.E., WALKER, M.D. (1977) *Cancer Res.* 37, 3761
- GUTTERIDGE, J.M.C., FU, X. (1979) *FEBS Lett.* 2, 278
- GUTTERIDGE, W.E., ROSS, J., HARGADON, M.R., HUDSON, J.E. (1982) *Trans.Royal Soc.Trop.Med.* 76, 493.
- HABER, F., WEISS, J. (1934) *Proc.Royal Society London* 147, 332

- HAIDLE, C.W., WEISS, K.K., KUO, M.T. (1972) *Mol.Pharmacol.* 8, 531
- HALLIWELL, B. (1976) *FEBS Lett.* 72, 8
- HATAYAMA, T., GOLDBERG, I.M., TAKESHIMA, M., GROLLMAN, A.P. (1978) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75, 3603
- HARM, W. (1967) *Mutation Res.* 4, 93
- HEMMERICH, P., NAGELSCHEIDER, G., VEEGER, C. (1970) *FEBS Lett.* 8, 69
- HOEIJMAKERS, J.H.J., FRASCH, A.C.C., BERNARDS, A., BORST, P., CROSS, G.A.M. (1980) *Nature (London)* 284, 78
- ILAN, Y.A., CZAPSKI, G. (1977) *Biochem.Biophys.Acta* 498, 386
- IQBAL, Z.M., KAHN, K.W., EWIG, R.A.G., FORNACE, A.J. Jr. (1976) *Cancer Res.* 36, 3834
- ISHIDA, R., TAKAHASHI, T. (1976) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 68, 256
- IYER, V.N., SYBALSKY, W. (1963) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 50, 355
- KANTER, P.M., SCHWARTZ, H.S. (1979) *Cancer Res.* 39, 3661
- KAPPEN, L.S., GOLDBERG, I.H., LEISCH, J.M. (1982) *Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A.* 79, 744
- KELLOG, E.W., FRIDOVICH, I. (1975) *Biol.Chem.* 250, 8812
- KERSTEN, H., KERSTEN, W., LEOPOLD, G., SCHNEIDER, B. (1964) *Biochem.Biophys.Acta* 80, 521
- KIRSCH, E.J. (1976) En: "Antibiotics" Vol.2 (T.W. Corcoran, F.E. Hahn eds.) Berlin. Heidelberg-New York, Springer 66
- KLEISEN, C.M., BORST, P., WEIJERS, P.J. (1976) *Eur.J.Biochem.* 64, 141
- KLUG, D., RABANI, I., FRIDOVICH, I. (1972) *J.Biol.Chem.* 247, 4839
- KNIGHT, R.C., SKOLIMOWSKY, I., EDWARDS, D.I. (1978) *Biochem. Pharmacol.* 17, 2089
- KNIGHT, R.C., ROWLEY, D.A., SKOLIMOWSKY, I., EDWARDS, D.I. (1979) *Int.J.Radiat.Biol.* 4, 367
- KOHN, K.W., SPEARS, C.L., DOTY, P. (1966) *J.Mol.Biol.* 19, 266

