

## Tesis de Posgrado

# Evaluación genotóxica de los fármacos antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol

Gorla, Nora Bibiana María

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas 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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Gorla, Nora Bibiana María. (1986). Evaluación genotóxica de los fármacos antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1998\\_Gorla.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1998_Gorla.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Gorla, Nora Bibiana María. "Evaluación genotóxica de los fármacos antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1998\\_Gorla.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1998_Gorla.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

*EVALUACION GENOTOXICA DE LOS  
FARMACOS ANTICHAGASICOS  
NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL*

*Nora Bibiana María Gorla*

*Director de Tesis: Dr. José Alberto Castro*

*Departamento de Ciencias Biológicas*

*Tesis presentada para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas*

1986

*Tesis 1998  
ej 2*

Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Ciencias Biológicas,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.  
Universidad de Buenos Aires.  
República Argentina, 1986.

Necesito exponer mi agradecimiento:

A mi familia, por enseñarme los verdaderos valores de esta vida y por significar un respaldo constante para mí.

Al Dr. José A. Castro, por permitirme realizar la tesis bajo su dirección, en su laboratorio, y por ofrecerme en forma práctica mi vistazo inicial a todo el panorama científico.

A la Dra. Adriana S. Bernacchi, por su apoyo humano y profesional, permanente y firme, durante toda mi estadía en el Centro de Investigaciones Toxicológicas (CEITOX).

A mis compañeros y mis amigos del CEITOX y del Centro de Investigaciones en Plagas e Insecticidas (CIPEIN).

Al profesor médico Osvaldo R. Vidal, por ser mi consejero de estudios, tanto en la elaboración del plan de materias cuanto en el tiempo dedicado a trámites, consejos y apoyo.

A la Dra. Inge M. Thiel, por su buena disposición y experiencia volcadas a subsanar los inconvenientes que, como en mi caso, tiene un doctorando no-graduado en esta casa de altos estudios.

A la Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), por mi formación de grado.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (UBA), por mi formación de post-grado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por acordarme oportunamente las becas de iniciación y perfeccionamiento que me permitieron trabajar en mi tesis.

## I N D I C E

Objetivo del trabajo de tesis .....	11.
INTRODUCCION .....	12.
ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	13.
- Ciclo de transmisión .....	15.
- Etapas clínicas de la enfermedad .....	17.
QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	21.
- Quimioterápicos que se han empleado y se utilizan en la actualidad para el tra- tamiento de la enfermedad de Chagas .....	21.
NIFURTIMOX y BENZNIDAZOL .....	26.
- Historia, ensayos y hallazgos farmacoló- gicos del Nifurtimox y Benznidazol .....	26.
- Efectos colaterales adversos que se evi- dencian en el hombre bajo tratamiento con estos antichagásicos .....	31.
- Antecedentes de toxicidad a largo plazo del Nifurtimox y Benznidazol .....	33.
- Análisis de la eficacia de los anticha- gásicos frente a la presencia de efec- tos colaterales .....	35.
MUTAGENESIS Y SU RELACION CON CARCINOGENESIS Y TERATOGENESIS .....	38.
- Detección de mutágenos y carcinógenos químicos .....	41.

- Ensayos de corto plazo para mutágenos y carcinógenos químicos .....	46.
ESTUDIOS DE UNION COVALENTE DE COMPUESTOS QUIMICOS CON MACROMOLECULAS CELULARES .....	55.
- Reseña sobre carcinogénesis química. Relevancia de las interacciones de compuestos químicos con macromoléculas celulares en los procesos de mutagénesis y carcinogénesis .....	55.
- Quimiodinamia de xenobióticos o sustancias extra- ñas al organismo .....	62.
ENSAYO DEL MICRONUCLEO .....	71.
ENSAYO DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS .....	76.
PARTE EXPERIMENTAL .....	83.
ESTUDIOS DE UNION COVALENTE DEL $^{14}\text{C}$ -BZ A MACRO- MOLECULAS CELULARES .....	84.
- Unión covalente del $^{14}\text{C}$ -Benznidazol al ADN. Estudios "in vivo" .....	84.
- Obtención del ADN de hígado de rata o ratón .....	85.
- Determinación de la unión covalente del $^{14}\text{C}$ - Benznidazol al ADN .....	86.
- Unión covalente del $^{14}\text{C}$ -Benznidazol a proteí- nas microsomales y ADN. Estudios "in vitro" .....	86.
- Obtención de microsomas de hígado de rata .....	87.
- Incubaciones "in vitro" para determinar la unión covalente del $^{14}\text{C}$ -Benznidazol a proteínas microsomales y ADN .....	87.
- Aislación del ADN incorporado al medio de incubación .....	88.

- Determinación de la unión covalente del $^{14}\text{C}$ -Benznidazol a proteínas microsomales .....	89.
- Unión covalente del $^{14}\text{C}$ -Benznidazol a proteínas y ADN nucleares. Estudios "in vitro" .....	89.
- Obtención de núcleos purificados de hígado de rata .....	89.
- Incubaciones "in vitro" para determinar la unión covalente del $^{14}\text{C}$ -Benznidazol a proteínas y ADN nucleares .....	90.
- Aislación de proteínas y ADN nucleares a partir de núcleos purificados de hígado de rata .....	91.
- Obtención de diferentes fracciones de proteínas nucleares de hígado de rata .....	92.
ENSAYO DEL MICRONUCLEO .....	96.
- Obtención de extendidos de médula ósea .....	96.
- Tinción y análisis de extendidos de médula ósea .....	97.
- Metabolismo reductivo del Benznidazol y Nifurtimox en médula ósea de ratón .....	99.
ENSAYO DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS .....	101.
- Cultivo de bazo de ratón .....	103.
- Preparación de extendidos para analizar intercambio de cromátidas hermanas .....	103.
- Análisis de intercambio de cromátidas hermanas en cromosomas metafásicos .....	104.
RESULTADOS .....	106.
ESTUDIOS DE UNION COVALENTE DEL $^{14}\text{C}$ -BZ A MACRO-MOLECULAS CELULARES .....	107.

ENSAYO DEL MICRONUCLEO .....	118.
ENSAYO DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS	
HERMANAS .....	125.
DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	138.
BIBLIOGRAFIA .....	166.



I N D I C E   D E   F I G U R A S , T A B L A S   Y   F O T O S .

INTRODUCCION

- Figura 1. Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi ..... 16.
- Figura 2. Fórmulas químicas de los fármacos  
antichagásicos Nifurtimox y Benz-  
nidazol ..... 24.
- Figura 3. Interacción de cancerígenos finales  
con sitios biológicos nucleofílicos  
y los efectos resultantes ..... 58.
- Figura 4. Interacción de compuestos químicos con  
un organismo biológico ..... 63.
- Figura 5. Ciclo catalítico propuesto para la re-  
ducción y oxidación del citocromo  
P-450 ..... 69.
- Figura 6. Formación de micronúcleos en los eri-  
troblastos policromáticos ..... 73.
- Figura 7. Representación esquemática de la incor-  
poración diferencial de bromodesoxy-  
uridina en los cromosomas ..... 78.

PARTE EXPERIMENTAL

- Figura 8. Obtención de diferentes fracciones de  
proteínas nucleares de hígado de rata ..... 93.

RESULTADOS

- Tabla 1. Activación microsomal del <sup>14</sup>C-BZ a meta-  
bolitos reactivos que se unen covalen-

	temente a proteínas microsomales y al ADN .....	108.
- Tabla 2.	Activación microsomal del $^{14}\text{C}$ -BZ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente al ADN .....	110.
- Tabla 3.	Idem .....	111.
- Tabla 4.	Idem .....	112.
- Tabla 5.	Activación nuclear del $^{14}\text{C}$ -BZ a meta- bolitos reactivos que se unen cova- lentemente a proteínas nucleares .....	113.
- Tabla 6.	Activación nuclear del $^{14}\text{C}$ -BZ a meta- bolitos reactivos que se unen cova- lentemente a proteínas y ADN nucleares ....	115.
- Tabla 7.	Activación nuclear del $^{14}\text{C}$ -BZ a meta- bolitos reactivos que se unen cova- lentemente a diferentes fracciones de proteínas nucleares .....	116.
- Figura 9.	Fracciones de proteínas nucleares de hígado de rata con % de radiactividad del $^{14}\text{C}$ -BZ unida covalentemente .....	117.
- Tabla 8.	Incidencia de micronúcleos en eritroblas- tos policromáticos de médula ósea de ratones tratados con Nifurtimox .....	119.
- Tabla 9.	Incidencia de micronúcleos en eritroblas- tos policromáticos de médula ósea de ratones tratados con Benznidazol .....	120.
- Fotos 1 y 2.	Ensayo del micronúcleo en médula ósea de ratón .....	121.
- Fotos 3, 4 y 5.	Ensayo del micronúcleo en mé-	

	dula ósea de ratón .....	122.
- Tabla 10.	Actividad nitro-reductiva del Nifurtimox y Benznidazol en médula ósea de ratón .....	124.
- Tabla 11.	Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos de bazo de ratones tratados con Nifurtimox .....	126.
- Tabla 12.	Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos de bazo de ratones tratados con Benznidazol .....	127.
- Fotos 6, 7 y 8.	Ensayo de intercambio de cromátidas hermanas .....	128.
- Fotos 9 y 10.	Ensayo de intercambio de cromátidas hermanas .....	129.
- Figuras 10 y 11.	Distribución de la frecuencia de ICH/metafase en linfocitos de bazo de ratones controles .....	130.
- Figuras 12 y 13.	Idem .....	131.
- Figuras 14 y 15.	Distribución de la frecuencia de ICH/metafase en linfocitos de bazo de ratones tratados con Nifurtimox .....	132.
- Figuras 16 y 17.	Idem .....	133.
- Figura 18.	Distribución del % de células con diferentes frecuencias de ICH/célula, en ratones controles y tratados con Nifurtimox .....	135.
- Figura 19.	Curva dosis-respuesta de inducción de intercambio de cromátidas hermanas(ICH) en linfocitos de bazo de ratones tratados con Nifurtimox .....	136.

### Objetivo del trabajo de tesis

Si un fármaco se administra al enfermo para controlar o eliminar la enfermedad, sería lógico saber si ese fármaco presenta efectos potencialmente nocivos para el hombre y si dichos efectos indeseables son de mayor o menor gravedad que la enfermedad en cuestión. Para el caso concreto de la enfermedad de Chagas, podría evaluarse la clínica de la enfermedad frente a los efectos colaterales tóxicos de los agentes quimioterapéuticos empleados en su tratamiento y estudiar en qué etapas de la enfermedad se efectúan dichos tratamientos, confrontando efectividad farmacológica con toxicidad.

El presente trabajo pretende contribuir al estudio de los efectos colaterales involucrados en la toxicidad a largo plazo de los compuestos químicos, evaluando la genotoxicidad de los antichagásicos, para aumentar los conocimientos en el tema y poder aportar información en relación con el planteo anterior.

I N T R O D U C C I O N

## ENFERMEDAD DE CHAGAS

El número de individuos que padecen la enfermedad de Chagas y más aún, la población potencialmente expuesta, alcanza cifras sorprendentemente importantes. Según la Organización Mundial de la Salud, la enfermedad afecta a varios millones de personas (WHO, 1981), con 10 millones de infectados en Sud América (Fairlamb, 1982) y 2,5 millones de enfermos en nuestro país (Medicina y Salud, 1981). En términos generales se considera que la enfermedad de Chagas afecta al 10-15% de la población argentina (OMS 1960; Bonet, 1972).

Son numerosos los investigadores e instituciones de Europa y América particularmente de América Latina, que se han preocupado y se preocupan en el estudio de la enfermedad de Chagas, tanto en la clínica como en el laboratorio y en el campo. "Médicos prácticos, patólogos, laboratoristas, biólogos, inmunólogos, entomólogos, ecólogos, epidemiólogos y salubristas han entregado valiosos aportes al mejor conocimiento y solución de las polifacéticas situaciones que esta parasitosis plantea" (Editorial: Bol. Chil. Parasit., 1969).

La enfermedad de Chagas se sitúa entre las entidades vinculadas al subdesarrollo socio-cultural y económico de pueblos o naciones, estando correlacionada estrechamente con las malas condiciones de la vivienda, el subempleo, la falta de tierra y de bienes de producción (Pinto Dias, 1984). Cabe agregar que la propia enfermedad agrava y contribuye a perpetuar este panorama social. En 1909, el médico brasileño Carlos Chagas (1879-1934), especialista en enfermedades infecciosas, descubre que un insecto hemíptero y hematófago estricto, es el vector de un protozoario flagelado y parásito, agente etiológico de los efectos patológicos de una nueva enfermedad, que lleva el nombre de su descubridor (Chagas, 1909).

El insecto es un Triatoma, conocido popularmente en América Latina como: "vinchuca", "chinche", "chipo", "barbeiro", "cupançã", "bicudo", "chinche gaucha", "vinchuca negra", etc., y como "kissingbug" en los Estados Unidos. Hasta el momento ya fueron descritas aproximadamente 100 especies de Triatominos, de las cuales 16 habitan en nuestro país, aunque no todas tienen importancia epidemiológica en la transmisión del protozoario (Medicina y Salud, 1981).

El protozoario, pertenece al género Trypanosoma, que parasita mamíferos y que generalmente necesita como hésped intermediario un insecto, que en el caso del Trypanosoma cruzi es un Triatomino.

A la enfermedad de Chagas se le pueden reconocer tres épocas: la primera, el descubrimiento de la enfermedad, su vector y su sintomatología. Luego el descrédito de Carlos Chagas y el olvido de la enfermedad. Más tarde el redescubrimiento de la parasitosis por parte del argentino Salvador Mazza en la década del 30. De allí la justa denominación de enfermedad de Chagas-Mazza (Sierra, 1978).

Los tripanosomas causan distintas y graves enfermedades en el hombre y animales domésticos de Africa tropical y de Sud América. Según que la transmisión sea salival o fecal, el género Trypanosoma se subdivide en los grupos Salivaria y Stercoraria respectivamente.

Una especie del primer grupo causa la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, y un parásito del grupo Stercoraria causa la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Con comprobación por diagnóstico inmunológico puede decirse que esta enfermedad se extiende desde los estados del sur de los Estados Unidos hasta la Patagonia Argentina, exceptuando las islas del Caribe, Belice, Guyana y Surinam (Acha y Sayfres, 1977).

En las tres últimas décadas, la enfermedad de Chagas ha sido reconocida como un grave problema de salud pública en muchas áreas de Sud América (Zeledón y Rabinovich, 1981). Además, por el número de enfermos, la amplitud del área que abarca, por la gravedad de las alteraciones cardíacas y de otros tipos que ocasiona y por su carácter endémico, la enfermedad de Chagas es uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país (Medicina y Salud, 1981).

Ciclo de transmisión (Pinto Días, 1984; Jörg, 1974; Medicina y Salud, 1981), (figura 1).

El Trypanosoma cruzi presenta dos estadios extremos, una forma alargada, sanguínea en el mamífero, flagelada, con quinoplasto terminal y membrana ondulante, llamada Tripomastigote; y otra forma, de menor tamaño, esférica, intracelular en el huésped, inmóvil, con flagelo embrionario no emergente y quinoplasto pequeño, sin membrana ondulante, llamado Amastigote. En esta forma el Trypanosoma tiene una alta capacidad de multiplicarse por división binaria. Así, en el mamífero, se suceden generaciones de ciclos sanguíneos e intracelulares.

Los Triatominos pueden vivir de la sangre de aves, reptiles, anfibios y mamíferos entre ellos el hombre, al que se circunscribe la siguiente descripción.

Los Triatominos infectados, tras sorber sangre en partes expuestas del individuo y durante la noche, expelen heces semilíquidas que contienen gran cantidad de formas infectantes del Trypanosoma cruzi, los Tripomastigotes. Estas formas pueden atravesar las mucosas, especialmente la ocular, penetrar a la dermis por microexcoriaciones de la piel consecuentes del rascado del hombre en la zona de la picadura o aún cruzar la piel sana en regiones con epidermis delgada. La picadura es indolora pero puede cau-



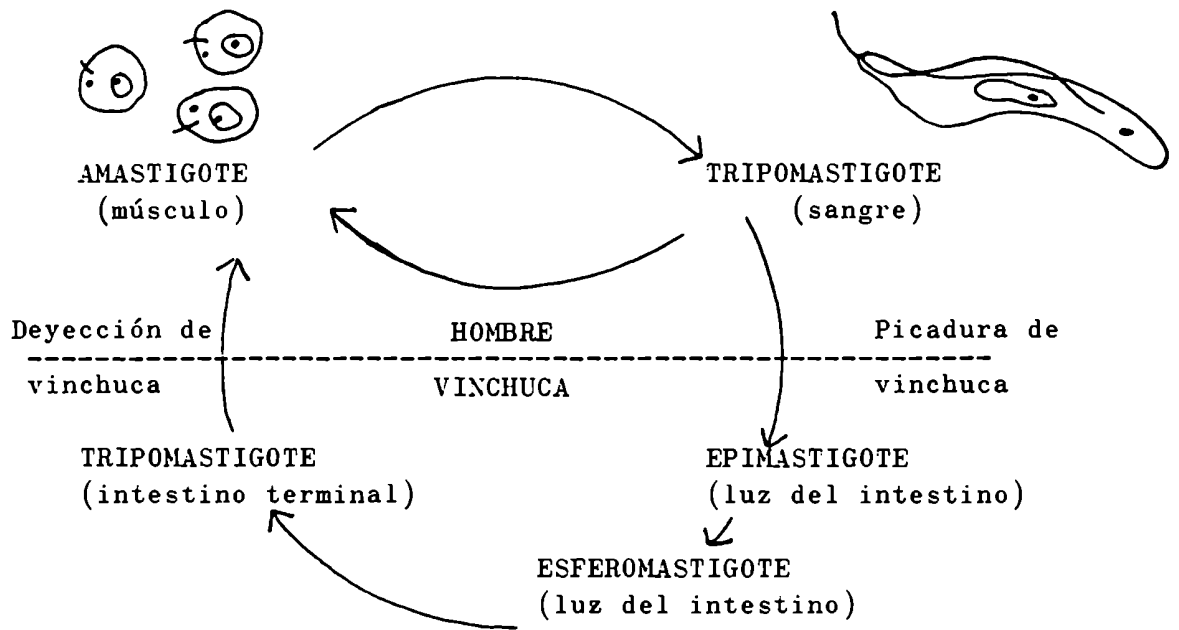


Figura 1: Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi. En el mamífero las generaciones se suceden por la alternancia de ciclos celulares y sanguíneos, en el insecto se produce la regresión del Trypanosoma de Epimastigote a Tripomastigote en la luz intestinal del tubo digestivo.

sar una reacción papulomatosa debido a componentes proteicos anticoagulantes y anestésicos de la saliva, inyectada por la estructura bucal del insecto. A continuación, estas formas flageladas penetran a tejidos para tener una fase intracelular obligatoria transformándose en Amastigotes. Estos se multiplican por división binaria y luego de un período de aproximadamente 5 días, el tejido libera nuevamente las formas flageladas de los parásitos. Estos penetran a la corriente sanguínea y se dispersan a varios órganos e invaden nuevas células. El cuadro patológico dependerá de qué células y órganos han sido parasitados.

Los individuos infectados, al ser picados por las vinchucas, darán origen al ciclo en el insecto, que se realiza en la luz del tubo digestivo donde los tripanosomas se suceden en una serie de formas intermedias y regresivas pasando por Epimastigotes, Esferomastigotes, rediferenciándose hacia el extremo terminal del intestino en nuevos tripanosomas infectantes, Tripomastigotes, que por las deyecciones de la vinchuca reinician el ciclo en el hombre.

Además de este mecanismo vectorial de transmisión hay otras vías probables: por vía transplacentaria, por hemotransfusión, por leche materna, por contaminación accidental en el laboratorio o por manejo de animales contaminados.

La transmisión por el vector y la transfusional son las vías predominantes de extensión de la enfermedad.

Etapas clínicas de la enfermedad (Jörg, 1974; Pinto Dias, 1984; Medicina y Salud, 1981).

Se observan dos etapas clínicas bien diferenciadas, establecidas por el grado de evolución que la afección ha alcanzado en el organismo: una

etapa inicial o aguda y una tardía o crónica.

La etapa aguda se inicia con la incorporación al organismo del Trypanosoma por cualquiera de las vías probables. La transmisión mediada por el vector es la vía predominante, involucrando el 80% de los casos. En éstos, en que la transmisión se efectúa por el vector, las lesiones cutáneo-mucosas suelen ser bastante importantes hallándose en el 60-80% de los casos un signo de entrada característico denominado "chagoma", generalmente se presenta en rostro y miembros, por ser las partes más expuestas al insecto durante el sueño. De estos chagomas el más típico de los descritos está caracterizado por un conjunto de manifestaciones que definen el Signo de Romana o complejo perioftalmo-ganglionar. Este fue descrito y estudiado por el investigador argentino Cecilio Romana y estadísticamente es el responsable del reconocimiento de más del 50% de los casos agudos. Los demás chagomas pueden presentarse en cualquier región de la piel, inclusive en el cuero cabelludo.

El tiempo de duración de esta fase aguda es de 2 a 4 meses y está caracterizada en líneas generales por un cuadro febril intenso, incipientes defensas humorales específicas, transitoriedad de los síntomas y signos y parasitemia abundante.

El período de incubación oscila entre los 4 a 10 días, siendo generalmente asintomático, este período es de mayor duración en los casos de transmisión transfusional.

Luego del período de incubación, en el niño de 0 a 2 años los síntomas más destacados de la fase aguda y sus porcentajes de incidencia son:

- a) Manifestaciones de puerta de entrada (perioftálmica y cutánea): 60%.
- b) Cuadro catarral de las vías respiratorias: 25%.
- c) Diarrea: 30%.
- d) Fiebre: 53%.

- e) Hepatoesplenomegalia: 60%.
- f) Anasarca: 22%.
- g) Macro o micro-poliadenopatía: más del 50%.
- h) Exantema.
- i) Chagomas o lipochagomas.

Se asocian a este síndrome general otros signos con compromiso del sistema nervioso central: inquietud, irritación, llanto continuo, insomnio, reflejos vivos, convulsiones y coma transitorio de tipo encefálico. Con frecuencia variable aparecen signos de participación cardíaca.