- KOHN, K.W., EWIG, R.A.G. (1976) *Cancer Res.* 36, 3839
- KOPPENOE, W.H., BUTLER, J. (1977) *FEBS Lett.* 83, 1
- KORYCKA-DAHL, M., RICHARDSON, T. (1980) *Biochem.Biophys. Acta* 610, 229
- KUHNLEIN, U., TSANG, S.S., EDWARDS, J. (1979) *Mutat.Res.* 64, 167
- LAWLEY, P.D. (1966) *Prog.Nuclei Acid Res.Mol.Biol.* 6, 89
- LAWLEY, P.D., BROOKES, P. (1967) *J.Mol.Biol.* 25, 143
- LAWLEY, P.D., BROOKES, P. (1968) *Biochem.J.* 109, 433
- LAWLEY, P.D., THATCHER, C.J. (1970) *Biochem.J.* 116, 693
- LETT, J.T., CALDWELL, I., DEAN, C.J., ALEXANDER, P. (1967) *Nature* 214, 790
- LINDMARK, D.G., MULLER, M. (1976) *Antimicrob.Agents Chemother.* 10, 476
- LITTLE, J.W., EDMISTON, S.H., PACELLI, L.Z., MOUNT, D.W. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 77, 3225
- LITTLE, J.W. (1982) *Biochemie* 64, 585
- LOVELESS, A. (1969) *Nature (London)* 223, 206
- LOWN, J.W., SIM, S.K., MAJUMDAR, K.C., CHANG, R.Y. (1977) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 76, 705
- LU, C., Mc CALLA, D.R., BRYANT, D.W. (1979) *Mutat.Res.* 67, 133
- MASON, R.P., HOLTZMAN, J.L (1975) *Biochemistry* 14, 1626
- MARTIN, N., Mc DERMID, A.C., GARNER, R.C. (1978) *Cancer Res.* 38, 2621
- MASUDA, H., SIMPSON, L., ROSEMBLATT, H., SIMPSON, M. (1979) *Gene* 6, 51
- MATTHEWS, R.G., SCHUMAN, M. SULLIVAN, P.A. (1969) *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 36, 891
- Mc CORD, J.M., FRIDOVICH, I. (1969) *J.Biol.Chem.* 244, 6049
- Mc CORD, J.M., DAY, E.D. Jr. (1978) *FEBS Lett.* 86, 139
- Mc DONNELL, M.W., SIMON, M.N., STUDIER, F.W. (1977) *J. Mol. Biol.* 110, 119
- MENECHINI, R. (1976) *Biochim.Biophys.Acta* 425, 419

- MENECHINI, R., HOFFMANN, M.E. (1980) *Biochim.Biophys.Acta* 608, 167
- MICHAELIS, (1951) En: "The Enzymes". Academic Press, New York, 1
- MIDDLEMAN, E., LUCE, J., FREI, E. (1971) *Cancer* 28, 844
- MILLS, G.C. (1960) *Arch.Biochim.Biophys.* 86, 1
- MISHINE, U., POKROVSKY, A., LYAKOVICH, U.V. (1976) *Biochem. J.* 154, 307
- MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. (1972) *J.Biol.Chem.* 247, 188
- MORENO, S.N.J., PALMERO, D.J., KUMIKO, E., DOCAMPO, R., STOPPANI, A.O.M. (1980) *Medicina (Bs.As)* 40, 553
- MORENO, S.N.J., DOCAMPO, R., MASON, R.P., LEON, W., STOPPANI, A.O.M. (1982) *Arch.Biochem.Biophys.* 218, 585
- NATURE, Revisión (1978) *Parasitology Supplemented*, Vol. 283
- NICHOLLS, P., SCHONBAUM, G.R. (1963) En: "Catalases. The Enzymes" (P. Boyer, H.A. Lardy, K. Myrback, eds.) New York, Academic 8, 147
- NISHIKI, K., OSHINO, N., JAMIESON, D., CHANCE, B. (1976) *Biochem.J.* 160, 343
- NORDENSKJOLD, M., SODERHALL, S., MOLDEUS, P. (1979) *Mut.Res.* 63, 393
- NUGTEREN, D.M., HAZELHOF, E. (1973) *Biochem.Biophys.Acta.* 326 448
- OHNO, S. (1971) *Nature*, 234, 134
- OLIVE, P.L., McCALLA, D.R. (1977) *Chem.Biol.Interact.* 16, 223
- OLIVE, P.L., DURAND, R.E. (1983) *Br.J.Cancer* (en prensa)
- OTSUJI, N., MURAYAMA, S. (1972) *J.Bacteriol.* 109, 475
- PAINTER, R.B., CLEAVER, J.E. (1967) *Nature (London)* 216, 369
- PANCHENKO, L.F., BRUSOV, O.S., GERASIMOV, A.M., LOKTAEVA, T.D. (1975) *FEBS Lett.* 55, 84
- PEETERS-JORIS, C., VANDEVOORDE, A.M., BAUDHUIN, P. (1975) *Biochem.J.* 150, 31.
- PEREZ-REYES, E., KALYANARAMAN, B., MASON, R.P. (1979) *Mol. Pharmacol.* 11, 239