Al avanzar la edad, la frecuencia sintomática es menos abundante y de menor gravedad, si bien el repertorio no difiere del observado en edad más temprana. Pero esta menor gravedad no implica un riesgo menor ya que hasta un 40% de estos enfermos pasan a cronicidad.

La infección aguda en el adulto presenta así sintomatología muy atenuada, caracterizada por fiebre como síndrome principal, escalofríos, dolor de cabeza y músculos, malestar general e inapetencia, edema, adeno-hepato y esplenomegalia, con evoluciones aparentemente benignas, pero acompañadas con sepsis tumultuosas y miocarditis agudas o subagudas letales con amenaza de evolución hacia cardiopatía tardía. No obstante y, en general, el cuadro clínico de la fase aguda en el adulto se presenta oligosintomático configurándose una forma aguda inaparente, que dificulta en forma importante la detección de la enfermedad, facilitando su confusión con cuadros febriles discretos o pasajeros (virosis, gripes, etc.).

El cuadro agudo es poco frecuente ya que se estima que el 95% de los enfermos crónicos ha contraído la infección sin haberse diagnosticado en ellos un cuadro clínico de enfermedad aguda. (Barclay, 1978).

La tasa de mortalidad en esta etapa de la enfermedad oscila según los

autores entre 2 y 7% (Pinto Dias, 1984), 10% (OMS, 1960), siendo mayor el riesgo en los primeros años, con porcentajes entre 1 a 13,5% en los casos de 0 a 2 años (Jörg, 1974).

La detección de la fase aguda es muy importante, hay posibilidad de que lesiones graves tardías de la fase crónica dependan o se hayan originado en fenómenos ocurridos en el período agudo, adquiriendo excepcional importancia un tratamiento específico y precoz del paciente agudo.

Etapa crónica de la enfermedad de Chagas: Una vez concluido el período agudo, la gran mayoría de los pacientes pasan a una etapa clínicamente silenciosa y sin manifestaciones detectables conocida como fase crónica indeterminada. Esta puede persistir indefinidamente o evolucionar hacia una forma clínica definida en un tiempo aproximado de 10 a 20 años.

La etapa crónica está caracterizada por una parasitemia baja, el nivel de anticuerpos es elevado y persistente y el parásito queda restringido a una localización intracelular.

La fase crónica es la más frecuente en la práctica médica y la de mayor importancia en zonas endémicas. Las manifestaciones clínicas dependerán de la localización y extensión de las lesiones producidas durante el curso de la infección. En nuestro medio la cardiopatía, la esofagopatía y la colopatía chagásica son las principales formas clínicas de la fase crónica, siendo la cardiopatía chagásica crónica la más importante para el paciente chagásico y además, la principal causa de muerte.

## QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

### Quimioterápicos que se han empleado y se utilizan en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

En forma experimental y según los registros bibliográficos han sido ensayadas contra la tripanosomiasis cruzi más de 70 sustancias diferentes (Gutteridge, 1976). En general, el parásito ha demostrado ser resistente a compuestos activos contra enfermedades parasitarias relacionadas. Tal es el caso de algunos compuestos orgánicos metálicos (antimoniales) y diamidinas aromáticas usadas en la Leishmaniasis humana, y arsenicales aromáticos usados contra la tripanosomiasis africana. También los antipalúdicos como quinina, acridinas, 4-aminoquinilinas y pirimetamina mostraron ser inefectivos contra el Trypanosoma cruzi.

Cabe agregar que se han utilizado experimentalmente todos los antibióticos conocidos desde la primitiva penicilina, incluyendo al cloramfenicol, lincomicina, rifampicina, streptomina, puromicina, sulfonamidas, tetraciclinas, amoxicilina y otros, sin resultados estadísticamente válidos.

Las sustancias que mostraron ser lo suficientemente activas en la infección experimental con Trypanosoma cruzi como para considerar que podían ser empleadas en humanos son: 8-aminoquinolinas, bisquinaldina, fenantridinas, spirotriptan, nitrofuranos y nitroimidazoles (Jörg, 1974; Brener, 1975; Gutteridge, 1976).

Entre los derivados de las 8-aminoquinolinas, pentaquina, isopentaquina y primaquina demostraron ser efectivas en infecciones chagásicas en animales. Debido a su toxicidad las dos primeras no pudieron ensayarse en humanos. Por el contrario la primaquina se ha usado con éxito en

algunos casos, pero debido a su mala tolerancia fue luego retirada del mercado.

La primera de las bisquinaldinas empleadas fue Bayer 7602, con actividad tripanostática rápida e intensa, logrando mejorías súbitas. Sin embargo no mostró efectos tripanosomicidas por carecer de acción sobre la forma intracelular del parásito.

Las primeras fenantridinas fueron usadas ampliamente para tratar la tripanosomiasis africana. Se utilizó un grupo de compuestos relacionados en infecciones con Trypanosoma cruzi en ratones, logrando la supresión de la parasitemia, pero los ensayos clínicos en humanos fueron desalentadores.

El spirotrypan demostró ser decididamente tripanostático profundo pero hepato y neurotóxico.

De todos los derivados del nitrofurano ensayados, resultaron aplicables al hombre la nitrofurazona, la levofuraltadona (NF-602) y el Bayer 2502 (Nifurtimox). Inicialmente varios estudios comparan la tolerancia medicamentosa de la administración oral de estos tres fármacos, tanto para el período agudo (de Oliveira Ferreira, 1969), como crónico de la enfermedad (Marra, 1969). Los resultados indican que si bien estos nitrofuranos causan efectos colaterales indeseables (Marra, 1969), el Bayer 2502 (Nifurtimox) presenta la menor toxicidad. Y en efecto, fue este último el que se adoptó para el uso general.

Dentro de los nitroimidazoles, el metronidazol, utilizado para el tratamiento de infecciones por Trichomonas vaginalis, demostró actividad supresora en ratones infectados con Trypanosoma cruzi. Luego se dispuso de otro derivado nitroimidazólico que mostró ser mucho más efectivo en la actividad tripanosomicida, el Benzimidazol, que se sumó al Nifurtimox para el tratamiento en seres humanos.

Como puede inferirse de lo expuesto, el desarrollo y aplicación de los agentes quimioterapéuticos del Chagas ha resultado del análisis empírico del efecto de drogas convenientemente seleccionadas, más que del conocimiento previo de una acción selectiva del fármaco sobre mecanismos bioquímicos específicos del organismo infectante (Stoppani et al., 1981).

Resumiendo, de todas las drogas ensayadas con el fin de ser utilizadas en la enfermedad de Chagas, muchas de ellas demostraron una cierta capacidad para reducir la parasitemia, pero nunca al punto de erradicar la infección del hombre.

Actualmente se dispone entonces de un derivado nitrofuránico y de un derivado nitroimidazólico.

Así, con la introducción del Nifurtimox (Gönnert, 1972) y del Benznidazol (Richle, 1973), se tienen dos alternativas para combatir esta temible enfermedad (Litter, 1980).

NIFURTIMOX, NFX; (figura 2): 3 metil-4-(5' nitrofurfurilidien-amino)-tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido.

BENZNIDAZOL, BZ; (figura 2): N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida.

Qué se espera de una droga antichagásica?

" 1) La droga debe poseer una acción antiparasitaria potente y selectiva, y actuar sobre las formas amastigotes como sobre tripanosomas sanguíneos.

2) Ha de ser tripanocida, es decir exterminadora del parásito, más que tripanostática, o sea detener su crecimiento, para que la acción curativa sea rápida.

3) Debe actuar sobre las formas aguda y crónica de la enfermedad.



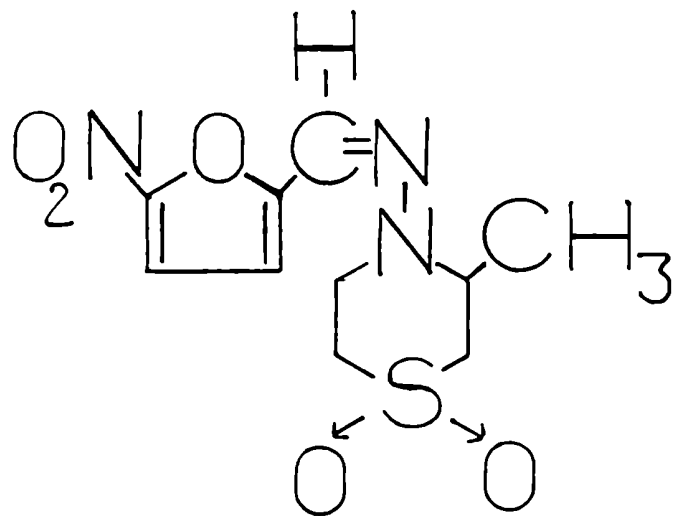
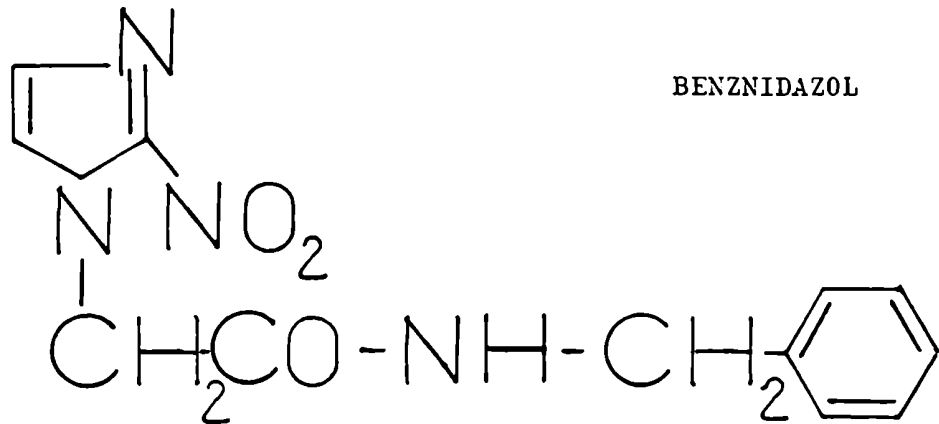


Figura 2: Fórmulas químicas de los fármacos antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol.

4) No ha de producir reacciones adversas de importancia ni fenómenos de sensibilidad alérgica.

5) No debe provocar el desarrollo de resistencia del microorganismo a la droga.

6) La farmacocinética del medicamento debe ser tal que sea fácil conseguir rápidamente niveles tripanocidas en la sangre, líquidos orgánicos y tejidos, que puedan mantenerse el tiempo necesario.

7) Debe distribuirse por todos los tejidos y penetrar en las células para poder actuar sobre las formas extra e intracelulares del parásito.

8) Debe poder administrarse y ser efectiva por todas las vías, bucal y parenteral.

9) Debe poder fabricarse en cantidades considerables, ya que la enfermedad de Chagas está muy extendida.

10) Ha de ser económica." (Litter, 1978).

NIFURTIMOX y BENZNIDAZOLHistoria, ensayos y hallazgos farmacológicos del Nifurtimox y Benznidazol.

Como sucede con todos los agentes quimioterapéuticos, el estudio de los fármacos antichagásicos debe efectuarse "in vitro" e "in vivo" en los animales y en el hombre (Litter, 1978).

El antichagásico NIFURTIMOX, nombre comercial Lampit (Bayer), fue sintetizado en 1962 por Herlinger, Mayer, Petersen y Bock en la "Farfenfabriken Bayer A.G." de Alemania.

Debe citarse que Packchanian fue el primero en fijar la atención sobre la actividad anti-Trypanosoma de 7 nitrofuranos en 52 ratones infectados experimentalmente y luego ensaya otros 47 derivados nitrofuránicos encontrando 4 con marcada actividad antitripanosomicida (Packchanian, // 1957).

Bock y colaboradores sintetizan una serie de 4-(5'-nitrofurfurilideno-amino) tetrahydro-4H-1,4-tiacina-1,1-dioxidenos sustituidos y combinaciones químicamente afines. Estudian su eficacia frente al Trypanosoma cruzi, encontrando relaciones entre estructura y eficacia, observando que una combinación de esa serie, el 3-metil-4-(5'-nitro furfurilideno-amino)-tetrahydro-4H-1,4 tiacina-1,1-dioxido (Nifurtimox), demuestra ser el de mayor actividad anti-Trypanosoma (Bock, 1972). La droga fue entregada por Bayer a diversos equipos de investigadores de Argentina, Brasil, Chile, El Salvador y Venezuela, que la ensayaron tanto en el campo de la experimentación animal como en clínica humana, parasitología y serología.

Esta cooperación de científicos Latinoamericanos con la industria productora permitió obtener una rápida evaluación inicial de las cualidades del NFX.

El Nifurtimox es un polvo amarillo, insoluble en agua, de peso molecular 287. Los estudios de la farmacocinética en rata y perro con <sup>35</sup>S-Nifurtimox, muestran que la absorción es altísima y que es metabolizado por completo en ambas especies. En la rata, con dosis de 2,5 a 250 mg/kg p.o., en 48 hs. se elimina por riñón el 50-60% del compuesto, y por heces un 30-40% (Duhm et al., 1972).

La eficacia anti-Trypanosoma del NFX fue comprobada "in vitro" (Gönnert y Bock, 1972) en cultivos de células HeLa de 1-2 días inoculados con 200.000-400.000 tripanosomas/ml de medio de cultivo. El NFX actúa sobre la forma de amastigote intracelular del parásito y sobre la forma extracelular. Las observaciones al microscopio electrónico acerca de la acción del NFX sobre el parásito en cultivos de células HeLa indican que, a las 8-10 hs de la aplicación del compuesto ya se observan las primeras alteraciones visibles de los parásitos con vacuolización y condensación local a nivel de la mitocondria. Hacia las 72 horas aumentan constantemente las lesiones citoplasmáticas irreversibles y luego de 3 días la mayoría de las células parasitadas están destruidas totalmente (Voigt et al., 1972).

La bibliografía también informa sobre los efectos tripanosomicidas del NFX en la experimentación animal en estudios con ratones, ratas, hamsters, cobayos, gatos y perros (Haberkorn y Gönnert, 1972; Bock et al., 1969). Su acción es independiente de la especie animal y mostró ser plenamente eficaz contra 8 cepas distintas de Trypanosoma cruzi en la infección animal aguda.

En animales, la DL50 de NFX, en dosis oral única, para ratones y ratas es de 3000-4000 mg/kg, para conejos de 2000 mg/kg y para perros y gatos es superior a 2000 mg/kg (Hoffman, 1972).

En estudios de tolerancia, durante 26 semanas, con el NFX administrado en el alimento, la rata mostró ser la especie más sensible al tratamiento, una dosis de 400 mg/kg determinó en la tercera semana de tratamiento graves síntomas neurológicos con muerte de una fracción de animales, y suspensión del tratamiento en ratas a partir de la cuarta semana (Hoffman, 1972).

Además de las lesiones neurológicas varios autores encuentran lesiones en glandulas germinales en los machos, con inhibición de la espermatogénesis en ratas y ratones con dosis superiores a 100 mg/kg (Hoffman, 1972), con alteraciones ultraestructurales en el testículo, principalmente a nivel de las células de Sertoli (Moreno et al., 1980; Bernacchi et al., 1984), y formación de espermatozoides anormales en ratones tratados con ambos fármacos (Navarro y Nagel, 1984). Otros autores informan sobre alteraciones ultraestructurales significativas en ovario de rata por tratamiento con NFX y BZ (Castro et al., 1985).

En seres humanos, se informa sobre la efectividad del NFX tanto en el período agudo como crónico de la enfermedad (Wegner y Rohwedder, 1972 a; Wegner y Rohwedder 1972, b; Schenone et al., 1969; Cichero et al., 1969) o ausencia de efectividad (Ejden, 1969). En casos agudos se han obtenido resultados aparentemente muy buenos en Argentina y Chile con reducción total de la parasitemia y negativización de los exámenes serológicos. En los casos crónicos sólo se observó la negativización del xenodiagnóstico (examen parasitológico) en la casi totalidad de los pacientes (Pinto Días, 1984). Los resultados son menos alentadores en ensayos brasileños. En estudios de Boainain el NFX no fue eficaz en el 55% de los casos en la supresión de la parasitemia (Boainain, 1979). La diferencia de resultados con respecto a otros autores indicaría la existencia de cepas diferentes de Trypanosoma cruzi, con diferente grado de sensibilidad a la droga (Boainain, 1979).

Otros autores, en estudios realizados con 57 pacientes tratados con NFX, informan que la positividad del xenodiagnóstico durante el período de administración decae de un 49% a un 3,5% sugiriendo un probable efecto supresivo. Sin embargo, un 69,2% de los pacientes aún tienen el xenodiagnóstico positivo en el periodo de post-tratamiento comparado con un 75% del grupo placebo (Cançado et al., 1975).

Puede apreciarse que no existe uniformidad en los resultados de tratamientos en humanos con Nifurtimox.

El antichagásico BENZNIDAZOL, nombre comercial Radanil (Roche), fue sintetizado por Wineholt y Liebman en los laboratorios de Hoffman-La Roche en Nutley, Nueva Jersey.

Es un polvo fino, cristalino, de color blanco amarillento, inodoro, insoluble en agua y ligeramente soluble en etanol al 100%, de peso molecular 260,25.

Richle, del departamento de investigaciones F.Hoffman-La Roche & Co., informa sobre la actividad quimioterapéutica del BZ sobre Trypanosoma cruzi evaluada "in vitro", tanto en suero bovino-glucosa-hemoglobina (Trypanosoma cruzi  $3-5 \cdot 10^6$ /ml), como en cultivo de tejidos. El fármaco destruyó al parásito en concentraciones de 3-8 ug/ml (Polack y Richle, 1978).

Otros estudios "invitro" detectan el efecto anti-Trypanosoma del BZ mediante un efecto deletéreo del fármaco sobre las formas intra y extracelulares en cultivos de células HeLa. Los resultados muestran picnosis nuclear, fragmentación y lisis del parásito a dosis tan bajas como 10 ug/ml. La droga parece tener efecto dañino solamente sobre los parásitos y no sobre las células en cultivo (Yoneda et al., 1977).

Los efectos anti-Trypanosoma en condiciones "in vivo" fueron demostrados experimentalmente en animales (Richle, 1973).

El autor evaluó la capacidad quimioterapéutica del BZ en Chagas agudo experimental en ratones infectados intraperitonealmente con 80.000-100.000 formas sanguíneas de Trypanosoma cruzi. En tratamientos con BZ en diferentes dosis, de 250 a 1000 mg/kg., los Trypanosomas desaparecen de sangre y el exámen histológico de corazón, músculo, hígado y bazo a los 3, 19 y 36 días después del tratamiento revela una completa destrucción de las formas hísticas. Más tarde, otros autores confirman estos resultados (Pollack y Richle, 1978). Asimismo, se demostró que el BZ es un agente anti-Trypanosoma en la infección experimental de rata y hamster.

Los estudios de farmacocinética en el hombre demuestran que la absorción de la droga es rápida y constante. La vida media del compuesto es de 12 hs. tiempo que se considera apropiado para un agente quimioterapéutico que debe ser administrado en un esquema repetido.

Para investigar el metabolismo y la excreción se utilizó Benznidazol bajo forma del compuesto marcado con  $^{14}\text{C}$  en la posición 2 del anillo imidazólico. En el hombre la mayor proporción de la droga se excreta por orina (60-70% hasta el tercer día), y una proporción menor en las heces (22-28%).

Con respecto a los datos sobre toxicidad aguda, los valores de DL50 son 8.000 mg/kg para rata y ratón p.o., y menores para i.p., 3.100 mg/kg. para ratón y 3.900 mg/kg. para rata.

Los resultados que se poseen sobre estudios clínicos del Benznidazol en seres humanos, están obtenidos de estudios realizados principalmente en Argentina, Brasil y Chile en donde la enfermedad es endémica. Los datos muestran supresión de la parasitemia por BZ (Boainain, 1979; Barclay, 1980; Lugones, 1978; de Oliveira Ferreira, 1976). En casos agudos tratados en Argentina, los autores demuestran la negativización de las reacciones se-

rológicas, así como supresión de la parasitemia. Efectos más favorables se dan en los casos observados en Brasil. Para pacientes con Chagas crónico se observan resultados similares a los obtenidos con NFX, es decir, persistencia de positividad serológica (Pinto Dias, 1984).

Desafortunadamente estos dos fármacos presentan efectos colaterales adversos y es en este punto donde se introduce el concepto toxicológico, ya que es ésta el área de la ciencia que por definición le compete. De acuerdo con la Sociedad de Toxicología de EE.UU. "La Toxicología es la ciencia que estudia las interacciones nocivas entre las sustancias químicas y los seres vivos".

Efectos colaterales adversos que se evidencian en el hombre bajo tratamiento con estos antichagásicos.

Para 36 pacientes tratados con NFX 10 mg/kg/día, durante 60 días, en Brasil, se informa anorexia (95%), polineuropatías (36%), debilidad general (36%), vómitos (33%), gastralgia (28%), insomnio (19%), dermatitis (14%) (Boainain, 1979).

El mismo autor observa en 16 pacientes tratados durante 60 días con BZ 10 mg/kg/día, polineuropatías (81%), dermatitis (50%), anorexia (37%), náusea y vómito (25%), insomnio (25%), confusión mental (12%) e hipoacusia (6 %).

Si la dosis del BZ se reduce a la mitad, es decir, 5 mg/kg/día durante 60 días, los efectos colaterales que se observan en grupos de igual número de pacientes, son polineuropatías (43%), anorexia (24%) e insomnio (6%).

Laplumé, en Argentina, informa para el BZ un mayor número de reacciones cutáneas del tipo de toxidermia medicamentosa y para el NFX un mayor nú-



mero de efectos colaterales del tipo de anorexias, gastralgia, excitación psíquica, vómitos y cefaleas (Laplumé et al., 1982).

En grupos de 73 casos agudos y 58 pacientes crónicos tratados con BZ, se observan efectos secundarios en el 17% de los casos agudos y en el 36% de los casos crónicos (Barclay, 1977).

Reafirmando, los resultados de tratamientos en seres humanos demuestran que tanto en tratamientos agudos como crónicos el NFX (Schenone et al., 1982; Cançado et al., 1969; Bocca Tourres, 1969; Lugones et al., 1969), y el BZ (Levi et al., 1975; de Oliveira Ferreira, 1976) presentan efectos colaterales adversos.