- PETERSON, F.J., MASON, R.P., HOUSEPIAN, J., HOLTZMAN, J.L.
(1979) J.Biol.Chem. 254, 4009
- PIGRAM, W.J., FULLER, W., HAMILTON, L.D. (1972) Nature
New Biol. 235, 17
- PLACER, Z.A., CUSHMAN, L.L., JOHNSON, B.R. (1966) Anal.
Biochem. 16, 359
- PLAGEMAN, P.G. (1975) J.Cell.Physiol. 75, 315
- POLAK, A., RICHLER, R. (1978) Ann.Trop.Med.Parasit. 72, 45
- POON, R., BEERMAN, T.A., GOLDBERG, I.H. (1977) Biochemistry
16, 486
- QUE, B.G., DOWNEY, K.M., SOH, G. (1980) Biochemistry 19, 5887
- RADMAN, M., VILLANI, G., BOITEUX, S., DEFAIS, M., CAILLET-
FAUQUET, P., SPADARI, S. (1977) En: "Origen of Human Cancer"
(J.D. Watson, H. Hialt, eds.) Cold Srping Harbor Laboratory,
Book B, 993.
- RASMUSSEN, R.E., PAINTER, R.B. (1966) J.Cell.Biol. 29, 11
- RAUTH, A.M. (1967) Radiation Res. 31, 121.
- REGAN, J.D., TROSKO, J.E., CARRIER, W.L. (1968) Biophys. J.
8, 319
- REPINE, J.E., PFENNINGER, O.W., TALMAGE, A.W., BERGER, E.M.,
PETTIJOHN, D.E. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 78, 1001
- RIOU, G.F., YOT, P. (1977) Biochemistry 16, 2390
- RIOU, G.F., GUTTERIDGE, W.E. (1978) Biochemie 60, 365
- ROBERTS, J.J., PASCOE, J.M., PLANT, J.E., STURROCK, J.E.,
CRATHORN, A.R. (1971) Chem.Biol.Interact. 3, 29
- ROTILIO, G., BRAY, R.C., FIELDEN, E.M. (1972) Biochem.Biophys.
Acta 268, 605
- ROTILIO, G. CALABRESE, L. (1974) Biochem.J. 139, 49
- SAUSVILLE, E.A., STEIN, R.W., PEISACH, J., HORWITZ, S.B.
(1978) Biochemistry 17, 2746
- SCHNEIDERMAN, M.H., DEWEY, W.C., HIGHFIELD, D.P. (1971)
Exptl.Cell Res. 67, 147
- SCHWARTZ, H.S., SODERGREN, J.E., PHILIPS, F.S. (1963) Science
142, 118

- SEDLACK, J., LINDSAY, R.H. (1968) *Anal.Biochem.* 25, 192
- SIES, H., BARTOLI, G.M., BULK, R.F., WAYDHAS, C. (1978)
Eur.J.Biochem. 89, 113
- SIES, H., KOCH, O.R., MARTINO, E., BOVERIS, A. (1979) *FEBS
Lett.* 103, 287
- SIMPSON, L. (1972) *Int.Rev.Cytol.* 32, 139
- SIMPSON, L. (1979) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 76, 1585
- SIMS, P., GUTTERIDGE, W.E. (1978) *Biochem.Pharmacol.* 27, 2815
- SINHA, B.K., CHIGNELL, C.F. (1979) *Chem.Biol.Interactions*
28, 301
- SMITH, H.O. (1979) *Science* 205, 455
- STEINERT, M., VAN ASSEL, S. (1975) *Exp.Cell.Res.* 96, 406
- STEINERT, M., VAN ASSEL, S. (1980) *Plasmid* 3, 7
- STUART, K. (1979) *Plasmid* 2, 520
- STUDIER, F.W. (1965) *J. Mol.Biol.* 11, 373
- SUGIMURA, T., SATO, S., NAGAO, M., YAHAGI, T., SURINO, Y.
(1976) En: "Fundamentals in Cancer Prevention" Univ. of
Tokyo Press. 191
- TAKESHITA, M., GROLLMAN, A.P., OHTSUBO, E., OHTSUBO, H.(1978)
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 75, 5983
- TANAKA, N., SUGIURA, K., HATTORI, M., GOTO, M (1977) *Chemosphere*
9, 569
- TALLEY, F.P., GOLDIN, B.R., SULLIVAN, N., JOHNSTON, J., GORBACH,
S.L. (1978) *Antimicrob.Agents Chemother* 13, 460
- TAPPEL, A.L. (1973) *Fed.Proc.* 32, 1870
- TAYLOR, A.E.R., BAKER, J.P. (1968) "The Cultivation of Parasites
in vitro" Blackwell, Oxford
- THACKER, J., COX, R. (1975) *Nature (London)* 258, 429
- THAVER, W.S. (1977) *Chem.Biol.Interact.* 19, 265
- THEORELL, H. (1951) En: "Catalases and Peroxidases. The Enzymes"
(J.B. Sumner, K. Myrback, eds.) New York, Academic 2, 397