Con el fin de disminuir esta intolerancia a los dos fármacos, varios autores ensayan con éxito la administración simultánea del BZ con el ácido tióctico (Carpintero, 1983) o con prednisona más un comprimido diario de complejo vitamínico B como coadyuvantes (Sierra Iglesias y Sierra Guzmán, 1979).

Como se puede extraer de todo lo expuesto, y a la luz de los resultados de la administración clínica de estos fármacos, se conocen bondades de los mismos y también efectos colaterales adversos, que corresponden a efectos tóxicos agudos.

Como se sabe, los efectos tóxicos pueden ser, efectos tóxicos agudos o efectos tóxicos crónicos. Efectos tóxicos agudos son los que se presentan en forma relativamente inmediata luego de la administración de una dosis suficiente de la droga. En nuestro caso, los efectos agudos relatados, desaparecen espontáneamente con la suspensión del medicamento (Pinto Dias, 1984), es decir, que son una reacción inmediata a la administración de la droga. Los efectos tóxicos crónicos son los que se presentan como consecuencia de una exposición repetida a pequeñas cantidades del tóxico en un

período largo de tiempo. Particularmente importantes en la toxicidad a largo plazo son los efectos tóxicos que se manifiestan luego de un largo período de latencia como son los efectos mutagénicos y carcinogénicos (Ariëns et al., 1976).

En general, los riesgos del uso de fármacos y mezclas de los mismos resultan claros y conocidos para los efectos indeseables a corto plazo. No existe un conocimiento equivalente para los efectos de los fármacos a largo plazo, en particular su potencial efecto carcinógeno. Ello es particularmente inquietante (Castro, 1983).

#### Antecedentes de toxicidad a largo plazo del Nifurtimox y Benznidazol.

Poco se sabe sobre los efectos a largo plazo del NFX y BZ, no obstante la importancia obvia que este conocimiento tiene.

Experimentar y elaborar información al respecto es necesario y útil si contemplamos que ambos, NFX y BZ, son nitroheterociclos y que existe una preocupación creciente respecto de la mutagenicidad y carcinogenicidad de estos compuestos (Van den Bossche, 1978; Gutteridge, 1976), y llamados de atención o alerta específicamente para los antichagásicos NFX y BZ en revisiones sobre cánceres de origen medicamentoso (Castro, 1983). Esta preocupación está basada en estudios que informan sobre acción mutagénica de nitrofuranos (Mc Calla, 1974; Tonomura y Sasaki, 1973; Yahagi et al., 1976; Morris et al., 1969; Cohen et al., 1975) y de nitroimidazoles (Voogd, 1981; Legator et al., 1975; Hite et al., 1976; Cohen et al., 1973; Rustia y Shubik, 1972).

Los trabajos citados comprenden evaluaciones sobre actividad genotóxica potencial de nitrofuranos y nitroimidazoles en diferentes sistemas

bacterianos de prueba, aberraciones cromosómicas en cultivos celulares, estudios de carcinogénesis en animales y toda una variedad de medios para ensayar mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad potencial con resultados correctamente analizados en las revisiones de Mc Calla sobre nitrofuranos y de Voogd sobre nitroimidazoles (Mc Calla, 1974; Voogd, 1981).

Retomando los dos fármacos que nos competen en este trabajo, NFX y BZ, la limitada bibliografía hallada respecto a posibles efectos genéticos, comprende:

Para el Nifurtimox, se han efectuado estudios de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en Drosophila melanogaster, ruptura cromosómica en médula ósea de ratas Wistar y cambios en el índice mitótico en células de raíces de Allium cepa (Spanó y Takahashi, 1981).

Se han realizado estudios de mutagénesis en diferentes sistemas bacterianos: NFX en Escherichia coli (Ohnishi et al., 1980), BZ en Klebsiella pneumoniae (Voogd et al., 1975) y ambos en Salmonella typhimurium (Nagel y Nepomnaschy, 1983).

En estudios citogenéticos en cultivos de 48 hs. de linfocitos humanos de dadores normales y de pacientes con Xeroderma pigmentosum no se evidenció daño genético por NFX y BZ. Por el contrario, se encontraron resultados positivos en cultivos de 72 hs. de linfocitos de un paciente con X. pigmentosum tratado con NFX (Dain et al., 1983).

No pudo encontrarse bibliografía sobre estudios de carcinogénesis y embriotoxicidad para el Benzimidazol. Por el contrario, el NFX administrado a ratas y ratones en dosis de 20 a 125 mg/kg. daña las crías, con disminución del peso de los fetos, sin llegar a malformaciones (Lorke, 1972). Los ratones toleran el tratamiento mejor que las ratas. Si bien es sabido que diversos derivados de nitrofurano son intensamente cancerígenos en

la rata, otros a su vez no muestran resultados concluyentes. Los resultados de estudios de carcinogénesis en rata para el Nifurtimox, muestran que la frecuencia de tumores benignos, preponderantemente fibroadenoma de mama, está nítidamente aumentada, si bien la incidencia de tumores benignos ya es elevada en las ratas controles en las cuales de 50 animales un 30% presentó tumores benignos y un 32% tumores malignos. Con la administración oral de 11,7 g/kg de NFX en 50 ratas se observó un 94% de tumores benignos y un 24% de tumores malignos (Steinhoff y Grundmann, 1972).

Análisis de la eficacia de los antichagásicos frente a la presencia de efectos colaterales.

Se pretendió dar un panorama del uso y efectos del NFX y BZ. La bibliografía indica que los mejores resultados terapéuticos con las drogas tripanosomicidas hoy disponibles se obtienen en la etapa aguda de la enfermedad. Los estudios parasitológicos, inmunológicos y clínicos realizados hasta el presente no demuestran utilidad de las mismas en la infección crónica (Programa de Salud Humana, 1983). Si bien otros autores informan efectividad de las drogas tripanosomicidas actuales en el tratamiento crónico de la enfermedad (Carpintero, 1983; Barclay, 1980; Gönner, 1972) resulta difícil una correcta generalización porque los resultados en la fase aguda varían en los distintos países, y ello es posible debido a una diferencia en las características de distintas cepas de Trypanosoma cruzi, dosis empleadas y esquemas de administración. Por otro lado, existen diferencias de criterio de curación en la enfermedad de Chagas en lo referido principalmente a la etapa crónica.

En términos generales se deben considerar tres facetas para decidir curación o no de una enfermedad (Tchoulamjan, 1978), evolución clínica, agente etiológico y patente inmunológica.

Si bien estos dos antichagásicos demuestran ser efectivos en los dos primeros puntos, en el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas en donde se recurre a la fijación del complemento, inmunofluorescencia, aglutinación y composición de inmunoglobulinas para citar algunas técnicas, el NFX y el BZ no negativizan, en general, los resultados. Es decir que al contrario de lo que ocurre para la tripanosomiasis aguda, los métodos serológicos fracasan en el estadio de infección crónica como parámetro del efecto antiparasitario de un antichagásico y se recurre a métodos parasitológicos, como el xenodiagnóstico, para demostrar acción terapéutica.

Las diferencias de opiniones entre los autores respecto de este criterio de curación, evaluando el efecto terapéutico por evolución serológica (Cerisola, 1969) o por serología más xenodiagnóstico (de Oliveira Ferreira, 1976), conduce a una diferencia en el análisis de los resultados, en la evaluación sobre la efectividad de estas drogas y en el uso de las mismas principalmente en el período crónico de la enfermedad.

Si a un enfermo en la faz crónica se le estudia la patente inmunológica y se certifica que todo es crónico, haciendo la búsqueda de posible parasitemia en esta situación, donde no hay clínica, donde la clínica es por reacción de choque antígeno-anticuerpos, o es residual de una fibrosis reaccional, no tiene justificación un tratamiento desde el momento en que esta patente inmunológica no cede después de la medicación (Tchoulamjan, 1978).

Del análisis de eficacia quimioterápica frente a los efectos colaterales del BZ y NFX es que algunos autores opinan que: Hasta ahora no se dispone de un agente quimioterápico totalmente satisfactorio para todas

las formas de la enfermedad, en particular la forma crónica (Stoppani et al., 1981; Gutteridge, 1976).

Resumiendo, y a los fines del presente trabajo, se extrae de la literatura que la detección de las formas agudas de la enfermedad es baja ya que ésta solo es más aparente en los más jóvenes y que el tratamiento que generalmente es eficaz debe ser precoz para prevenir las patologías de la fase crónica. Por otro lado, la infección chagásica crónica es la más frecuente en la práctica médica y, en relación a la atención de los infectados crónicos, no existe un criterio uniforme respecto del uso y efectividad de drogas tripanosomicidas en el tratamiento específico de los enfermos, los que sí reciben un tratamiento sintomático de acuerdo a los órganos lesionados.

Si se cuestiona la efectividad de estos fármacos en la etapa crónica de la enfermedad, que engloba a su vez el mayor número de pacientes en la práctica médica, y ante la presencia de efectos colaterales tóxicos es que surge el planteo del objetivo del trabajo de tesis.

De aquí se extrae la importancia de investigar sobre la actividad genotóxica de los antichagásicos. Así nos introducimos en una parte de la ciencia que surge en esta última década, la Toxicología genética, analizando tres fenómenos importantes en relación a la salud humana, Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis.

## MUTAGENESIS Y SU RELACION CON CARCINOGENESIS Y TERATOGENESIS

Se define mutagénesis como un cambio heredable, que puede ocurrir a través de un cambio directo o indirecto en el mensaje genético (Singer, 1983).

Las mutaciones pueden originarse por la acción directa de distintos agentes sobre el material genético, o indirectamente, a través de efectos sobre componentes celulares ligados a éste funcionalmente, como por ejemplo los que participan en la división celular (centríolo y microtúbulos), proteínas de la cromatina y las enzimas que contribuyen a la replicación o reparación del ADN (Nava, 1980).

Las alteraciones genéticas que conducen a mutaciones pueden ser (Nava, 1980): alteraciones intragénicas, que ocurren en los genes, y alteraciones que involucren a los cromosomas. Entre las alteraciones intragénicas existen, la sustitución de bases, que puede resultar del reemplazo de una base por otra del mismo tipo, transición, o por otra de tipo diferente, transversión, y el corrimiento de bases o corridas de puntuación causado por la adición o remoción de bases de una secuencia codificada tal que el tramo de referencia sea modificado.

Las anomalías que se refieren a grupos de genes o cromosomas pueden deberse a aberraciones estructurales, tipo cromátida y tipo cromosoma, reordenamientos (inversiones, traslocaciones, etc.) y eliminación o adquisición de cromosomas completos como en las aneuploidías y poliploidías.

La carcinogénesis también involucra cambios celulares irreversibles, que llevan en este caso a una transformación maligna de las células, con proliferación descontrolada de las mismas.

Varias disciplinas interaccionan en el estudio de los mecanismos de la carcinogénesis, la citogenética, genética de células somáticas, gené-

tica molecular, reparación del ADN, epidemiología, virología, transformación química, inmunología y biología molecular (Nichols et al., 1982).

La relación entre mutagénesis y carcinogénesis es que los dos procesos comparten un sustrato final común a ambos que es el ácido desoxirribonucleico (ADN) (De la Iglesia et al., 1980), y se manifiestan en el individuo después de un largo período de latencia. Los estudios de mutagénesis y carcinogénesis intentan detectar alteraciones o lesiones en el ADN. El concepto general es que si el ADN está dañado de algún modo, existe la posibilidad de que la mutación ocurra, y por ende cualquier agente que dañe al ADN es un mutágeno potencial (Painter, 1981). Por otro lado, las alteraciones al ADN también están de uno u otro modo involucradas con la inducción del cáncer. Esta es la base para suponer que los carcinógenos pueden ser detectados como consecuencia de daño al ADN en sistemas celulares simples (Bridges, 1976).

La teoría indica entonces que la mutagénesis y la carcinogénesis están relacionadas. En la práctica muchos carcinógenos típicos han demostrado ser mutágenos en el ensayo de Ames para detectar mutágenos (Mc Canh et al., 1975), que es sin duda el más extensamente usado y con mayor número de publicaciones y compuestos ensayados.

Por todo ello es que se usa la mutagénesis como ensayo preliminar para inferir carcinogénesis y esta relación ha inducido al desarrollo de una gran cantidad de ensayos de corto plazo para la detección de mutágenos y carcinógenos ("Short-term tests for carcinogens and mutagens").

Considerando que la correlación entre mutagénesis y carcinogénesis no es absolutamente completa, un efecto mutagénico detectado mediante estos ensayos sólo puede sugerir en mayor o menor grado la probabilidad de ocurrencia de un efecto cancerígeno del agente en estudio. De todos modos,



es importante hacer notar que no obstante percibirse mucho más respeto por los efectos cancerígenos que mutagénicos es de considerar que éstos pueden desencadenar consecuencias tan serias como las inducibles por aquellos.

Un mutágeno puede estar involucrado en procesos de teratogénesis, que originan anomalías del desarrollo en el feto. Las malformaciones pueden ser inducidas por agentes que actúan sobre el material genético de las células germinales, mutágenos, o por agentes que dañan los tejidos somáticos del organismo en desarrollo, teratógenos. La mayoría de los mutágenos son también teratógenos, sin embargo la inversa no se cumple necesariamente (Fraser y Nora, 1986).

No se tienen dudas de que existe una correlación positiva entre crías malformadas originadas por células germinales mutadas por un lado y malignidad como consecuencia de la mutación somática por otro lado (Schmid, 1976 a).

Todo esto nos indica una cierta relación de la teratogénesis con la mutagénesis y la carcinogénesis, y que estos efectos adversos a la salud humana pueden resultar de una sobreexposición a compuestos químicos que alteran el material genético (Legator y Rinkus, 1981).

Detección de mutágenos y carcinógenos químicos.

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) asegura que el 80% de los cánceres humanos tienen origen ambiental; así lo detectan los estudios epidemiológicos basados en las variaciones geográficas del cáncer (Higginson, 1969). Las poblaciones humanas están expuestas a tan alto número y amplia variedad de compuestos como nunca antes había ocurrido en la historia del hombre (Committee 17, Council of the Environmental Mutagen Society, 1975). El Servicio de Resúmenes Químicos (CAS) de la Sociedad Americana de Química reúne en 1977, 4.039.907 compuestos (Maugh, 1978).

"Más de cuatro millones de compuestos químicos han sido sintetizados o aislados de materiales naturales. Más de 55.000 se producen comercialmente y cerca de 1.000 nuevos compuestos se introducen anualmente. Más de 2.000 productos químicos son sospechados carcinógenos en animales de laboratorio y la evidencia epidemiológica sugiere que 26 son carcinógenos en el ser humano. Más de 20 agentes han demostrado estar asociados con defectos congénitos en el ser humano. Cuarenta y siete contaminantes atmosféricos han sido identificados como carcinógenos reconocidos en estudios con animales mientras que 128 lo han sido como mutágenos. De los 765 contaminantes identificados en el agua potable, 12 fueron caracterizados como carcinógenos, 31 como carcinógenos probables y 59 como mutágenos" (Public Health Reports Supplement, 1983).

Así es como sustancias o aditivos pueden estar contaminando nuestras áreas de trabajo, nuestros alimentos y bebidas, el aire, los fármacos que ingerimos. Todo esto, sumado a los carcinógenos naturales como el sol, los hábitos como el fumar o el modo de preparar nuestros alimentos, hace que casi todos los aspectos de nuestra vida moderna nos expongan a riesgos para la salud. Muchos se expresan luego de 20 o 30 años de la exposición, como el cáncer y otros daños a distintos órganos (Garfield, 1982).

Es evidente que de algún modo deben poder evitarse, prevenirse o aminorarse esos riesgos.

Desafortunadamente muchos de los efectos genotóxicos se detectan a través de la epidemiología cuando un sector de la población ya está afectado. Así, los estudios de la carcinogénesis química se inician en 1775 con las observaciones del médico inglés Percivall Pott sobre la incidencia de cáncer de escroto en los deshollinadores de chimeneas. Los epidemiólogos han aportado más casos de carcinógenos, estableciendo relaciones de causa y efecto por medio del estudio de miles de casos. Por ejemplo, el hábito de fumar y el cáncer de pulmones; la 2-Naftilamina, 4-aminobifenil, benzidinas y el cáncer de vejiga, o los cánceres de pulmón por asbestos, compuestos de cromo o de níquel (Miller, 1970). Es importante señalar que los datos epidemiológicos aún cuando son insustituibles para proveer información directa sobre el efecto en la salud pública, se obtienen tardíamente, cuando se ha afectado el patrimonio hereditario de la población expuesta (Nava, 1980). Debería poder predecirse la potencial genotoxicidad de los compuestos químicos para prevenir la exposición individual o colectiva a efectos mutagénicos y/o carcinogénicos.

Los métodos más comunmente usados para predecir la potencial carcinogenicidad de una sustancia orgánica en el hombre son: primero, examinar su estructura química para encontrar similitud con otros carcinógenos humanos o experimentales conocidos; segundo, a partir de una correlación positiva con lo anterior, realizar estudios de carcinogénesis en animales. Así, es posible identificar, en la mayoría de los casos, nuevos análogos de carcinógenos ya establecidos y, en menor proporción, nuevos carcinógenos (Purchase et al., 1976).

La mejor alternativa es efectuar ensayos de carcinogénesis de largo plazo con mamíferos de laboratorio. De este modo los estudios en animales

pueden ser usados para identificar potenciales carcinógenos para el hombre.

En estos bioensayos se expone a los roedores a distintas dosis de un agente tóxico. La máxima dosis tolerable (MTD) es la mayor cantidad de sustancia que puede ser administrada o inyectada al roedor sin ocasionar más de un 10% de pérdida de peso, muerte por envenenamiento o efectos clínicos laterales no relacionados con cáncer o mutación genética. Los animales son tratados con las máximas dosis tolerables con el fin de disminuir el período de latencia de la formación del tumor (Stoltz et al., 1974). Con este diseño, que incluye cientos de animales, se intenta determinar los posibles efectos de bajas dosis de carcinógenos actuando por un largo período en poblaciones humanas de millones de individuos (Stoltz et al., 1974).

Esta experimentación con altas dosis plantea muchos interrogantes, ya que muchos procesos como reparación, absorción, efectos de membrana, o interacción con otras organelas pueden estar modificados a causa de los distintos niveles de concentración que la droga alcanza en el organismo y por ende conducir a un número de mutaciones diferentes de las que ocurren naturalmente (Sobels, 1977).

De allí que grupos de matemáticos estudian y proponen una variedad de modelos estadísticos para extrapolar a pequeñas dosis los resultados de altas dosis administradas a animales, para poder estimar el riesgo carcinogénico (Armitage, 1982).

Durante el tratamiento, los animales son observados hasta que mueren espontáneamente o son sacrificados, se les efectúan autopsias exhaustivas para conocer qué órganos, tejidos y/o células presentan tumores, lesiones y mutaciones genéticas. Si la incidencia de tumores en el grupo

expuesto es estadísticamente mayor que en el grupo sin tratamiento, la sustancia se considera un carcinógeno (Interagency Regulatory Liabison Group, 1979). Estos ensayos presentan problemas de interpretación, debido a factores modificadores como la dieta, variaciones en la incidencia de tumores espontáneos o inducidos, especies, razas, sexo. Otra gran desventaja de los ensayos en animales es el altísimo costo, duración de tales estudios y, por ende, las altas demandas de animales y provisiones del laboratorio (Purchase et al., 1978).

En cifras, los ensayos de carcinogénesis en animales implican 300.000 dólares para cada sustancia química y el tiempo que se necesita es de aproximadamente 3 años (Hollstein et al., 1979).

A pesar de los problemas inherentes a estos ensayos a largo plazo, no hay duda de que mediante estudios crónicos en animales pueden detectarse la mayoría de los carcinógenos químicos potenciales y que los resultados de tales estudios no pueden ser refutados fácilmente (Shubick, 1983).

Así como en los años 60 se instituyeron y propagaron los bioensayos de carcinogénesis, hoy la adaptación indica adoptar un esfuerzo razonable para predecir efectos a largo plazo con estudios de corto plazo (De la Iglesia et al., 1980; Bridges, 1976; Purchase et al., 1978; Garfield, 1982).

Los ensayos de corto plazo se conocen en términos científicos desde hace 45 años o más, pero han sido usados con otro fin, para estudios de inducción en la investigación del cáncer y no para la detección de compuestos carcinógenos, como hoy se los emplea (De la Iglesia et al., 1980).

Los mutágenos y carcinógenos ambientales pueden tener dos efectos

importantes en humanos (Nagao, et al., 1978):

- 1) causar mutaciones en células germinales que resultan en la acumulación de genes anormales heredables en la población, y
- 2) causar mutaciones en células somáticas que resultan en la formación de células cancerosas en los individuos;

por lo tanto, los objetivos básicos de estos ensayos de corto plazo son (De la Iglesia et al., 1980):

- 1) Predecir carcinogénesis a largo plazo en mamíferos para lograr una identificación temprana del órgano blanco.
- 2) Establecer la potencial actividad mutagénica en las células germinales.
- 3) Detectar reacciones directas o indirectas con el material genético.

Se han desarrollado un alto número de métodos imaginativos para detectar mutágenos y carcinógenos químicos potenciales a través de la interconexión útil de distintas ramas de la ciencia, bioquímica, genética, biología celular y molecular y otras.

El común denominador que justifica la validez del desarrollo de estos ensayos es el factor económico. Si se pueden predecir, con un alto grado de certeza, los resultados de bioensayos de carcinogénesis de largo plazo, se pueden evitar costos, demoras innecesarias y la ejecución de un alto número de experimentos en el desarrollo de drogas.

La literatura reúne más de 100 ensayos de corto plazo con este fin, cada uno con sus ventajas y desventajas. Merece citarse al respecto la revisión de Hollstein et al.: "Short-term tests for Carcinogens and Mutagens" (Hollstein et al., 1979). A continuación se enumeran suscintamente la mayoría de los ensayos desarrollados, a los fines de dar un panorama general. Luego se describen detalladamente los tres ensayos empleados en es-

te trabajo de tesis: ensayo de unión covalente de compuestos químicos con macromoléculas celulares, ensayo del micronúcleo y ensayo de intercambio de cromátidas hermanas.

Ensayos de corto plazo para mutágenos y carcinógenos químicos

Hollstein sitúa los distintos ensayos de corto plazo dentro de seis sistemas de estudio diferentes:

- 1) Ensayos con microorganismos procariotas, fagos, etc.
- 2) Ensayos con microorganismos eucariotas.
- 3) Ensayos con células de mamíferos en cultivo.
- 4) Ensayos con insectos.
- 5) Ensayos "in vivo" con mamíferos.
- 6) Ensayos citogenéticos.

1) Ensayos con microorganismos procariotas, fagos, etc.

Dentro de este grupo los más difundidos son los que emplean bacterias, y de éstas las cepas de Salmonella typhimurium desarrolladas por Bruce Ames son las más ampliamente usadas.

El ensayo con Salmonella (Ames et al., 1973) está basado en la utilización de cepas mutadas con incapacidad de crecer en medios sin agregados del aminoácido histidina. Se mide la reversión de auxótrofos, contando el número de colonias revertantes, para cuantificar mutaciones.

Con el mismo fundamento se utilizan otras bacterias como Escherichia coli o Bacillus subtilis. Por ejemplo E.coli B/r WP-2 con mutación para el triptofano y toda una variedad de cepas logradas con la ayuda de la ingeniería genética, con modificaciones en su genoma que favorezcan la

detección de mutágenos, tales como deficiencias en distintos tipos de reparación del ADN, cepas portadoras de mutaciones del tipo corridas de puntuación y diferentes marcadores genéticos.

Otros ensayos utilizan fagos y ADN transformante. Por ejemplo, el "Inductest" en E.coli K-12 ( $\lambda$ ) (Moreau et al., 1976) está basado en la inducción de profagos para detectar mutágenos y carcinógenos potenciales.

## 2) Ensayos con microorganismos eucariotas.

Los microorganismos más utilizados son Saccharomyces cerevisiae (Mortimer y Manney, 1971), Aspergillus nidulans (Roper, 1971) y Neurospora crassa (De Serres y Malling, 1971).

La ventaja de estos ensayos respecto de los citados en el punto 1) es que permiten detectar distintos efectos mutagénicos a nivel cromosómico imposibles de ser evaluados en procariotas como por ejemplo entrecruzamiento o crossing over mitótico, conversión génica y no disyunción mitótica.

## 3) Ensayos con células de mamíferos en cultivo.

En este grupo de ensayos de mutagénesis se utilizan distintos tipos de células de mamíferos cultivadas "in vitro", generalmente de roedores y seres humanos (Suzuki y Okada, 1976; Thompson et al., 1973).

Se usan distintos loci génicos como marcadores de mutación: Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa, Timidina Quinasa, ATPasa de membrana  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  para detectar el desarrollo de resistencia a la oua-



baína, tóxico que impide la unión de  $K^+$  y  $Na^+$  a la membrana, detección de mutaciones en genes que determinan la incapacidad de crecer en rangos de temperatura habitualmente permisivas, etc.

Se utilizan no sólo células normales sino también algunas con graves alteraciones genéticas como fibroblastos diploides de pacientes con Xeroderma pigmentosum, deficientes en mecanismos de reparación del ADN.

Se incluyen en este grupo los ensayos de reparación del ADN e inhibición de replicación del ADN.

Existen distintos sistemas de reparación del ADN en todas las células, desde bacterias a seres humanos (Hanawalt, 1977). El fundamento de estos ensayos reside en detectar la habilidad de un compuesto químico de interactuar con el ADN midiendo cuánto han sido inducidos los sistemas celulares de reparación del ADN.

Deben mencionarse, medición de síntesis del ADN "no programada" (Unscheduled DNA synthesis, UDS) (Stich et al., 1981) y fragmentación del ADN, para los procesos de reparación que involucran típicamente ruptura de la doble hélice del ADN.

Para UDS se emplean: células fibroblásticas humanas, de pacientes normales o con Xeroderma pigmentosum, células HeLa, células de roedores, cultivos primarios de hepatocitos, células de embrión de hamster sirio y aún es posible realizar UDS "in vivo", usando testículos o epitelio esofágico, etc.

Para medir fragmentación del ADN se usan gradientes de elución alcalina (Svenberg, 1981) o sedimentación en gradiente alcalino de sacarosa, todos basados en la elución, notoriamente rápida, de los fragmentos del ADN respecto del ADN intacto.

La inhibición de la replicación del ADN utilizando inicialmente testículo de ratón como sistema "in vivo", desarrollada por dos grupos de trabajo (Seiler, 1981; Friedman, 1976) y desarrollada "in vitro" en células HeLa (Painter, 1977).

También en este punto se incluyen los ensayos de unión covalente de los compuestos químicos con macromoléculas celulares, principalmente con el ADN (DNA Binding Assay).

Los ensayos de transformación "in vitro" (Elías y Uavelier, 1982), tienen una cualidad única, que falta en el resto de la batería de ensayos; las células transformadas producen cáncer al reinyectarlas en animales. La mayor dificultad de éstos es la de requerir una habilidad técnica importante y experiencia en el criterio para llegar a conclusiones válidas.

Se utilizan entre otros: cultivos primarios o de bajo número de pasajes de embrión de hamster sirio, líneas celulares de ratones, hamster y embriones de rata de distintas cepas, líneas celulares ya transformadas por virus analizándose la manifestación de esa transformación viral, células humanas, que son particularmente refractarias a transformación "in vitro", etc.

#### 4) Ensayos con Insectos

La mosca de la fruta Drosophila melanogaster es una de las herramientas más antiguas usadas por los genetistas (Abrahamson y Lewis, 1971). Se aplica el ensayo del recesivo letal ligado al sexo, cerca de 1000 trabajos publicados están registrados en el EMIC (Centro de Información de Mutágenos Ambientales) utilizando este sistema.

### 5) Ensayos "in vivo" con mamíferos.

Se incluyen en este ítem los ensayos que miden efectos en tejidos somáticos y germinales, mediante tratamiento de los progenitores y análisis de la progenie F1, o mediante exámen directo o indirecto de los tejidos germinales de los adultos tratados.

Estos tienen la ventaja que ningún ensayo "in vitro" o colección de los mismos puede reproducir, la complejidad de un ser vivo, y por esta razón cualquier batería debe incluirlos.

Entre las limitaciones, se cuestiona el alto número de animales y el largo período de tiempo requerido para ser realizados. Muchos de ellos dejan de ser ensayos de corto plazo. Por ejemplo, se requiere algunos meses para el ensayo del dominante letal (Ehling, 1977). Un año para el del locus específico (Cattanach, 1971), ó 400 animales para el de traslocación (Generoso et al., 1978).

Los nombrados miden efectos heredables en las líneas germinales. También se estudian las anormalidades morfológicas en esperma de ratón (Wyrobeck y Bruce, 1978).

Recordamos aquí otros que ya mencionara, realizables "in vivo", como síntesis del ADN "no programada" e inhibición de síntesis del ADN en testículo. Los efectos en tejidos somáticos pueden evaluarse por el "Spot test" en ratón o técnicas con anticuerpos marcados para detectar mutaciones.

### 6) Ensayos citogenéticos.

En cualquier batería de ensayos para evaluar mutagénesis el acuerdo general es el de incluir 1 o más ensayos citogenéticos. No sólo por la

importancia que una anomalía citogenética significa por sí misma, sino por la alta correlación entre inducción de eventos citogenéticos (que producen ruptura de cromosomas) con eventos mutacionales (Hollstein, 1979). Es por ello que los ensayos citogenéticos ocupan un grupo aparte (6) aún cuando los puntos 3, 4 y 5 puedan utilizar técnicas citogenéticas.

Distintos y variados métodos citogenéticos permiten el estudio "in vitro" e "in vivo" de cromosomas de células somáticas y germinales. Además estos métodos presentan una ventaja importante respecto del resto pues pueden ser utilizados para detectar daños genéticos "in vivo" en seres humanos.

Comprenden entre otros, estudios de aberraciones cromosómicas (Evans y O'Riordan, 1977), a partir de tejidos que presentan un elevado índice mitótico (médula ósea, tumores), o de tejidos cuyas células se dividen en cultivo de tejidos. De éstos, la sangre periférica es el tejido utilizado con más frecuencia. Siguiendo el método convencional, luego de cultivar por 48 horas las células, se obtienen linfocitos para detectar la presencia de aberraciones cromosómicas.

Si bien lo más frecuente es el uso de las metafases, la determinación de daño genético se ha desarrollado también mediante el análisis de anafases en células cultivadas de mamíferos (Coutiño, 1980).

Para los estudios de aberraciones cromosómicas "in vitro" se utilizan también distintas líneas celulares diploides o heteroploides de diferentes especies, particularmente de seres humanos y roedores. Además de las tinciones convencionales para cromosomas se requiere en algunos casos el uso de técnicas de bandeo, para lograr la diferenciación longitudinal de los cromosomas, que permite detectar aberraciones cromosómicas tales como las inversiones paracéntricas o las translocaciones recíprocas.

Aparte de las aberraciones cromosómicas, dos ensayos citogenéticos están ampliamente difundidos y reconocidos como medio de detección de actividad genotóxica de agentes físicos y químicos: el ensayo del micro-núcleo y el ensayo de intercambio de cromátidas hermanas.

Muchos carcinógenos típicos han demostrado ser mutágenos mediante el uso de esta amplia variedad de ensayos a corto plazo para mutágenos y carcinógenos. Por ser el ensayo de Salmonella/Ames el que más compuestos lleva evaluados hasta el presente, suele tomarse como ejemplo para otorgar validez a estos ensayos. Sus autores presentan (Mc Cann et al., 1975) y discuten (Mc Cann, 1976) la carcinogenicidad y mutagenicidad de aproximadamente 300 compuestos.

De 179 compuestos con probada actividad carcinogénica en animales, un 87,7%, es decir 157 de ellos, son positivos en este ensayo bacteriano. La proporción de compuestos que se conocen no-carcinogénicos, que dan resultados negativos en el ensayo de Ames también es alta, 101 de 117, es decir el 86,3%. Los aparentes "falsos negativos" y "falsos positivos" se discuten extensamente (Mc Cann y Ames, 1976).

Los autores creen que hay buenas razones para suponer que muchos de estos "falsos positivos", es decir supuestos no-carcinógenos, que se registran como mutagénicos en el ensayo de Salmonella/Ames, eventualmente puede llegar a demostrarse que sí son carcinogénicos. Como ejemplo se cita la furyl furamida, aditivo alimentario, usado por muchos años en el Japón, que había resultado negativo en dos ensayos de carcinogénesis de largo plazo en animales y luego de obtenerse resultados positivos en ensayos de corto plazo para mutágenos, nuevos estudios en ratones demostraron que es tumorigénico. Los autores también opinan (Mc Cann y Ames, 1976), que los "falsos negativos" bien pueden ser genuinos, porque un metabolismo "in vivo" de las sustancias puede ser diferente

del que se logra "in vitro" a partir de suspensiones de microsomas aislados.

De todos modos debe enfatizarse que los ensayos microbianos son útiles solamente para la identificación preliminar de mutágenos que, además, pueden ser carcinógenos. Son necesarias otras investigaciones que incluyan ensayos de carcinogénesis usando promotores para identificar los carcinógenos con seguridad (Sugimura, 1982).

Por otro lado, ante la duda de si los mutágenos son carcinógenos y viceversa, puede aportarse que el Dr Joyce Mc Cann, en la reunión de Seattle, organizada por los Estados Unidos y grupos japoneses de estudios ambientales con el propósito de evaluar el desarrollo y la eficiencia de varios ensayos cortos para mutágenos como procedimiento para detectar potencial actividad mutagénica y carcinógena en el hombre, discutió la evaluación realizada en el laboratorio de Bruce Ames sobre datos de 400 laboratorios diferentes que utilizaron el ensayo de Salmonella. La evaluación demuestra que el 85% de los carcinógenos químicos reconocidos y el 10% de los no-carcinógenos son mutágenos (De Serres, 1976).

Para finalizar, este gran grupo de ensayos está recomendado o requerido por todas las agencias reguladoras en las evaluaciones toxicológicas para sustancias químicas (Hollstein et al., 1979). Ha sido propuesto por la Administración de la Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) como parte de una política de decisión de normas en la clasificación de carcinógenos químicos en el área laboral, y por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) para reglamentar sobre mutágenos químicos tales como plaguicidas o deshechos tóxicos.

Además, varios comités de expertos han desarrollado guías generales

de ensayos de corto plazo para identificar potenciales mutágenos y carcinógenos químicos en el hombre, tales como la Comisión de Comunidades Europeas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comisión Internacional para la Protección contra Mutágenos y Carcinógenos Ambientales (ICPEMC), cuyo objetivo principal es identificar y promover principios científicos en el área de la mutagénesis ambiental, carcinogénesis y toxicología genética (ICPEMC News nº 1, 1978).

El consenso general es el de utilizar una batería de ensayos, empleando diferentes sistemas que permitan determinar distintos tipos de daño en el material genético, para que los carcinógenos "perdidos" en un ensayo sean detectados como positivos en otros. Cada ensayo tiene su validez y sensibilidad especial para cada grupo químico de drogas. La utilización de una batería permite confirmar los resultados positivos y reducir los posibles falsos negativos (De Serres, 1976; Russell, 1977; Bridges, 1976).

De los ensayos enumerados se detallan a continuación los tres empleados en el presente trabajo de tesis:

- Estudios de unión covalente de compuestos químicos con macromoléculas celulares.
- Ensayo del micronúcleo.
- Ensayo de intercambio de cromátidas hermanas.

ESTUDIOS DE UNION COVALENTE DE COMPUESTOS QUIMICOS CON MACROMOLECULAS  
CELULARES.

Reseña sobre carcinogénesis química. Relevancia de las interacciones de  
compuestos químicos con macromoléculas celulares en los procesos de  
mutagénesis y carcinogénesis.

En la historia inicial de la carcinogénesis principalmente dos teorías han intentado explicar la transformación maligna de las células (Wintersberger, 1982): la teoría de la mutación somática y la teoría epigenética de la carcinogénesis.

La teoría de la mutación somática postula que una o más mutaciones somáticas intrínsecas o inducidas en genes regulatorios serían la causa del comportamiento anormal de las células cancerosas. Así, un evento mutacional en células somáticas sería responsable del efecto tumorigénico.

La teoría epigenética de la carcinogénesis indica que el estado neoplásico de las células comienza con una alteración de la expresión génica, presumiblemente a un nivel transcripcional, sin ningún cambio que involucre al genoma por sí mismo.

Por otro lado, uno de los avances más importantes para entender el mecanismo de la carcinogénesis química del cáncer, ocurre cuando se descubre que la inducción química del cáncer incluye dos procesos distintos designados Iniciación y Promoción (Goldstein et al., 1978). Esto se propuso a principios de los años 40 (Montesano y Slaga, 1983), sobre la base de los estudios de inducción de tumores de piel en conejos con alquitrán de hulla (hidrocarburos policíclicos), y en ratones usando benzopireno como iniciador y aceite de crotón como promotor. La Inicia-



ción sería un proceso irreversible y condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo del cáncer. La Promoción incluiría proliferación de células iniciadas, y esencialmente el resultado de una inestabilidad cromosómica inducida. Los estudios epidemiológicos también proveen evidencias de la carcinogénesis como un proceso en varias etapas.

Los estudios experimentales estaban limitados a tejidos de roedores "in vivo" e "in vitro". Un análisis del proceso en células humanas es dificultoso por la falta de un sistema modelo, considerando que las células humanas son particularmente refractarias a la transformación.

A fines de aquella década las características cualitativas del fenómeno de iniciación y promoción, principalmente en la inducción de tumores de piel, estaban bien descriptas, sin embargo poco o nada se comprendía sobre los mecanismos celulares y moleculares del fenómeno.

Hoy, los genetistas concuerdan en suponer que los mutágenos deben reaccionar con algún constituyente celular para producir cambios heredables en el material biológico, sin concordar aún en la naturaleza del constituyente. Tampoco habría un acuerdo general sobre el sitio de acción de los carcinógenos dentro de la célula (Brookes, 1966). Diferentes teorías han involucrado a las proteínas (Tsanev, 1978), ácidos nucleicos (Hemminki, 1985), cierto factor extracromosómico o plasmagen (Darlington, 1948) o elementos presentes en las membranas celulares (Berril, 1945).

Sin embargo, y a partir de los conocimientos actuales, las interacciones con proteínas y ácidos nucleicos son el foco de interés en aquellos cambios que puedan explicar la pérdida total o parcial, heredable o casi permanente, de los controles de crecimiento que caracterizan a las

neoplasias (Miller, 1970).

Así, los esfuerzos para entender los mecanismos que involucran la carcinogénesis química han estado dirigidos principalmente al estudio de la reactividad química de los carcinógenos o de sus metabolitos. James y Elizabeth Miller introducen en 1966 los términos precancerígeno, cancerígeno proximal y cancerígeno final (Magee et al., 1975).

Los precancerígenos son definidos como sustancias potencialmente carcinogénicas que en su mayoría requieren activación metabólica para convertirse en estructuras reactivas carcinogénicas finales. La secuencia se indica en la figura 3 (Bresnick y Eastman, 1982). No obstante las disimilitudes químicas de los distintos cancerígenos, la gran mayoría comparte una metabolización "in vivo" a formas electrofílicas reactivas. Estas especies electrofílicas reaccionan con centros nucleofílicos de constituyentes celulares para formar uniones químicas (Hemminki, 1983).

Si bien algunos grupos de carcinógenos y mutágenos químicos como metales y agentes intercalantes no forman uniones covalentes con el ADN, la mayoría forma uniones covalentes principalmente con las bases y los grupos fosfato de los ácidos nucleicos (Hemminki, 1983).

Este panorama está más estudiado y es obviamente más conocido para los carcinógenos fuertes, los que de alguna manera son más fácilmente identificables. Las revisiones en el tema incluyen datos de estudios "in vivo" e "in vitro", con ARN y preferentemente con ADN, también con nucleótidos, nucleósidos y bases. La demostración de un aducto del metabolito reactivo del compuesto con monómeros indica generalmente una potencialidad del compuesto para generar el mismo tipo de aductos con el ADN. La bibliografía es particularmente extensa en estudios con distintos agentes alquilantes simples; N-nitroso compuestos; aminas

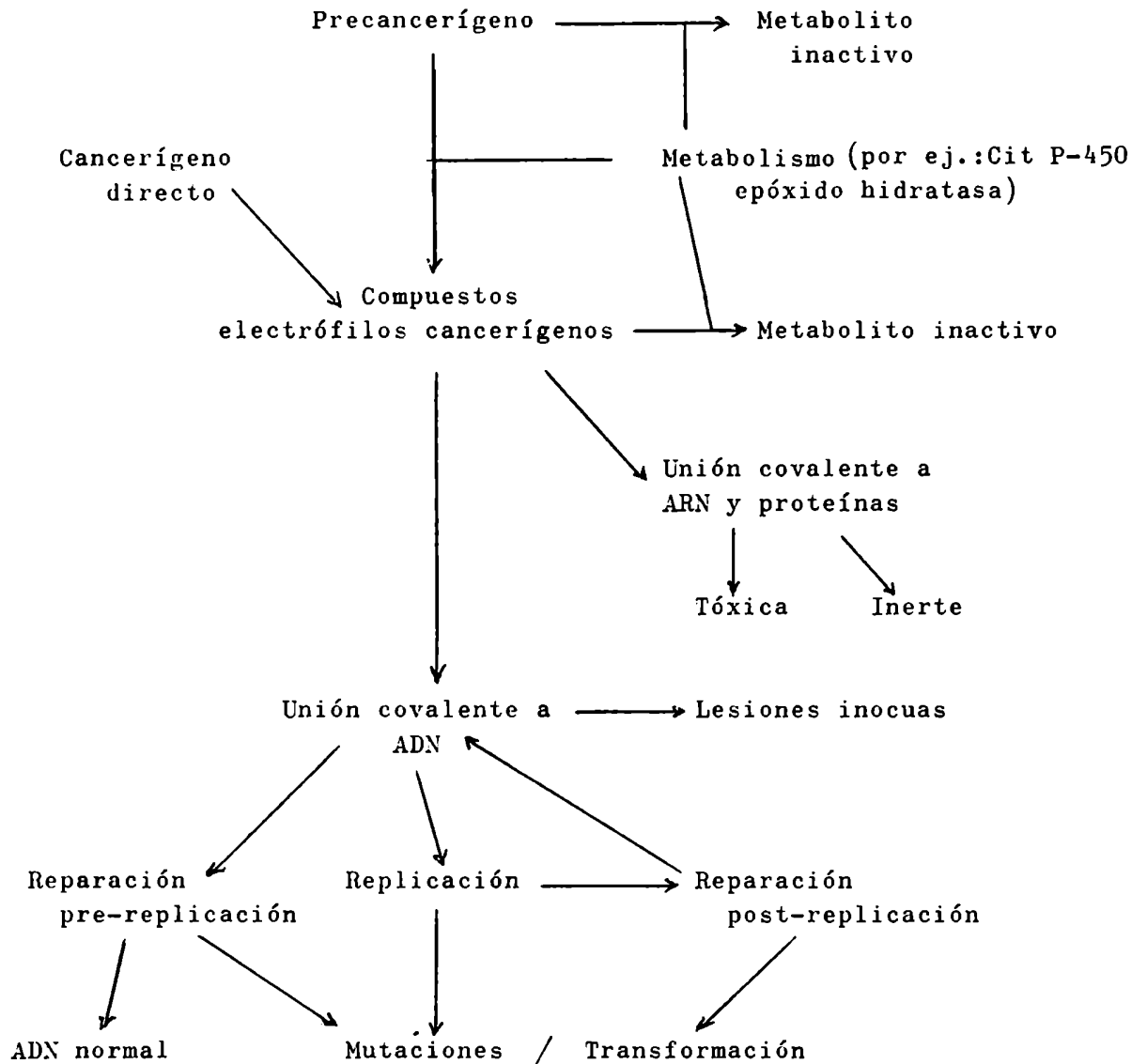


Figura 5. Interacción de cancerígenos finales con sitios biológicos nucleofílicos y los efectos resultantes (Bresnick, 1982).

aromáticas relacionadas estrechamente con la historia de la carcinogénesis ya que fueron reconocidas como causante del cáncer de vejiga a fines del siglo XIX, hidrocarburos aromáticos policíclicos; epóxidos; drogas citostáticas usadas en la quimioterapia del cáncer, muchas de las cuales han demostrado ser cancerígenas por sí mismas; y compuestos misceláneos como las micotoxinas entre las cuales la aflatoxina B<sub>1</sub> y la sterigmatocistina, se piensa que son los dos hepatocarcinógenos más potentes; cloruro de vinilo, B-propiolactona y otros.