- TROSKO, J.E., YAGER, J.D. (1974) *Expl.Cell Res.* 88, 47
- TU, C., Mc CALLA, D.R. (1975) *Biochim.Biophys. Acta* 402, 142
- TYLER, D.D. (1975) *Biochem.J.* 147, 493
- UMEZAWA, H. (1975 En: "Antibiotics" (J.W. Corcoran, F.E. Hahn, eds.) Berlin-Heidelberg, New York, Springer. Vol. 3, 21.
- VAN SEELAND, A.A., SIMONS, J.W. (1976) *Mut.Res.* 35, 129
- VICKERMAN, K., PRESTON, T.M. (1976) En: "Biology of Kineto-plastida (W.H.R.Lumsden, D.A. Evans, eds.) Academic Press, London, 1, 35
- VICKERMAN, K. (1978) *Nature* 273, 613
- WALKER, J.G. (1971) *Cancer J. Biochem.* 49, 332
- WANG, C.Y., BEHRENS, B.C., ICHIKAWA, M., BRYAN, G.T. (1974) *Biochem. Pharmacol.* 13, 3395
- WANG, C.Y., HAYASHIDA, S. (1977) *Proc.Am.Assoc.Cancer Res.* 18, 100.
- WARAVDEKAR, V.S., SASLAW, L.D. (1959) *J.Biol.Chem.* 234, 1945
- WARREN, L. (1960) *J. Parasitol.* 46, 529
- WEINTRAUB, H., HOLTZER, H. (1972) *J.Mol.Biol.* 66, 13
- WEISLOGEL, P.O., HOEIJMAKERS, J.H.J., FAIRLAMB, A.H., KLEISEN, C.M., BORST, P. (1977) *Biochem.Biophys.Acta* 478, 167
- WEISIGER, R.A., FRIDOVICH, I. (1973a) *J.Biol.Chem.* 248, 4793
- WEISIGER, R.A., FRIDOVICH, I. (1973b) *J.Biol.Chem.* 248, 3582
- WENTZEL, B., Mc CALLA, D.R. (1980) *Chem.Biol.Interact.* 31, 133
- WESLEY, R.D., SIMPSON, L. (1973) *Biochem.Biophys.Acta* 319, 267
- WILHELM, R.C., LUDLERM, D.B. (1966) *Science* 153, 1403
- WOLPERT, M.K., ALTHANS, J.R., JOHNS, D. (1973) *J.Pharmac.Exp. Ther.* 185, 202
- WOLSTENHOLME, D.R., REUGER, H.C., MANNING, J.E., FOUTS, D.L. (1974) *J.Protozool* 21, 622
- YOUNG, C.W., HODAS, S. (1964) *Science* 146, 1172
- YOUNG, C.W., SCHOCHETMAN, G., KARNOVSKY, D.A. (1967) *Cancer Res.* 27, 526

ZIMMERMAN, R., FLOHE, L., WEISER, V., HARTMAN, H.J. (1973)
FEBS Lett. 29, 117

ZUNINO, F., GAMBETTA, A., DIMARCO, A., ZACCARA, A., LUONI, G.
(1975) Cancer Res. 35, 754