Por otro lado, por ser las proteínas las moléculas más abundantes dentro de las células, presentan muchas posibilidades de interacciones específicas con carcinógenos, que son de potencial importancia (O'Connor, 1981); y si bien el ataque al ADN es siempre considerado como el único medio para lograr un cambio heredable que puede llevar a un crecimiento neoplásico, otros autores consideran que la alteración al complejo ADN: proteína es un mecanismo igualmente probable por el que puede inducirse la carcinogénesis (Gronow, 1980).

Las formas reactivas de un carcinógeno químico pueden interactuar con ácidos nucleicos de origen celular, para formar aductos unidos covalentemente, y los efectos potencialmente promutagénicos de los productos con el ADN, proveen las bases para los ensayos de mutagénesis en células bacterianas y de mamíferos, que están hoy extensamente usadas en los ensayos de corto plazo para cancerígenos (O'Connor, 1981).

Los distintos grupos de carcinógenos intensamente estudiados en cuanto a interacciones con macromoléculas celulares se refiere, son en su gran mayoría carcinógenos fuertes; pero los términos mutágeno ambiental y carcinógeno ambiental incluyen compuestos con actividad muy fuerte y también compuestos con actividad muy débil, que son muy difíciles de incluir en la misma categoría científica o práctica. Los as-

pectos cuantitativos de las actividades carcinogénicas y mutagénicas son especialmente importantes (Nagao et al., 1978). Nuestros dos fármacos en cuestión: Nifurtimox y Benznidazol, afortunadamente no parecerían tener una actividad genotóxica fuerte, pero a través de antecedentes de compuestos relacionados, se puede sospechar que produzcan efectos sobre el material genético.

Por último, para completar este modesto panorama de la carcinogénesis química debe citarse a los oncogenes. Recientemente (1983, 1984) se ha encontrado que carcinomas de mamas inducidos en ratas por N-nitroso-N-metilurea contienen un gen transformante activado (H-ras), detectado también en otros tipos de tumores inducidos por otros cancerígenos (Montesano, 1983). Se trataría de proto-oncogenes, en células normales, que por una activación determinada por virus, sustancias químicas, etc. resultarían en una expresión anormal de oncogenes activados; en células cancerosas.

Estos genes celulares (proto-oncogenes), potencialmente capaces de inducir transformación oncogénica, han sido identificados por homología con genes transformantes de retrovirus. Aproximadamente 20 virus de este tipo, aislados de diferentes especies animales, es sabido que transforman células en cultivo e inducen neoplasias con corto período de latencia en animales infectados (Cooper, 1982).

Afortunadamente estos recientes descubrimientos no invalidan las hipótesis respecto de la carcinogénesis química, siendo posible un ensamble de los nuevos conceptos con los anteriores, formulándose una suerte de teoría integrada de la carcinogénesis.

Por todo lo expuesto es que se utilizan los ensayos de unión covalente de compuestos químicos con macromoléculas celulares como ensayos

de corto plazo para mutágenos y carcinógenos. El diseño tipo para estudios "in vivo" involucra (Lutz y Schlatter, 1979): 1) La administración del compuesto radiactivo. La vía empleada es preferentemente la misma que la resultante de la exposición humana. 2) La espera del tiempo necesario para la absorción y la biotransformación del compuesto (pocas horas a un día). 3) El aislamiento del ADN de los órganos de interés. 4) La determinación de la radiactividad en el ADN para cuantificar la unión química.

La activación metabólica de los carcinógenos ha sido extensamente estudiada "in vivo", pero estos procedimientos no son muy útiles para un programa de detección inicial de compuestos. Existen problemas de especificidad de especie y de tejidos y la tarea se complica aún más si la determinación de la radiactividad debe ser efectuada en un alto número de tejidos. Otras dificultades son los requerimientos del compuesto a ensayar, que debe emplearse en su forma radiactiva y que además debe tener una alta actividad específica, porque la interacción de los carcinógenos con los ácidos nucleicos "in vivo" es extremadamente baja, del orden de 1-2 moléculas de carcinógeno por cada 10 ó 20.000 nucleótidos (Stoltz et al., 1974). También se emplean entonces sistemas "in vitro" para detectar unión covalente de compuestos químicos con macromoléculas celulares, tales como células en cultivo o diferentes mezclas de incubación como microsomas hepáticos, agregando diferentes cofactores o transportadores de electrones, fracción citosólica, métodos químicos de activación, etc. (Stoltz et al., 1974). Estos estudios pueden ser particularmente útiles para estudiar mecanismos de biotransformación de los compuestos químicos.

Antes de finalizar este título creo conveniente incluir lineamientos generales de biotransformación de sustancias extrañas al organismo, dada

la enorme importancia que tiene como ya se explicara, en la obtención de las formas reactivas de los cancerígenos para interactuar con los sitios biológicos nucleofílicos.

Quimiodinamia de xenobióticos o sustancias extrañas al organismo.

La quimiodinamia que sigue un xenobiótico ( $\xi$ evo- extraño y  $\beta$ ios- vida) en un organismo es la suma de los procesos que por asimilación y activación o por desintoxicación y excreción afectan el destino del mismo en el organismo. Estos procesos interesan a la farmacología cuando conducen a efectos funcionales y a la toxicología en lo referido a efectos colaterales adversos. Los procesos que componen la quimiodinamia son:

- a- Absorción.
- b- Distribución en tejidos y redistribución.
- c- Reacciones enzimáticas y no enzimáticas de unión y ruptura (biotransformación)
- d- Excreción.

La figura 4 muestra una representación esquemática de los principales eventos en la interacción entre un compuesto químico y un organismo biológico. Una vez que el tóxico se absorbe por algunas de las vías posibles (respiratoria, cutánea, oral, endovenosa, subcutánea, intramuscular, sublingual, rectal) se distribuye entre los distintos órganos y compartimientos del organismo. Esta distribución se efectúa a una velocidad característica que depende de factores tales como irrigación sanguínea de cada órgano, pH tisular y contenido de lípidos y de agua del mismo, así como de factores propios del compuesto tales como su carácter ácido o básico y el grado de su lipo e hidrosolubilidad, su capacidad de interaccionar reversiblemente o no con compuestos tisulares, etc. (Castro, 1985).

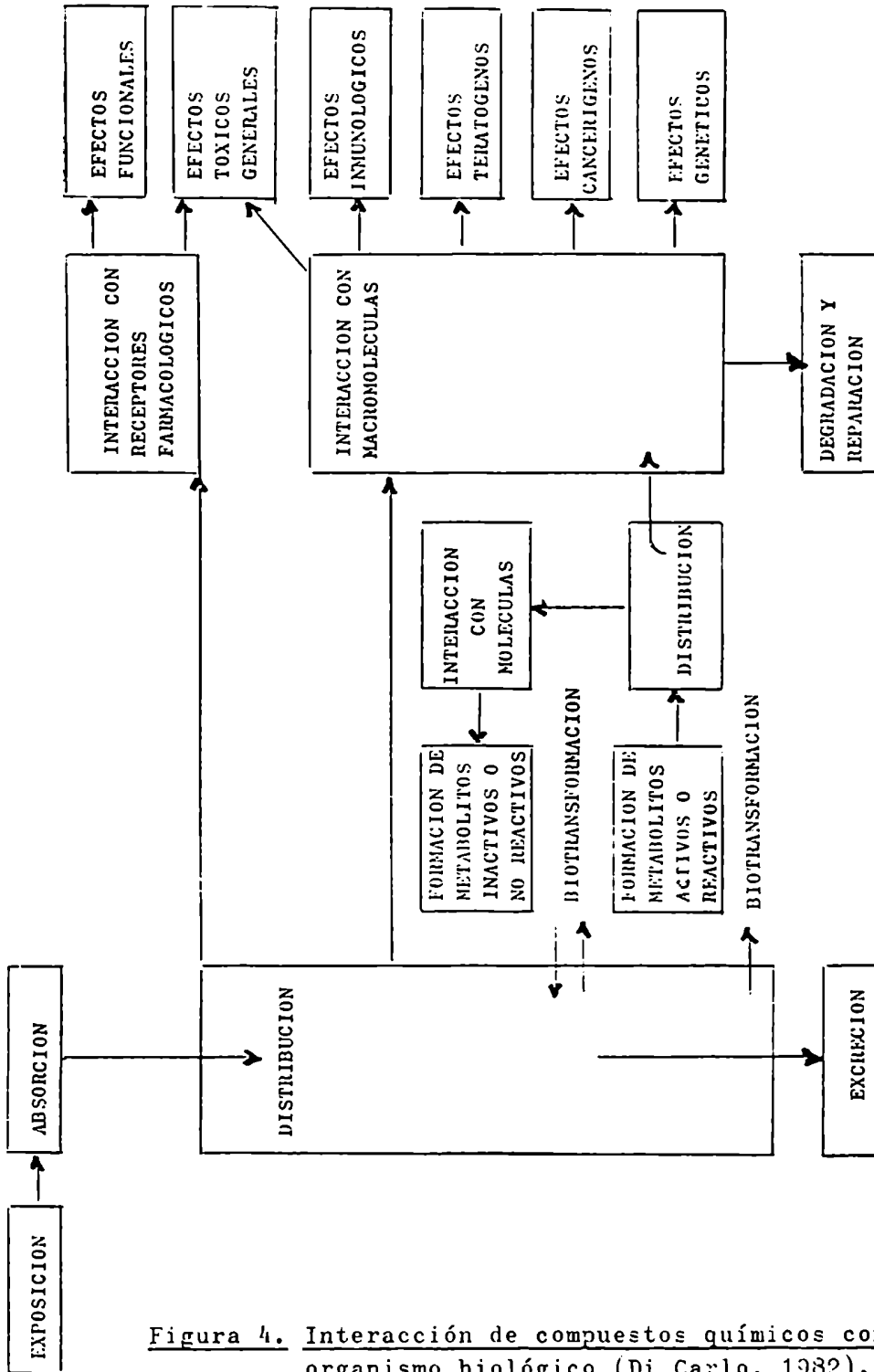


Figura 4. Interacción de compuestos químicos con un organismo biológico (Di Carlo, 1982).



En su gran mayoría las sustancias ingresan principalmente por absorción gastrointestinal desde donde se dirigen al hígado por vía portal. El compuesto sufrirá procesos de biotransformación en productos, ya sea biológicamente más o menos activos o inactivos. Los activos dan lugar a interacciones con receptores (ej. ADN, ARN, proteínas, lípidos, etc.) que serán responsables de los efectos biológicos que se corresponden con la sintomatología observada. Ambos productos de biotransformación, activos e inactivos, así como el tóxico tal cual, están sujetos a procesos de excreción por los cuales el organismo se desembaraza de ellos (Castro, 1985). El hígado es el órgano metabolizante por excelencia. Los estudios "in vitro" han revelado que el hígado es el principal sitio de metabolismo de compuestos extraños, si bien esta cualidad también la comparten, en menor grado, otros órganos. Los productos fluyen por bilis y se excretan por heces o son tomados por los riñones y volcados a la orina. Otros sitios de desintoxicación están localizados en los pulmones, piel y tracto gastrointestinal, etc. (Blumberg, 1978). Frecuentemente el proceso de excreción renal es el más importante, transformando los compuestos liposolubles en otros menos liposolubles.

En lo que respecta a la biotransformación nuestro organismo transforma diariamente, mediante enzimas específicas, un número de sustancias normales y también otras extrañas que pueden asemejarse químicamente.

Sin embargo, muchas sustancias no endógenas, resultantes de nuestra exposición ambiental, son metabolizadas por enzimas no específicas conocidas como enzimas metabolizantes de drogas. Estas catalizan una amplia variedad de reacciones inespecíficas diferentes que básicamente incluyen oxidaciones, reducciones, hidrólisis o conjugaciones (reacciones de síntesis).

Debe recordarse que estas transformaciones de sustancias biológicamente activas en el organismo, conducen a la inactivación de las mismas y por ende a la desintoxicación del organismo, o a la activación de las mismas a entidades responsables del efecto biológico. La carcinogenicidad/mutagenicidad de muchos compuestos está determinada por la competencia entre reacciones de activación y desintoxicación. Este balance puede ser efectivamente alterado por diferencias genéticas, hormonales, nutricionales, sexuales, etarias, ritmos circadianos, inducción o inhibición enzimática o interacciones entre distintos tóxicos ambientales, etc. (Blumberg, 1978).

Los xenobióticos son en general poco solubles en agua. El proceso de biotransformación está involucrado en la disminución de la liposolubilidad, con introducción de grupos polares en la molécula para facilitar su eliminación del organismo.

En general este proceso ocurre en dos etapas. En la primera etapa, de funcionalización, tienen lugar las reacciones que convierten un grupo funcional en otro (como oxidación de alcohol a aldehído y ácido acético), conversión de compuestos neutros en otros que posean grupos polares (como hidrólisis de ésteres y amidas) o introducción de grupos polares en compuestos no polares (como la hidroxilación de compuestos aromáticos y alifáticos). En la segunda etapa, de conjugación, tienen lugar las reacciones que conjugan grupos polares de compuestos que en general provienen de la etapa o fase I, con glucuronato, sulfato, glicina, grupos metilo o agua.

Es importante la existencia de estas dos etapas, ya que no siempre la biotransformación que ocurre en la fase I resulta en la pérdida de la actividad biológica indeseable para el organismo o en la suficiente hidrosolubilidad que permita la excreción rápida. Los productos de es-

tas reacciones de conjugación son en general más polares y menos activos biológicamente. Esta reacción de conjugación, ocurre sobre un grupo funcional de la molécula extraña al organismo o sus metabolitos, por ejemplo un alcohol, un fenol, un resto carboxilo de un ácido, un amino, etc. (Castro, 1985 ).

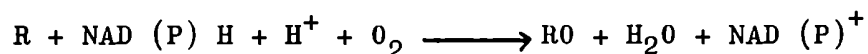
En cuanto a la localización intracelular de la biotransformación de xenobióticos el retículo endoplásmico ha demostrado ser la fracción más importante para las reacciones de biotransformación, si bien no es la exclusiva, verificándose también en el citosol, mitocondria, núcleos, etc. La homogeneización del hígado produce la pérdida de la estructura típica del retículo endoplásmico formada por una red paralela de cisternas y vesículas, fragmentándose con formación de vesículas esféricas cerradas que se aíslan por centrifugación diferencial.

A esta fracción subcelular se la denomina "microsomas", compuesta principalmente por retículo endoplásmico de hepatocitos, con escasa contaminación de aparato de Golgi y membrana plasmática.

Las enzimas microsómicas que catalizan la mayor parte de las reacciones correspondientes a la etapa I, se verifican en el retículo endoplásmico, tanto en su componente rugoso como en el liso, pero con cierto predominio en este último. La localización intracelular es más heterogénea para las enzimas que catalizan los procesos de la fase II.

La mayoría de las drogas, mutágenos, carcinógenos y otros xenobióticos son metabolizados con reacciones oxidativas y algunas veces reductivas, catalizadas por un sistema monoxigenasa P-450 dependiente. Los citocromos P-450 tienen ubiquidad en la naturaleza y son capaces de metabolizar muchos compuestos. Abarcan, esta familia de citocromos, diversidad de compuestos y variedad de transformaciones, por ello han

atraído la atención de muchas áreas de la ciencia incluyendo la química orgánica, química inorgánica, bioquímica, endocrinología, nutrición, farmacología, bacteriología, toxicología, oncología. El interés en las dos últimas es particularmente grande debido a la habilidad de estas enzimas para metabolizar compuestos químicos inertes a productos electrofílicos, que se unen irreversiblemente a macromoléculas celulares e inician el desarrollo de lesiones tóxicas o tumorigénicas (Guengerich y Mc Donald, 1984). Los citocromos P-450 llevan a cabo reacciones oxidativas con estequiometría típica de oxidasa de función mixta.



Estas reacciones requieren oxígeno molecular para oxidar el sustrato R y un segundo sustrato que es NAD (P) H ó NADH que cede electrones en la reducción del segundo átomo de oxígeno.

Las reacciones oxidativas comprenden principalmente: oxidación de carbonos alifáticos, de carbonos aromáticos, O-, N- y S- dealquilaciones, N- y S- oxidaciones, desulfuración, epoxidación, deaminación, oxidación de alcoholes y aldehídos. Otras reacciones catalizadas por citocromos P-450 incluyen reducción de colorantes azo, epóxidos, N-óxidos y halometanos, reducción y escisión de hidroperóxidos (y propagación de peroxidación de lípidos) y oxidaciones relativamente no específicas que involucren formas de reducción parcial de oxígeno que pueden ser liberadas por P-450 (Guengerich y Mc Donald, 1984).

Descifrar los mecanismos químicos por los que el citocromo P-450 cataliza estas transformaciones químicas ha sido un desafío por la dificultad de caracterizar intermediarios críticos, involucrados en mecanismos catalíticos y por la variedad de reacciones químicas que son

catalizadas por estas enzimas. En la figura 5 se muestra el ciclo catalítico propuesto para la reducción y oxidación del citocromo P-450.

Antes de 1960 se aceptaba que todas las oxidaciones NADPH -dependientes catalizadas por microsomas hepáticos estaban mediadas por monoxigenasas dependientes de P-450. Sin embargo, estudios posteriores de diferentes laboratorios, demostraron que las enzimas que catalizan la oxidación de aminas nucleofílicas terciarias y secundarias difieren en sus propiedades del sistema citocromo P-450, verificándose la presencia de una monoxigenasa que contiene 15,1 a 15,3 nmoles de FAD/mg de proteína, que no posee citocromos y que cataliza la oxidación de compuestos orgánicos nucleofílicos que contengan nitrógeno o azufre (Ziegler, 1980). Esta monoxigenasa, en condiciones saturadas de NADPH y oxígeno exhibe un pH óptimo de 8,3 - 8,4 y posee como propiedad intrínseca una labilidad térmica inusual, usada para diferenciar las reacciones catalizadas por ésta, de otras monoxigenasas de microsomas. La enzima está listada en la nomenclatura enzimática como dimetilánilina monoxigenasa (Ziegler, 1980).

Estos serían los principales sistemas enzimáticos que hasta el momento se conocen que están involucrados en la fase I de la biotransformación de drogas. Las reacciones de la fase II, que como ya se expusiera son de tipo sintético, involucran conjugaciones a glucurónidos, formación de ácidos mercaptúricos, formación de dihidrodioles, conjugaciones a sulfatos, acetilaciones, metilaciones y formación de ácidos hipúricos. Los tres subrayados en primer término son particularmente relevantes (Lu, 1979). Algunos intermediarios como fenoles y epóxidos pueden ser conjugados en microsomas por la UDP- glucuronil transferasa, o por la glutatión S- transferasa citosólica capaz de conjugar una gran variedad de compuestos electrofílicos con glutatión. Por otro lado, la epóxido

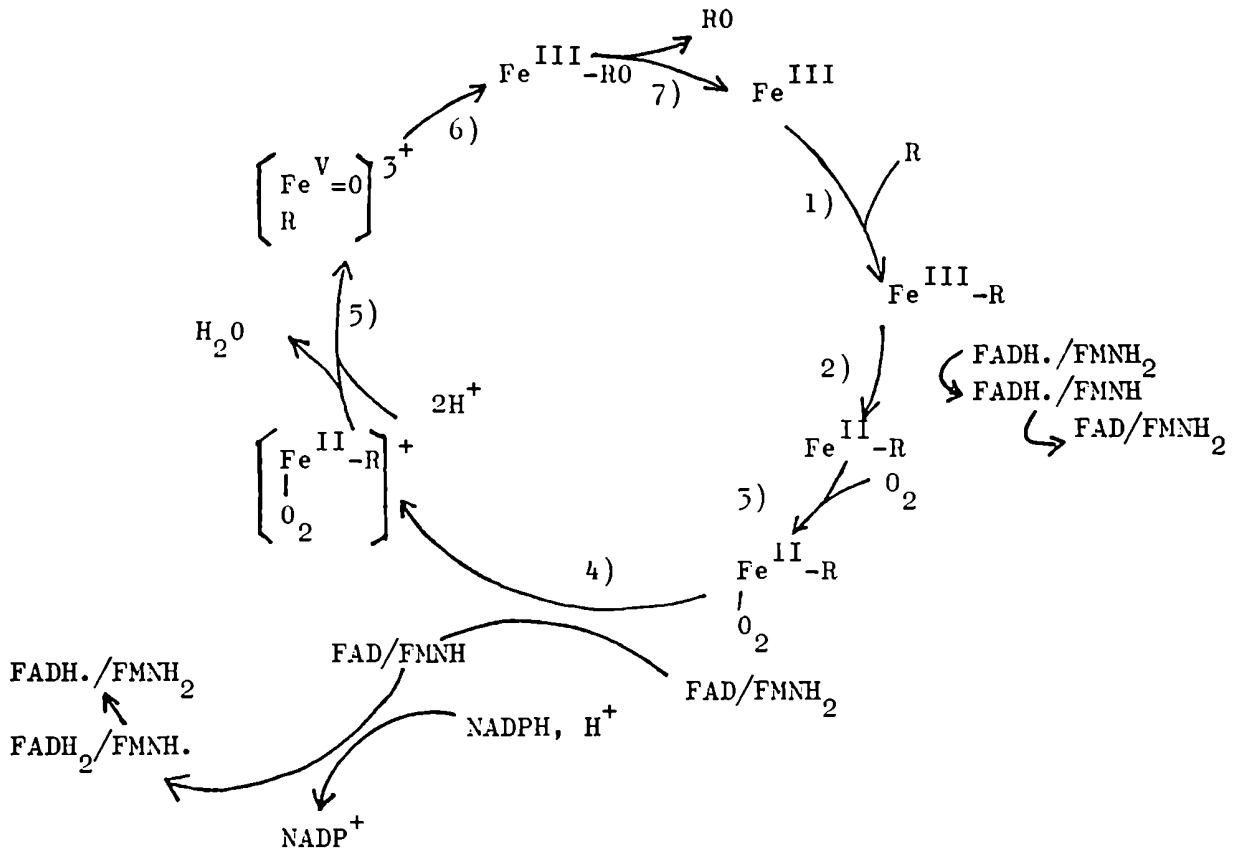
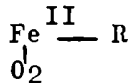


Figura 5. Ciclo catalítico propuesto para la reducción y oxidación del citocromo P-450 (Guengerich, 1984).

- 1) La unión del sustrato (R) a la enzima férrica es rápida y estequiométrica.
- 2) El sustrato unido a la enzima férrica ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) acepta  $1e^-$  de la flavoproteína NADPH-cit-P-450 reductasa que contiene 1 FMN y 1 FAD que dona  $1e^-$  del complejo  $\text{FMNH}_2/\text{FADH}$ .
- 3) El sustrato unido a la enzima ferrosa se une al oxígeno molecular rápidamente, para formar un complejo oxigenado



- 4) Alternativamente este complejo oxigenado puede aceptar un 2do.  $e^-$  de la flavoproteína o posiblemente del cit b<sub>5</sub> generando un complejo activado hierro-oxígeno  $\left[ \text{Fe}^{\text{II}}-\text{R}-\text{O}_2 \right]^+$

El oxígeno se adiciona al sustrato.

- 5) Luego de la adición del oxígeno, el producto oxigenado se disocia para liberar hierro en el estado férrico original.

hidratasa microsomal, identificada en hígado, pulmón, riñón y otros tejidos, cataliza la hidratación de una variedad de óxidos de alquenos y arenos.

Para finalizar este punto, debe destacarse que se observa una inducción enzimática "in vivo" de estos sistemas. Más de 200 compuestos farmacológicamente no relacionados, al ser administrados a animales, estimulan la actividad de las enzimas que metabolizan xenobióticos, pudiendo alterar la duración e intensidad de la acción de drogas (Gram y Gillette, 1971). Los microsomas hepáticos obtenidos de animales pretratados con algunos inductores como 3- metilcolantreno o fenobarbital difieren en actividad enzimática de los microsomas hepáticos obtenidos de animales sin tratamiento. Esto es así tanto para el sistema del citocromo P-450, como para las enzimas de la fase II del metabolismo.

Por todo lo expuesto, cuando se realizan ensayos "in vitro" donde deben utilizarse sistemas metabolizantes de drogas para intentar reproducir lo que ocurre "in vivo", la elección del sistema metabolizante es de suma importancia, particularmente para evitar falsos negativos. Son muchos los factores que influyen la biotransformación de sustancias extrañas en los mamíferos y los resultados que se obtienen de los estudios "in vitro" dependen en gran medida de múltiples detalles en la selección, preparación y uso del sistema metabolizante. Debido a esta gran complejidad y variabilidad, no existe un único sistema ideal de activación que puede mimetizar fielmente todas las situaciones "in vivo", ni aún cuando nos referimos a una única especie (Bartsch, 1980). Por todo esto, cuando se evalúa la actividad genética de un compuesto, lo ideal es que se incluyan distintos sistemas metabolizantes de drogas.

## ENSAYO DEL MICRONUCLEO

El ensayo del micronúcleo es un método "in vivo" que permite detectar efectos clastogénicos. Fue desarrollado por W.Schmid en los laboratorios de genética de la Universidad de Zürich (Matter y Schmid, 1971). En este trabajo inicial, Matter y Schmid efectúan estudios hematológicos en preparados de médula ósea de cinco especies diferentes de roedores tratados con Trenimon, un mutágeno alquilante que había mostrado propiedades clastogénicas en médula ósea de hamster chino "in vivo" y en sistemas de cultivos celulares. Schmid y col. comparan la incidencia de aberraciones cromosómicas con anomalías observadas en núcleos interfásicos. Estas anomalías nucleares causadas por efecto de drogas con actividad genotóxica, presentan una apariencia característica y son relativamente fáciles de detectar.

Muestran además un alto grado de correlación con aberraciones cromosómicas y fueron llamadas micronúcleos por presentar la apariencia de pequeños núcleos, de composición cromatínica, pero de mucho menor tamaño que el núcleo principal.

En estudios hematológicos de rutina estos micronúcleos se conocen desde hace tiempo como cuerpos de Howell-Jolly (Schmid, 1977). Sin embargo, su uso como ensayo de mutagénesis es mucho más reciente, desde que se observa un aumento de la incidencia de micronúcleos por efecto de drogas clastogénicas en tratamientos de animales "in vivo". Varios son los materiales que pueden utilizarse para detectar la presencia de estos pequeños cuerpos extranucleares, médula ósea, hepatocitos de rata, linfocitos, eritrocitos de sangre periférica. Pero sin duda la médula ósea es el tejido más ampliamente usado, abarcando la casi totalidad de la bibliografía sobre el tema.

En la médula ósea, las células de la serie roja o eritrocítica, tie-



nen su origen en los proeritroblastos que desarrollan a eritroblastos y reticulocitos antes de madurar a eritrocitos.

Sintéticamente, las células que se suceden en la serie roja son (Rhodin, 1974):

- 1- Proeritroblasto.
- 2- Eritroblasto basófilo o normoblasto basófilo.
- 3- Eritroblasto policromático o normoblasto policromático.
- 4- Eritroblasto ortocromático o normoblasto.
- 5- Reticulocito.
- 6- Eritrocito.

El desarrollo del proeritroblasto está caracterizado por una reducción gradual en el tamaño de la célula y del núcleo, una condensación gradual de la cromatina nuclear, seguida de la expulsión del núcleo principal. El núcleo es expulsado con una pequeña cubierta delgada de citoplasma y digerido por los macrófagos. Se produce también una pérdida gradual de organelas con adquisición de cantidades crecientes de hemoglobina. Esto último, sumado a los pocos polirribosomas que quedan, que gradualmente se reducen en número, se refleja en un cambio del citoplasma basofílico a eosinofílico. Así, la célula en cuestión que es útil para este ensayo, el eritroblasto policromático, presenta una coloración policromática típica que facilita su identificación en los extendidos de médula ósea, se tiñe de un color azulino-liláceo-gris característico. Luego continúa la maduración de las células de la serie, con adquisición de hemoglobina, y hasta alcanzar la forma irregular del eritrocito.

En el ensayo del micronúcleo (figura 6), la población celular de eritroblastos de médula ósea atraviesa la última replicación de ADN y mitosis, bajo la influencia de la sustancia a evaluar genotóxicamente.

Acción de una sustancia  
clastogénica

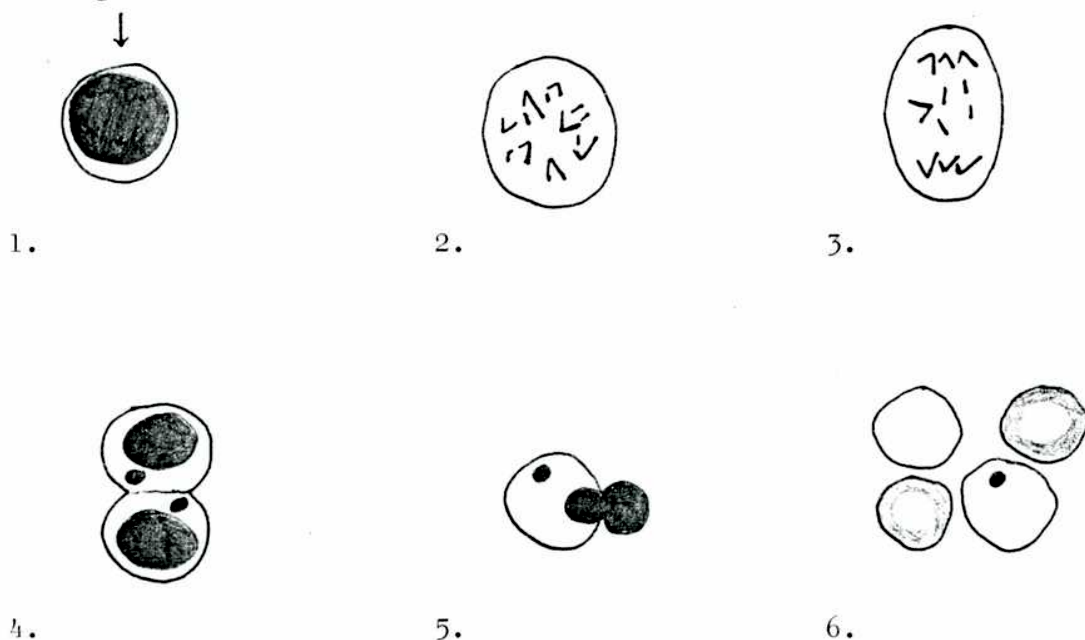


Figura 6. Formación de micronúcleos en los eritroblastos policromáticos (Schmid, 1976,a).

1. Acción de sustancias clastogénicas sobre eritroblastos de médula ósea.
2. Última división celular.
3. Anafase con fragmentos cromosómicos retardados que no alcanzan los polos del huso acromático.
4. Se completa la división celular del eritroblasto. Se observan los micronúcleos fuera del núcleo principal.
5. Expulsión del núcleo principal.
6. Se observan micronúcleos en los eritroblastos policromáticos.

Los efectos citogenéticos se computan en el eritroblasto policromático, luego de la expulsión del núcleo principal.

Bajo la influencia de un agente clastogénico se producen fragmentos cromosómicos acéntricos. En la anafase de la mitosis, estos fragmentos restan sin movimiento, mientras que los elementos céntricos se dirigen hacia los polos del huso acromático. Lo mismo ocurre con cromosomas enteros si la sustancia ha dañado el huso.

Después de la telofase, este material nuclear retardado no se comporta correctamente en la división celular, permaneciendo como micronúcleo, incluyéndose en una u otra de las células hijas, formándose el núcleo principal y uno o varios pequeños núcleos secundarios que como regla general son de menor tamaño que el principal. Aquel es expulsado, restando los micronúcleos en el eritroblasto.

Los micronúcleos son típicamente redondos con un diámetro aproximado de  $1/20$  a  $1/5$  del tamaño del eritroblasto. La mayoría de las células micronucleadas contiene sólo un micronúcleo, aún después del tratamiento con altas dosis de agentes clastogénicos. Sin embargo, pueden encontrarse células con dos o más de estos cuerpos, y aún algunos de forma alemanndrada (Schmid, 1976,b).

El ratón es el animal de elección para este ensayo, pero también puede ser realizado en ratas, hamster sirio, hamster chino y otros.

En cuanto a las dosis, vías de administración y número de tratamientos con las sustancias a ser evaluadas en el ensayo, hay distintos protocolos y los datos muestran que ninguno de los tratamientos y muestreos es óptimo para todas las sustancias (Heddle y Salomone, 1981).

Entre los compuestos evaluados por el ensayo del micronúcleo encon-

tramos un alto número de sustancias químicas que abarcan la mayoría de los grupos carcinógenos ya identificados, que poseen además capacidad mutagénica, agentes alquilantes, citostáticos, venenos del huso acromático, antimetabolitos, etc. Todos dieron resultados positivos en el ensayo del micronúcleo, obteniéndose escasos resultados falsos negativos.

Para confirmar la utilidad de este ensayo de corto plazo para detectar mutágenos y/o carcinógenos, algunos autores han estudiado la correlación de los resultados obtenidos en este ensayo y en el ensayo de Ames con los resultados de los ensayos a largo plazo de carcinogénesis en animales. Para 143 compuestos, la capacidad de detección resultó de un 80% de especificidad para ambos con un valor predictivo del 90%, mientras que existe una pequeña diferencia en sensibilidad en favor del test de Salmonella (Jenssen y Ramel, 1980).

ENSAYO DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH)

El intercambio de cromátidas hermanas es el intercambio simétrico y recíproco entre las dos cromátidas de un cromosoma, en loci aparentemente homólogos. Estos intercambios, que se detectan en preparados citológicos de cromosomas metafásicos, involucran presumiblemente ruptura de la doble hélice en ambas cromátidas, seguida de la reunión del ADN con intercambio del material genético de ambas. Esto no altera la morfología del cromosoma y la teoría indica que tampoco alteraría por sí mismo la información genética de la célula o de las células hijas, porque el material que se intercambia es simétrico entre sí proveniente de la cromátida original y la copia de ésta obtenida en la duplicación.

El ICH representaría entonces un evento natural de recombinación mitótica que se presenta en células normales con una frecuencia de 5-10/célula (Arlett, 1978).

Está comprobado que dosis subtóxicas de carcinógenos y mutágenos inducen un aumento de ICH por encima de la frecuencia normal de incidencia, por lo que el análisis de estos intercambios ofrece una posibilidad útil, sensible y cuantitativa para medir daño genético (Carrano et al., 1978). Para evidenciarlos se utilizan cromosomas metafásicos que se obtienen mediante la acción de venenos específicos del huso acromático, que detienen la división celular, como la colchicina. Los intercambios son visibles cuando los cromosomas son tratados de modo que las cromátidas hermanas puedan ser distinguidas diferencialmente unas de otras. El primero en descubrir este fenómeno fue Taylor, trabajando en células vegetales que hicieron una primera replicación de ADN en presencia de timidina tritiada, y una segunda replicación en ausencia del radioisó-

topo. La autorradiografía de estos preparados presenta cromosomas con una sola de las cromátidas radiactivamente marcada (Taylor, 1958).

La diferencia entre una cromátida y la otra permite visualizar los intercambios. Así, con el empleo de la autorradiografía se demostró el aumento de la frecuencia de ICH en células tratadas con agentes como mitomicina C, óxido de 4-nitroquinolina y luz ultravioleta. Además, los análisis con autorradiografía fueron suficientes para establecer que para la formación de ICH es necesario que la célula atraviese la fase S del ciclo celular (Wolff et al., 1974). El análisis de formación de ICH se facilitó luego con nuevas técnicas. En 1972 Zakharov y Egolina describen que en cromosomas de células de hamster chino cultivadas en presencia del análogo de base bromodesoxiuridina (BrdU) durante dos ciclos de replicación, y coloreadas luego con Giemsa, las dos cromátidas se tiñen diferencialmente (Zakharov y Egolina, 1972). Lo que ocurre es lo siguiente: las células cultivadas en presencia de BrdU (análogo de la timina) incorporan durante la división celular el antimetabolito. Como la duplicación del ADN es semiconservativa, en la primera duplicación cada cromátida va a tener una cadena de ADN en que la timina ha sido sustituida por BrdU (monosustituida). En la segunda duplicación, una de las cromátidas va a tener una cadena de ADN monosustituida y la otra bisustituida.

Esta última cromátida tiene una menor afinidad por los colorantes y su tinción es por lo tanto menos intensa (cromátida clara), respecto de la otra que aparece oscura. De esta forma se pueden identificar los intercambios ocurridos, ya que los mismos producen una discontinuidad en la coloración de una y otra cromátida (figura 7). Seguidamente Latt informa que la diferenciación es mucho más notoria si se utiliza un colorante fluorescente como la bisbenzimidazoles Hoescht 33258 (Latt, 1973). También fueron ensayados otros colorantes como naranja de acridina y 4-6 diamidina-2-fenilindol. Quizás el más empleado de todos es la combi-

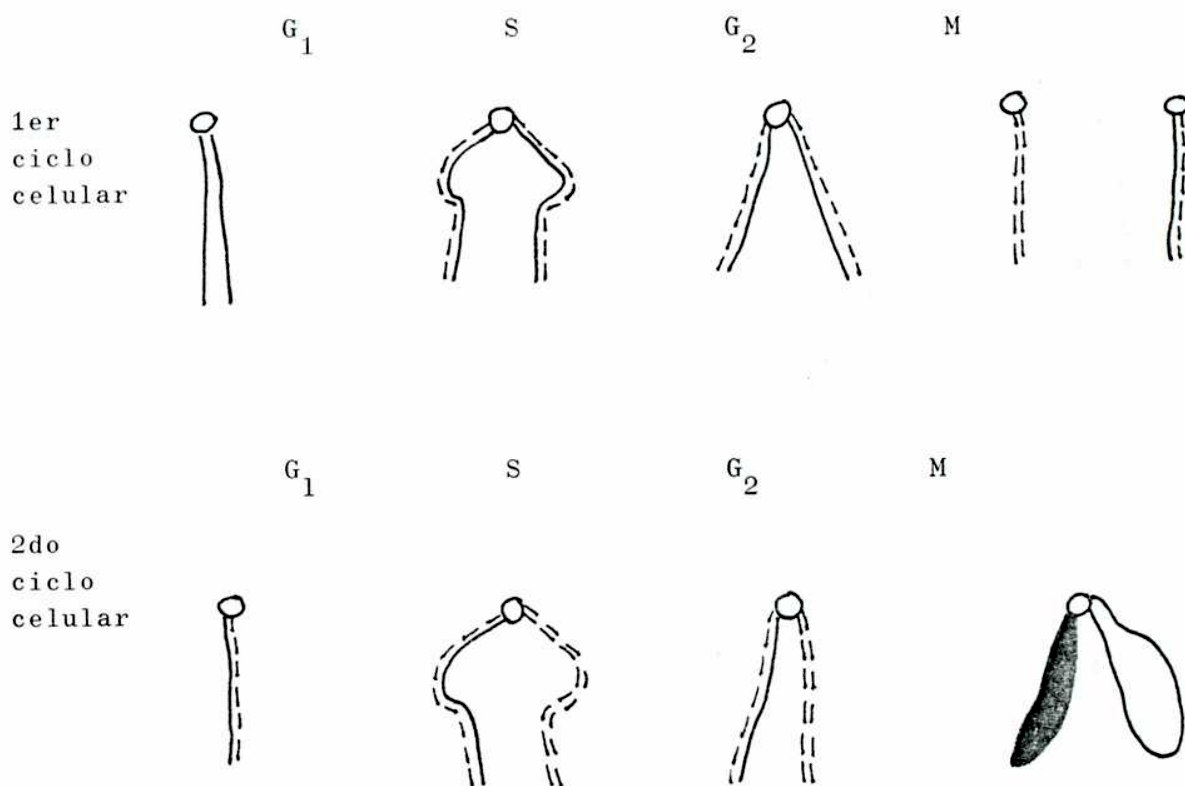
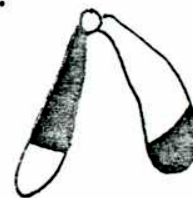


Figura 7. Representación esquemática de la incorporación diferencial de bromodesoxyuridina en los cromosomas.

Una cromátida o un cromosoma G<sub>1</sub> no replicado, están representados por una doble cadena polinucleotídica (doble hélice del ADN).

Cuando los cromosomas incorporan BrdU (-----) durante dos ciclos celulares, en la metafase de la segunda división mitótica pueden individualizarse ambas cromátidas y, por ende, los posibles intercambios de cromátidas hermanas. Por ejemplo:



nación de Hoechst 33258 más Giemsa (Perry y Wolff, 1974) que acentúa notoriamente en los cromosomas la tinción diferencial de las cromátidas, ofreciendo éstas una apariencia tal que se las denomina "arlequines" (Wolff, 1977).

En cuanto al significado biológico que tiene la expresión del ICH, existen estudios de correlación entre ICH y mutaciones en células de ovario de hamster chino. Se cuantifica la inducción de intercambios en relación con la inducción de mutaciones en la resistencia a la 8-azaguanina, correspondiente al locus de la hipoxantina fosforibosiltransferasa, hprt. Se emplean distintos compuestos químicos que difieren en su modo de interacción con el ADN. Los resultados demuestran una correlación lineal entre mutaciones e inducción de ICH, con una eficiencia diferente según el compuesto (Carrano et al., 1978).

Otros estudios consideraron a los ICH como una posible manifestación de diferentes procesos de reparación del ADN (Sasaki, 1977).

La síntesis de trabajos de diferentes autores sugiere que el ICH puede ser inducido con eficiencia por un espectro amplio de lesiones al ADN (Carrano y Thompson, 1982).

Aún cuando varios autores han intentado dilucidar el significado biológico del ICH, todavía se tiene un conocimiento incompleto de los mecanismos moleculares que llevan al mismo (Bianchi y Larramendy, 1983).

De todos modos, ello no debe invalidar la aplicación de esta técnica para identificar mutágenos potenciales (Carrano y Thompson, 1982). El desarrollo de técnicas para la tinción diferencial de cromátidas hermanas utilizando la incorporación de BrdU y la observación de un aumento en la frecuencia de ICH producido por mutágenos/carcinógenos, ha llevado al desarrollo, tanto de sistemas "in vitro" como "in vivo" para la detección de mutágenos.



Durante cierto tiempo el análisis de ICH ha estado limitado principalmente a ensayos "in vitro", particularmente a partir de cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica y de células de hamster chino, si bien cualquier tipo de célula de fácil propagación y que ofrezca buenos cromosomas metafásicos sería potencialmente útil para este ensayo (Hollstein et al., 1979). Así, la numerosa bibliografía registra estudios sobre la frecuencia de ICH inducidos en linfocitos tratados "in vitro" con combinación de drogas citotóxicas, condensado de humo de cigarrillo, plaguicidas, agentes alquilantes, hidrocarburos policíclicos y toda una variedad de potenciales mutágenos y carcinógenos.

Por otro lado, los métodos "in vivo", son relativamente más simples porque no requieren de la adición de un sistema de activación metabólica como es generalmente necesario para los sistemas "in vitro". Presentan, sin embargo, alguna desventaja como la sobrecarga de administraciones de sustancias en el diseño de tratamiento del animal de experimentación, ya que debe administrársele el análogo de base (BrdU), la sustancia a probar y la colchicina. Particularmente ha sido difícil mantener los niveles necesarios de BrdU en sangre. "Este problema ha sido resuelto de diferentes modos para sistemas "in vivo", mediante inyecciones intraperitoneales múltiples, administración endovenosa o subcutánea continua, implantación subcutánea de tabletas de BrdU o inyección intraperitoneal de BrdU absorbido en carbón activado" (Morales Ramírez, 1980).

Las células analizadas luego de tratamientos "in vivo" comprenden: médula ósea y células de glándulas salivales (Morales Ramírez, 1980), timo, bazo, hígado, células de embriones de pollo después de la exposición de los huevos a BrdU, espermatogonias de ratón, éstas últimas particularmente importantes por ser las células a partir de las cuales se originan los gametos masculinos, son un sistema relevante para estudiar riesgos genéticos (Allen, 1976).

La ventaja de algunos métodos citogenéticos, entre los que encontramos este ensayo, es la de poder monitorear las consecuencias de la exposición humana a diferentes condiciones ambientales. Existen estudios de correlación de frecuencia de ICH con la historia del hábito de fumar (Livingston y Fineman, 1983), con personal de la industria química y en general con trabajadores cuya exposición ocupacional pueda significar un riesgo de daño genético para la salud humana (Lambert et al., 1982; Dulout et al., 1985).

Este sería un tercer sistema para evaluar la inducción de frecuencia de ICH, donde las células son expuestas "in vivo" a agentes ambientales y luego son cultivadas "in vitro" con BrdU, constituyendo una combinación de sistemas "in vivo"/"in vitro" que también puede ser adaptada a animales de experimentación, realizando el tratamiento del animal con la sustancia a ensayar, seguida del cultivo de las células a examinar (Basler, 1982; Yager y Benz, 1982; Majone et al., 1983).

Por último, en los ensayos de corto plazo para mutágenos y carcinógenos, la detección de intermediarios obtenidos a partir de la biotransformación de premutágenos o precarcinógenos, requiere de la capacidad metabólica del animal intacto, (idealmente el hombre); técnicas "in vitro" con adecuados sistemas de activación metabólica; o la combinación de métodos "in vivo"/"in vitro" donde se utiliza toda la capacidad metabólica del mamífero intacto, pero los efectos genotóxicos son analizados "in vitro" por la aislación de las células o tejidos afectados "in vivo" (Bartsch, 1980).

Para intentar abarcar este panorama es que se emplea en este trabajo un método "in vivo" como el ensayo del micronúcleo en médula ósea de ratones; ensayos "in vitro" con diferentes sistemas de activación metabólica como los estudios de unión covalente de compuestos químicos con macromoléculas celulares donde también se incluyen algunas experiencias "in vivo" y una combinación "in vivo"/"in vitro" como el ensayo de intercambio de cromátidas hermanas.

P A R T E    E X P E R I M E N T A L

Los fármacos antichagásicos empleados en la parte experimental de este trabajo son:

- Nifurtimox (5 metil-4-(5' nitrofurfuriliden-amino)-tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido), donación de A.G.Bayer Leverkusen, Alemania Federal.
- Benznidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida), donación de F.Hoffman-La Roche & Co., Basle, Suiza.
- $^{14}\text{C}$ -Benznidazol, con  $^{14}\text{C}$  en la posición 2 del anillo imidazol, actividad específica 58,6 uCi/mg, donación de F.Hoffman-La Roche & Co., Basle, Suiza.
- El resto de los compuestos químicos que se emplean, detallados en cada uno de los métodos, son de la mayor calidad posible.

#### ESTUDIOS DE UNION COVALENTE DEL $^{14}\text{C}$ -BENZNIDAZOL A MACROMOLECULAS CELULARES.

##### METODOS.

- Unión covalente del  $^{14}\text{C}$ -Benznidazol al ADN.

Estudios "in vivo".

Con el fin de estudiar "in vivo" la unión covalente del BZ al ADN se partió de hígados de ratas o ratones tratados con  $^{14}\text{C}$ -BZ, sacrificados a distintos tiempos luego de la administración del fármaco.

Animales y tratamientos:

Se emplearon ratas Sprague Dawley (200-220 gs) con administración oral (p.o.) de  $^{14}\text{C}$ -BZ en carboximetilcelulosa 1%, 10 uCi/200 gs.

Dosis: 10 mg/kg. Tiempos de intoxicación: 1 h., 6 hs ó 24 hs. Se emplearon ratones de la cepa suiza (20-25 gs) con administración oral (p.o.)

de  $^{14}\text{C}$ -BZ en carboximetilcelulosa 1%; 5,6 uCi/25 gs. Dosis: 10mg/kg.  
Tiempo de intoxicación: 6 hs.

Cumplidos los tiempos de intoxicación indicados, los animales se sacrifican por decapitación, inmediatamente desangran y se obtienen los hígados completos. Estos se procesan a 0-4°C según se indica en el siguiente título.

- Obtención del ADN de hígado de rata o ratón (Swann, 1968).

Se homogeneizan x gs de hígado con 7 volúmenes de SSC (Cloruro de sodio 0,3M: Citrato de sodio 0,03 M), centrifugando luego el homogeneizado a 5.000 g durante 20 min. Se resuspende el precipitado con 5 volúmenes de SSC y se lo centrifuga en idénticas condiciones que el anterior.

Se resuspende nuevamente el precipitado empleando 10 volúmenes de Cloruro de sodio 1 M, 1 volumen de sodio dodecil sulfato(SDS)10% y 10 volúmenes de Kirby-Fenol. La composición del Kirby-Fenol es: 500 g de fenol, 55 ml de agua destilada, 70 ml de m-cresol y 0,5 g de 8-hidroxiquinolina.

Se agita la mezcla enérgicamente durante 30 min. con agitador Burrel, tipo "Wrist action" y posteriormente se la centrifuga a 15.000 g. durante 30 min. Como en el sobrenadante queda retenido el ADN, se lo precipita con etanol p.a. con ayuda de una varilla de vidrio. A continuación se efectúa la purificación del ADN, redisolviéndolo con 20 ml de acetato de sodio 5%, incubándose a 35°C con solución de ribonucleasa (Ribonucleasa A de páncreas bovino, Sigma Chemical Co.), precalentada a 80°C durante 10 minutos. La digestión del ARN se permite durante 15 min. al cabo de los cuales se reprecipita el ADN con 20 ml de etoxi-etanol. El ADN es recogido con ayuda de una varilla de vidrio. Se lo resuspende nuevamente con 12 ml de agua destilada, 12 ml de  $\text{PO}_4 \text{HK}_2$  2,5 M y 12 ml de metoxietanol y luego de una centrifugación a 3.000 g durante 30 min (5°C) el ADN queda retenido en el sobrenadante. Se lo precipita con cetil trimetil amonio 1% y el ADN es recogido con ayuda de una varilla

de vidrio. A continuación el ADN se lava en forma sucesiva con: agua destilada ( 2 veces), ACNa 2%: etanol 70%, 1:1 (durante 15 min), etanol p.a., etanol: éter 1:1. Se efectúan lavados con éter hasta tener radiactividad negativa en los líquidos de lavado. Se determina la radiactividad presente según se describe en el siguiente título.

- Determinación de la unión covalente del  $^{14}\text{C}$ -Benznidazol al ADN.

El ADN purificado obtenido a partir del tejido es secado e hidrolizado por calentamiento en 2 ml de ClH 1N durante 60 min a 100°C. Se evapora a sequedad a 50°C y se redisuelve en 0,05 ml de agua destilada, 0,5 ml de Protosol y 10 ml de Dimilume. El Protosol (New England Nuclear) es un solubilizador de muestras biológicas constituido por una base cuaternaria fuerte en tolueno. Dimilume (Packard) es cóctel de centelleo que incluye un inhibidor de quimioluminiscencia.

Se determina la radiactividad en contador de centelleo líquido. Se considera significativa la marca asociada a una muestra, respecto de otra, cuando se supera en un 50% el valor de radiactividad determinado en ésta (Bookes y Lawley, 1977).

- Unión covalente del  $^{14}\text{C}$ -Benznidazol a proteínas microsomales y ADN.

Estudios "in vitro".

Se incuba el ADN a 37°C en presencia del fármaco marcado en un medio de suspensiones de microsomas de hígado de rata. Bajo diferentes condiciones experimentales de incubación se determina la capacidad de estos microsomas de biotransformar el  $^{14}\text{C}$ -Benznidazol en metabolitos reactivos que se unan, covalentemente a sus proteínas y al ADN. Se intenta determinar de esta manera las vías de biotransformación y activación del fármaco.

- Obtención de microsomas de hígado de rata (Castro, 1967).

Se emplean ratas machos de la cepa Sprague Dawley (200-220 gs). Los animales tienen libre acceso a agua y un ayuno de 12-14 hs., previo a ser sacrificados. Se decapitan, inmediatamente desangran y se obtienen los hígados completos. Desde este momento y hasta la incubación, todo el material se manipula a 0-4°C. Los hígados se homogeneizan con ayuda de un homogeneizador de teflón y vidrio Potter-Ehvehjem, con 4 volúmenes de CLK 1,15%. El homogeneizado se centrifuga a 9.000 g. durante 20 min. El sobrenadante que se obtiene se ultracentrifuga a 105.000 g por 1 h. Los microsomas de hígado de rata que precipitan se emplean como medio de incubación para los estudios "in vitro".

- Incubaciones "in vitro" para determinar la unión covalente del <sup>14</sup>C-Benznidazol a proteínas microsomales y ADN.

Los medios de incubación estuvieron constituidos por: microsomas de hígado de rata (4- 5,5 mg de proteína microsomal/ml.de medio, determinada por Lowry, 1951) ADN incorporado al medio de incubación (2mg/ml), 3 ul de una solución de <sup>14</sup>C-BZ en dimetilformamida (grado cromatográfico) y 80 ul de sistema generador de NADPH con el cual se iniciaron las incubaciones. El ADN es ácido desoxyribonucleico de timo bovino, altamente polimerizado (Sigma Chemical Co). Se emplearon soluciones de 0,02 mM y 0,2 mM de <sup>14</sup>C-BZ según se indica para cada experimento. El sistema generador de NADPH usado fue: 0,4 ml.de buffer fosfato 20 mM pH 7,4; 0,1 ml de Cl<sub>2</sub>Mg 1M; 0,3 ml de isocítrico deshidrogenasa tipo I de corazón porcino (Sigma Chemical Co.); 62mg de DL-ácido isocítrico sal trisódica (Sigma Chemical Co.) y 10mg de NADP sal sódica (Sigma Chemical Co.)

Las incubaciones fueron de 60 min. a 37°C, bajo una atmósfera de



nitrógeno o aire según se indica. El volúmen final de los medios de incubación fue de 5 ml con buffer fosfato 20 mM pH 7,4.

- Aislamiento de ADN incorporado al medio de incubación (Swann y Magee, 1968).

Para obtener ADN a partir de tejidos se usa generalmente el procedimiento del Kirby-Fenol (Swann y Magee, 1968), seguido de una enérgica purificación como se describió para los estudios "in vivo". La desproteínización del ADN mediante este tratamiento se logra con un porcentaje de contaminación menor de 0,5%.

En este título, en que se describe el aislamiento de ADN a partir de medios de incubación de microsomas, el paso inicial, luego de finalizada la incubación, es una ultracentrifugación a 105.000g durante 60 min., descartando en el precipitado la casi totalidad de las proteínas, por ende la purificación posterior al tratamiento con Kirby-Fenol es más suave.

El procedimiento seguido es sintéticamente el siguiente: Se ultracentrifugan las mezclas a 105.000g. durante 60 min. Las proteínas precipitan y el ADN se obtiene en el sobrenadante. Este se trata con igual volúmen de Kirby-Fenol. Se agita la mezcla enérgicamente durante 45 min. con un agitador Burrel, tipo "Wrist action". Posteriormente se la centrifuga a 15.000 g. durante 20 min. En el sobrenadante queda retenido el ADN y se lo precipita con 2 volúmenes de alcohol 95°, recogiénoselo con ayuda de una varilla de vidrio. A continuación se lava el ADN con AcNa 6,66%: alcohol 95°, 1;1, durante 15 min. El ADN se lava y se seca con alcohol 95° y con éter p.a. hasta tener radiactividad negativa en los líquidos de lavado.

- Determinación de la unión covalente del  $^{14}\text{C}$ -Benznidazol a proteínas microsomales (Díaz Gómez et al., 1973).

Las proteínas microsomales precipitadas por ultracentrifugación son lavadas con ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Luego son calentadas en TCA 5% a 85-90°C durante 30 min., para eliminar ácidos nucleicos. Finalmente son lavadas sucesivamente y hasta radiactividad negativa en los líquidos de lavado, con etanol: dietiléter: cloroformo, 2:2:1; acetona; y dietiléter. Estos lavados eliminan los lípidos y el BZ no unido covalentemente, además de secar el precipitado. Se disuelve una alícuota de la muestra de proteína en ácido fórmico concentrado y se determina la radiactividad en contador de centelleo líquido usando 5 ml de butilcellosolve 48% y 15 ml de 2,5-difeniloxazol PPO 8g/lit en tolueno: butil cello-solve, 3:1. Se considera significativa la marca asociada a una muestra, respecto de otra, cuando se supera en un 50% el valor de radiactividad determinado en ésta (Brookes y Lawley, 1977).

- Unión covalente del  $^{14}\text{C}$ -Benznidazol a proteínas y ADN nucleares.  
Estudios "in vitro".

Se efectúan incubaciones a 37°C en un medio de núcleos purificados de hígado de rata, en presencia del fármaco marcado. Bajo diferentes condiciones experimentales de incubación se determina la capacidad de estos núcleos de biotransformar y activar al  $^{14}\text{C}$ -BZ a metabolitos reactivos que se unan covalentemente a sus proteínas y ADN nucleares.

- Obtención de núcleos purificados de hígado de rata (Blobel y Potter, 1966).

Se homogeneizan 10 g. de hígado con 30 ml de sacarosa 0,25 M en solución A. La solución A está compuesta por: Tris (hidroximetil)-amino-metano/clorhídrico 0,05 M pH8; cloruro de potasio 0,025 M; 2-mercapto-etanol 0,005 M; etilendiamina tetracético EDTA, sal disódica 0,001 M y

acetato de magnesio 0,005 M.

El homogeneizado se filtra a través de 4 capas de gasa con ayuda de un filtro Buchner y bomba de vacío. El filtrado se centrifuga a 800 g durante 10 min. Al precipitado se le efectúan 2 nuevas resuspensiones y centrifugaciones a idéntico volúmen de sacarosa 0,25 M en solución A y rpm empleados antes. El último precipitado se resuspende en 5 ml. de sacarosa 0,25 M en solución A y 10 ml de sacarosa 2,5 M en solución A. La concentración de sacarosa de la mezcla es aproximadamente 1,62 M, que es la densidad suficiente para retener las mitocondrias y el retículo endoplásmico rugoso. La mezcla se deposita sobre 5 ml de sacarosa 2,5M en A. Se ultracentrifuga a 75.465 g durante 2 hs. El precipitado blanco de núcleos que se obtiene se purifica con 2 resuspensiones adicionales en sacarosa 0,25 M en solución A y centrifugaciones a 800 g.

En el presente estudio se partió de 75 gs de hígado de rata para obtener los núcleos necesarios para cada frasco de incubación. Esta técnica permite obtener núcleos que en microscopía de contraste de fase se observan intactos y en microscopía electrónica se observan sólo trazas de contaminación con retículo endoplásmico.

- Incubaciones "in vitro" para determinar la unión covalente del  $^{14}\text{C}$ -Benznidazol a proteínas y ADN nucleares.

Los medios de incubación estuvieron constituidos por: núcleos purificados de hígado de rata, 5 ul de una solución de  $^{14}\text{C}$ -BZ en dimetilformamida (grado cromatográfico) y 80 ul de sistema generador de NADPH con el cual se iniciaron las incubaciones. Los núcleos purificados se resuspendieron en el medio de obtención de los mismos, detallado en el título anterior, requerido para la estabilidad de las suspensiones nucleares en las incubaciones. La concentración de proteínas nucleares

fue de 3 - 3,3 mg/ml de medio (Lowry et al., 1951) y el volúmen final de incubación fue de 3 ml.

La concentración final del  $^{14}\text{C}$ -BZ fue 0,02 mM.

El sistema generador de NADPH es el empleado en las incubaciones anteriores. Las incubaciones fueron de 60 min. a 37°C, bajo una atmósfera de  $\text{N}_2$  o aire, según se indica.

Aislamiento de proteínas y ADN nucleares a partir de núcleos purificados de hígado de rata (Vaught y Bresnick, 1976).

Finalizada la incubación los núcleos son precipitados por centrifugación a 1.000 g durante 10 min. y lavados tres veces con sacarosa 0,25 M en solución A (medio usado en la obtención de los mismos). Se procede a lisar los núcleos homogeneizándolos suavemente con cloruro de sodio 0,03 M/ citrato de sodio 0,003 M: sodio dodecil sulfato 2%, 1:1. La suspensión obtenida se trata con fenol saturado en buffer agitándola energicamente durante 30 min. en agitador Burrel, tipo "Wrist action". Luego la mezcla se centrifuga a 10.000 g durante 20 min y la fase fenólica es conservada para precipitar las proteínas con TCA y determinar la unión covalente del  $^{14}\text{C}$ -BZ a proteínas nucleares, según lo antes descrito bajo el título : Determinación de la unión covalente del  $^{14}\text{C}$ -BZ a proteínas microsomales. Por otro lado, los ácidos nucleicos son precipitados de la fase acuosa con etanol p.a. frío recogiéndose el ADN con ayuda de una varilla de vidrio. A continuación se efectúa la purificación del ADN. Se redisuelve el ADN en buffer  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  20mM pH 7,4, incubándose-lo a 35°C con solución de ribonucleasa A de páncreas bovino (Sigma Chemical Co.). La digestión del ARN se permite durante 60 min. precipitándose posteriormente el ADN con etanol frío p.a.. El ADN se recoge con ayuda de una varilla de vidrio y se seca varias veces con éter p.a.

hasta radiactividad negativa en los líquidos de lavado. La determinación de la marca asociada se efectúa según lo antes descrito bajo el título : Determinación de la unión covalente del  $^{14}\text{C}$ -Benznidazol al ADN.

- Obtención de diferentes fracciones de proteínas nucleares de hígado de rata (Steele y Busch, 1963).

Para la separación de las distintas fracciones de proteínas nucleares se partió de los núcleos, al finalizar la incubación. Se efectúa el procedimiento descrito por Steele y Busch que se sintetiza en la fig.8. Las proteínas nucleares solubles (I y II) se extraen dos veces con 10 volúmenes de  $\text{ClNa}$  0,14 M y una vez con 5 volúmenes de buffer tris 0,1 M pH 7,6 por homogeneización y agitación durante 20 min. Al centrifugar estas suspensiones a 6.000 g se obtienen en los sobrenadantes las fracciones I y II respectivamente (figura 8).

Luego de la extracción con tris, el precipitado se trata con 1-2 volúmenes de  $\text{ClNa}$  2 M por cada gramo de tejido húmedo para extraer las desoxyribonucleoproteínas-I (III). En esta extracción la muestra es triturada durante 20 segundos, con varias gotas de octanol para controlar la formación de espuma. El extracto es centrifugado a 25.000 g durante 1 h y el sobrenadante se decanta y es guardado durante una noche en congelador (- 40°C). Esta es la fracción III que comprende a las proteínas básicas ligadas al ADN a partir de la cual se obtienen luego las histonas (figura 8).

El precipitado de 25.000 g con 1/4 del volumen inicial del  $\text{ClNa}$  2M es agitado durante toda una noche con la ayuda de una barrita magnética y luego de una centrifugación a 16.000 g durante una hora se le reextrae durante otra hora, seguida de igual centrifugación. Las dos suspensiones que se obtienen se combinan y centrifugan a 20.000 g durante 20 min.

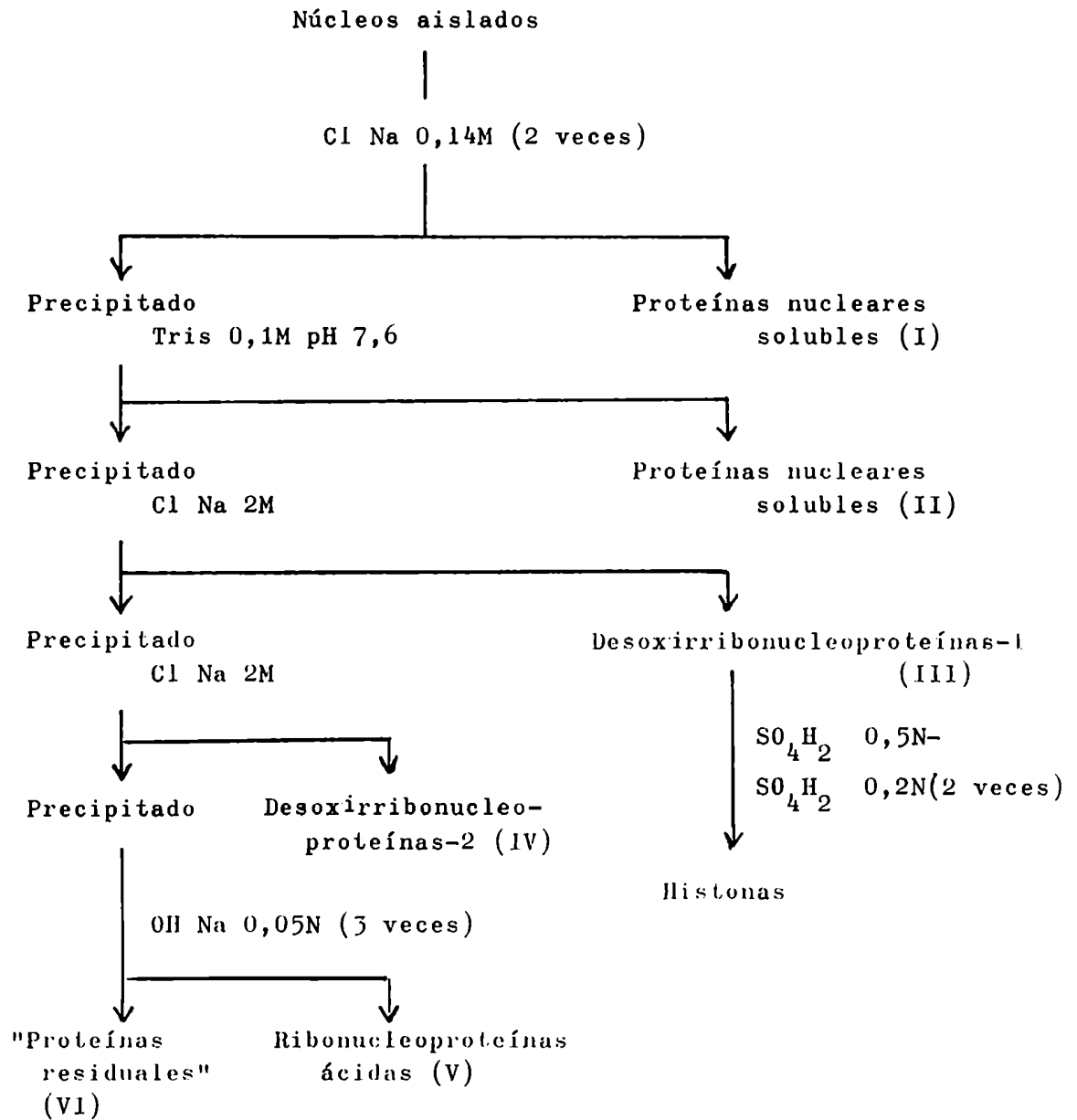


Figura 8. Obtención de diferentes fracciones de proteínas nucleares de hígado de rata (Steele y Busch, 1963).

El sobrenadante contiene las proteínas ácidas (no histonas) ligadas al ADN correspondientes a la fracción de desoxirribonucleoproteínas-2 (IV) (figura 8). El precipitado contiene las ribonucleoproteínas ácidas (V), proteínas ácidas no ligadas al ADN, y las proteínas residuales (VI).

Para obtener estas dos últimas fracciones se trata el precipitado con HONa 0,05 N durante 2 min. con homogeneización suave, y centrifugación a 20.000 g durante 20 min. El sobrenadante es llevado a pH 6 con la ayuda de ClH diluído.

El precipitado se extrae otras 2 veces con HONa 0,05 N durante 20 min. con ayuda de una barrita magnética. Los dos extractos se centrifugan, los sobrenadantes se decantan, se tratan como la vez anterior y se combinan con el primer extracto alcalino obteniéndose la fracción V de ribonucleoproteínas ácidas (no histonas) no ligadas al ADN. El precipitado está formado por las proteínas residuales (VI). (figura 8).

Esta fracción residual que resta luego de la extracción de las ribonucleoproteínas y las desoxyrribonucleoproteínas es conocida como "nucleolochromosomal apparatus", es decir corresponde a la red nuclear ribonucleoproteica.

De la fracción de desoxirribonucleoproteínas-1 (III) ya obtenida (figura 8) se extraen las histonas. A partir de esta fracción III, el primer extracto de ClNa 2M, se lleva a 4°C y es tratado con una concentración final de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,5 N para extraer histonas. Se centrifuga a 20.000 g durante 20 min. y el precipitado es tratado con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,2 N dos veces, por homogeneización y centrifugación. Ambos sobrenadantes se combinan y ajustan a una concentración final de TCA 20% , obteniéndose así las histonas (figura 8).

En todas las fracciones, para favorecer la precipitación de las proteínas, se emplea albúmina de huevo (Sigma Chemical Co.), 15 mg/fracción. Las fracciones de proteínas precipitadas son sucesivamente lavadas y secadas con TCA 20%, etanol p.a., y éter p.a. hasta radiactividad negativa en los líquidos de lavado.

La determinación de radiactividad asociada a cada una de las distintas fracciones proteicas se efectúa según lo descripto para proteínas microsomales.



## ENSAYO DEL MICRONUCLEO

### MATERIALES

- Carboximetilcelulosa, sal sódica (Sigma Chemical Co.)
- Suero fetal bovino (Gibco Laboratories), inactivado a 56°C durante 30 min.
- Solución de May-Grunwald "Biochem", preparada con colorante Gurr-London.
- Solución Giemsa "Biochem", preparada con colorante Gurr-London.

### METODO

Animales y tratamiento: Se emplean ratones machos de la cepa Suiza, de 9 a 11 semanas de vida.

El Nifurtimox o el Benznidazol se resuspenden en carboximetilcelulosa al 1%. Los fármacos se administran por vía oral (p.o.) o intraperitoneal (i.p.), en dos administraciones, con una separación de 24 hs., la última 6 hs antes del sacrificio del animal.

Las dosis empleadas son de 600-1200 y 2000 mg/kg para el NFX y de 850 y 2000 mg/kg para el BZ.

Cada grupo experimental consta de 2 a 9 ratones.

### Obtención de extendidos de médula ósea (Schmid, 1976,b).

Los animales se sacrifican por dislocación cervical e inmediatamente se obtienen los dos fémures completos. Para ello se corta a través de los huesos pélvicos y por debajo de la rodilla. Los huesos se limpian de piel y músculo con el uso de pinzas y bisturí. El extremo distal del fémur es fácil de limpiar, traccionando suavemente la rodilla queda cerrada la cavidad de la médula.

El extremo proximal del fémur se recorta cuidadosamente hasta que quede visible y abierto el canal de la médula.

Se colocan 5 ml de suero fetal bovino en un tubo cónico. Por medio de una jeringa con aguja (0,25 cc) se aspira suero e insertando la aguja a pocos milímetros de profundidad en la parte proximal del canal medular se sumerge el fémur en el suero y con sucesivas aspiraciones y expulsiones la médula ósea es extraída del hueso. De este modo las células llegan al suero en una fina suspensión y no como gruesas partículas.

El tubo se centrifuga a 1.000 rpm durante 5 min. y el sobrenadante se descarta con ayuda de una pipeta Pasteur. Las células del sedimento se mezclan suavemente mediante sucesivas aspiraciones.

Se coloca una pequeña gota de esta suspensión viscosa en el extremo de un portaobjetos y con la ayuda de otro portaobjetos en un ángulo de 45° se prepara el extendido de médula ósea. El tamaño de la gota debe ser tal que todo el material quede extendido en una distancia de 2-5 cm.

Los extendidos se dejan secar al aire para colorearlos al día siguiente.

#### Tinción y análisis de extendidos de médula ósea.

La secuencia de coloración de los extendidos es la siguiente:

1. Solución de May-Grunwald sin diluir, 5 min.
2. May-Grunwald: agua destilada, 1:1, 2 min.
3. Giemsa: agua destilada, 1:6, 10 min.
4. Lavar con agua destilada.
5. Secar delicadamente con papel de filtro.
6. Xileno p.a., 5 min.
7. Limpiar el reverso de los portaobjetos con metanol.

8. Se montan los preparados con Bálsamo del Canadá (E.Merck A.G.) y se observan al microscopio.

Como es habitual, los extendidos son observados a bajo aumento para elegir regiones de calidad óptima, con células correctamente extendidas y teñidas. Se considera como indicación de buena calidad del sector del preparado una buena morfología de las células nucleadas; la presencia de eritrocitos sin bordes contorneados ni aspecto globoso, la colocación rosada intensa de los eritrocitos maduros y con suave tinte azulado de las formas inmaduras, los eritroblastos policromáticos, objeto de este análisis.

En los extendidos de ratones controles, sin tratamiento, la proporción de eritrocitos en el total de las células es de aproximadamente del 8% y escasamente la mitad de éstos son policromáticos.

En todos los casos son analizados 1000 eritroblastos policromáticos por animal para obtener el número de eritroblastos micronucleados por cada 1000 eritroblastos policromáticos, cubriendo las identificaciones de los extendidos para efectuar el análisis con imparcialidad.

La frecuencia normal de micronúcleos es baja, con una incidencia por debajo de 0,5% de eritroblastos policromáticos micronucleados por cada 1.000 eritroblastos policromáticos analizados.

Un aumento estadísticamente significativo de estos valores se interpreta como actividad genotóxica del compuesto en estudio. A tal efecto, se usan tablas para determinar significación estadística en frecuencias de mutación (Kastenbaum y Bowman, 1970).

Además se analizó el número de eritroblastos ortocromáticos micronucleados en el campo que contiene los 1.000 eritroblastos policromáticos, como un método para evitar artefactos. Se sospecha la presencia

de éstos si son contados más de 5 eritroblastos ortocromáticos micronucleados o si los micronúcleos estuvieran distribuidos en igual proporción en los dos tipos de eritrocitos.

Metabolismo reductivo del Benznidazol y Nifurtimox en médula ósea de ratón.

Se efectúan estudios "in vitro" para determinar la capacidad de la médula ósea de ratón de nitro-reducir el Benznidazol y el Nifurtimox, en el proceso de biotransformación y activación de los mismos.

Se efectúan incubaciones a 37°C con suspensiones de médula ósea de ratón, en presencia de BZ o NFX y de sistema generador de NADPH. La médula ósea de ratón se obtiene según se describe anteriormente bajo el título : Obtención de extendidos de médula ósea, utilizando en la extracción una solución salina de Krebs-Ringer.

La solución de Krebs-Ringer está compuesta por 100 ml de solución A, 10 ml de solución B y 200 mg de glucosa. Solución A: 8,2 g ClNa; 0,4 g ClK; 0,2 g Cl<sub>2</sub>Ca; 0,5 g SO<sub>4</sub>Mg.7 H<sub>2</sub>O y 0,2 g PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K llevados a 1 lt. con agua destilada. Solución B: buffer fosfato 0,1M pH 7,4.

Se utiliza la médula ósea de los fémures de 7 ratones para cada frasco de incubación.

La concentración de proteínas del medio de incubación es de 4-4,5 mg de proteína/ ml. y el volumen final de incubación es de 2,5 ml. Se emplearon soluciones de BZ (0,2 mM) o NFX (0,2 mM) en dimetilformamida (grado cromatográfico)

El sistema generador usado es : 0,4 ml de buffer fosfato 20 mM pH 7,4; 0,1 ml de Cl<sub>2</sub>Mg 1 M; 0,3 ml de isocítrico deshidrogenasa tipo I de corazón porcino (Sigma Chemical Co.); 62 mg de DL-ácido isocítri-

co sal sódica (Sigma Chemical Co.) y 10 mg de NADP sal sódica (Sigma Chemical Co.).

Las incubaciones se efectúan a 37°C durante 60 min., bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La reacción se detiene con SO<sub>4</sub>Zn 15%, 1 ml., y se agita energí- camente.

El volúmen total del medio de incubación se recibe en 2,5 g de ClNa agitando nuevamente. Se agrega acetato de etilo y luego se mezcla en agitador tipo Vortex a máxima velocidad durante 1 min. y se centrifuga a 4.000 rpm.

Lograda la partición se utiliza la fase superior orgánica para leer en espectrofotómetro. Las lecturas se efectúan a 400 nm para el NFX y 315 nm para el caso del BZ. La reducción "in vitro" bajo condiciones anaeróbicas es medida por una pérdida de absorbancia y a través de una curva de calibración con cantidades crecientes de NFX o BZ en acetato de etilo se deduce la cantidad de sustrato convertido. La actividad nitro-reductiva de ambos fármacos se expresa como nmoles de NFX o BZ . min<sup>-1</sup>.(mg proteína)<sup>-1</sup>.

ENSAYO DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS.MATERIALES.

- Carboxymetilcelulosa, sal sódica (Sigma Chemical Co.).
- Medio de cultivo: medio nutritivo F-10 Ham (Gibco Laboratories) pH 7,2 - 7,4 con suero fetal bovino al 15% y solución de antibióticos al 1%.
- Suero fetal bovino (Gibco Laboratories) inactivado a 56°C durante 30 min.
- Solución de antibióticos: 0,1 g de estreptomicina (Sigma Chemical Co.) y 0,05988 g de penicilina (Sigma Chemical Co.) en 10 ml de agua bidestilada.
- Fitoheмоaglutinina tipo V obtenida de Phaseolus vulgaris (Sigma Chemical Co.)
- BrdU: 5-Bromo 2'desoxiuridina (Sigma Chemical Co.)
- Colchicina (Sigma Chemical Co.)
- Solución de azul tripán: 4 partes de solución A y 1 parte de solución B. Solución A: azul tripán 0,5% en agua bidestilada, filtrar. Solución B: ClNa 4,25% en agua bidestilada, filtrar. Las soluciones A y B se mezclan en el momento de usar. La mezcla se usa en partes iguales con la suspensión celular.
- Solución hipotónica de ClK 0,075 M.
- Fijador: alcohol metílico p.a.: ácido acético glacial p.a., 5:1.
- Solución 2 X SSC: 2 X (ClNa 0,15 M: Citrato de Na 0,015 M).
- Solución de Hoechst, Bisbenzimidida H 33258 en agua bidestilada, 1 ug/ml, (Riedel de Haënag).
- Solución Giemsa "Biochem", preparada con colorante Gurr-London.
- Solución buffer de fosfatos: 70 ml de  $PO_4H_2K$  0,06 M y 30 ml de  $PO_4Na_2H. 12 H_2O$  0,06 M.

## METODO

Se evalúa la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) inducida en ratones con una exposición "in vivo" al NFX o BZ, seguida de un cultivo "in vitro" de los bazos correspondientes. Se efectúan cultivos de homogeneizados de bazo en presencia de fitohemoaglutinina, para estimular las divisiones mitóticas celulares (Nowell, 1960) y de BrdU, para lograr una posterior coloración diferencial de las cromátidas hermanas (Zakharov y Egolina, 1972), y poder efectuar el análisis de los ICH en los linfocitos de bazo de ratón.

El descubrimiento de que la fitohemoaglutinina estimula los leucocitos en cultivo (Nowell, 1960), condujo al uso generalizado de esta técnica, principalmente en cultivo de sangre periférica humana y luego en distintas especies de mamíferos. Este extracto vegetal, usado originalmente para aglutinar eritrocitos posee actividad mitogénica, llevando a los linfocitos a un estado donde son capaces de dividirse. Este hecho, unido a la técnica descrita por Moorhead y col. para obtener extendidos cromosómicos (Moorhead et al., 1960) ofreció la posibilidad de combinar el cultivo de células con una técnica citológica para efectuar estudios cromosómicos.

En el presente trabajo se cultivaron linfocitos de bazo de ratón con inducción de transformación blástica (Fowler et al., 1971) y una coloración diferencial de las cromátidas hermanas para detectar ICH y determinar posibles efectos genotóxicos del BZ y NFX en ratones tratados con estos fármacos.

### Animales y tratamiento

Se emplean ratones de la cepa Suiza de 2-3 meses de vida. Se les administra NFX o BZ por vía oral (p.o.) en una suspensión de carboximetilcelulosa al 1%. Las dosis empleadas fueron: 1.200 y 2.000 mg/kg para el NFX y 2.000 mg/kg para el BZ. Los animales controles negativos recibie-

ron sólo carboximetilcelulosa al 1% p.o..

Los animales se sacrifican por decapitación 24 hs después de la administración de los fármacos, se cultivan los bazos y se procesan las células de modo de obtener los extendidos para estudios cromosómicos de intercambios de cromátidas hermanas.

#### Cultivo de bazo de ratón

Se extrae estérilmente el bazo completo con ayuda de pinzas y tijeras y se coloca inmediatamente en cápsula de Petri conteniendo medio de cultivo. A continuación se disgrega el tejido a través de una malla de acero fino. El recuento celular se realiza con ayuda de cámara de Neubauer, determinándose la viabilidad celular con solución de azul tripán, y excluyéndose las células coloreadas muertas. Se distribuyen 10 ml de medio de cultivo y suspensión de células de bazo en erlenmeyers de 50 ml hasta una concentración celular final  $1 \times 10^6$  células/ml de medio. La viabilidad celular es de 97%. A cada erlenmeyer se le adiciona fitohemoaglutinina (concentración final 100 ug/ml) y BrdU (concentración final 3 ug/ml). Los cultivos se efectúan a 37°C durante 72 hs. en oscuridad, en estufa de atmósfera humidificada y gaseada con 5% de CO<sub>2</sub>. Una hora y media antes de finalizar las 72 horas de cultivo, se agrega colchicina en una concentración final de 0,9 ug/ml.

#### Preparación de extendidos para analizar intercambio de cromátidas hermanas.

Una vez finalizada la incubación el volúmen contenido en cada erlenmeyer es trasvasado a tubos cónicos y se centrifugan a 600-800 rpm durante 10 min. Se descarta el sobrenadante, adicionándose 10 ml de solución hipotónica (ClK 0,075 M en agua bidestilada) y se resuspende suavemente. El tratamiento hipotónico se prolonga durante 20 min., a 37°C. A continuación



se adicionan 2 o 3 gotas de fijador y luego de centrifugar a 600-800 rpm durante 10 min., se descarta el sobrenadante y se resuspende en fijador, dejando durante 20 min., al cabo de los cuales se centrifugan las muestras y se descarta el sobrenadante. Se adicionan 5 ml. de fijador se resuspende suavemente, centrifugando y descartando el sobrenadante. Se repite este paso 4 ó 5 veces.

El precipitado final se diluye con fijador hasta tener la concentración adecuada para hacer los extendidos. Los extendidos de células se efectúan sobre portaobjetos limpios y secos y luego de dejarlos envejecer como mínimo 5 días, se colorean. Se utiliza solución de Hoechst durante 15 min., en oscuridad y luego se exponen a luz ultravioleta entre 18 hs. Se lavan con abundante agua corriente y se incuban en 2 X SSC a 60°C durante 2 hs. Por último se colorean con solución de Giemsa al 5% en buffer de fosfatos pH 7, durante 15 min., se lavan y observan al microscopio.

#### Análisis de intercambio de cromátidas hermanas en cromosomas metafásicos.

La frecuencia de ICH fue determinada analizando un promedio de 50 metafases completas (2n:40) por animal.

Las células de la primera división mitótica ( $M_1$ ) contienen cromosomas con ambas cromátidas hermanas uniforme e intensamente teñidas. Las células de la segunda división mitótica ( $M_2$ ) tienen los cromosomas arlequines con una cromátida oscura y una cromátida clara, mientras que las células de la tercera división mitótica ( $M_3$ ) contienen algunos cromosomas arlequines y otros con ambas cromátidas hermanas uniformemente claras.

Los ICH se visualizan en cromosomas que se han replicado 2 veces presencia de BrdU, es decir que se encuentran en la segunda división mitótica ( $M_2$ ). Los extendidos celulares de los animales controles y tratados se

identifican independientemente, cubriéndose las identificaciones para efectuar el análisis a ciego.

Para seleccionar la prueba adecuada para el análisis estadístico de la frecuencia de ICH los resultados se sometieron al "decision tree method" desarrollado por Gad y Weil para ser utilizado en estadística para toxicólogos (Gad y Weil, 1982), efectuado en un programa de computadora Hewlett-Packard 86B.

En primer lugar se efectuó una prueba de homogeneidad de variancias entre dos grupos (la prueba F). El valor de F no fue significativo lo cual indica variancias homogéneas y una distribución normal en los datos, en consecuencia, la prueba t de Student ( $N_1 + N_2 - 2$ ) es el procedimiento apropiado a aplicar (Gad y Weil, 1982).

R E S U L T A D O S

ESTUDIOS DE UNION COVALENTE DEL  $^{14}\text{C}$ -BZ A MACROMOLECULAS CELULARES.Interacción de metabolitos reactivos del  $^{14}\text{C}$ -BZ con el ADN "in vivo"

No se detectaron interacciones con el ADN de hígado de rata o ratón en las condiciones de trabajo empleadas, en una única administración de los fármacos en las dosis y tiempo de administración indicados.

Activación microsomal e interacción de metabolitos reactivos del  $^{14}\text{C}$ -BZ con proteínas microsomales y ADN incorporado a las mezclas de incubación.

Las incubaciones efectuadas "in vitro" en un medio de suspensiones microsomales de hígado de rata, en anaerobiosis y en presencia de Benznidazol demostraron que la activación microsomal del fármaco tiene lugar en las condiciones usadas, y que los metabolitos reactivos, productos de la activación, se unen covalentemente a las proteínas microsomales y al ADN incorporado al sistema (tabla 1). Los resultados difieren si la incubación es efectuada en presencia o no de sistema generador de NADPH. Esa respuesta diferente al agregado de NADPH depende de las concentraciones de BZ en el medio. Cuando la concentración es de 0,2 mM la unión covalente es mayor en presencia de NADPH, tanto para el caso de las proteínas microsomales cuanto para el ADN. En concentraciones 10 veces menores de BZ los resultados obtenidos son diferentes. Al utilizar 0,02 mM de BZ la unión covalente es menor en presencia de NADPH (tabla 1). Además, sin NADPH el ADN es sustrato de preferencia respecto de las proteínas.

CONDICION EXPERIMENTAL *	Unión covalente del $^{14}\text{C}$ -BZ a proteínas microsomales		Unión covalente del $^{14}\text{C}$ -BZ al ADN	
	$^{14}\text{C}$ -BZ/ dpm mg de proteínas	p moles BZ/ mg de proteínas	$^{14}\text{C}$ -BZ/ dpm mg de ADN	p moles BZ/ mg de ADN
BZ 0,2 mM				
- NADPH	2845,64	84,80	5441,27	162,15
+ NADPH	7343,96	218,85	6973,82	207,82
BZ 0,02 mM				
- NADPH	8456,71	252,01	12812,42	381,81
+ NADPH	3817,45	113,76	3361,07	100,16

Tabla 1. Activación microsomal del  $^{14}\text{C}$ -BZ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente a proteínas microsomales y al ADN.

\* El medio de incubación contiene microsomas de hígado de rata y ADN de timo bovino (Sigma Chemical Co.). Las incubaciones fueron realizadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 60' bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ , en presencia o no de sistema generador de NADPH, según se indica. Cada valor es el promedio de los resultados de 3 frascos de incubación y 2 determinaciones de cada uno de ellos. Los valores tienen restados el blanco de luminiscencia de proteínas microsomales o ADN con el líquido de centelleo usado en las lecturas.

La tabla 2 indica la dependencia de esta activación de la presencia o ausencia de oxígeno, en concentraciones de 0,02 mM de BZ.

La activación e interacción covalente de metabolitos con el ADN es máxima en anaerobiosis y en ausencia de NADPH.

Al emplear suspensiones de microsomas precalentados durante 5 min. a 100°C, la habilidad de activar el BZ se destruye y la unión covalente es casi nula (tabla 2).

La activación del BZ en ausencia de NADPH y sin N<sub>2</sub> es baja respecto de la registrada en anaerobiosis, pero no despreciable (tabla 2).

Cuando se utilizaron en los medios de incubación microsomas de ratas preinducidas con fenobarbital sódico, la unión covalente al ADN también fue superior en ausencia de NADPH pero no significativamente mayor que la registrada para microsomas no preinducidos (tabla 5).

#### Efectos del FAD y Metil Viológeno en la activación microsomal del <sup>14</sup>C-BZ.

El agregado de FAD en las mezclas de incubación aumentó significativamente la activación microsomal del BZ (tabla 4). El metil viológeno no causó este efecto (tabla 4).

#### Activación nuclear e interacción de metabolitos reactivos del <sup>14</sup>C-BZ con proteínas y ADN nucleares.

Los núcleos purificados de hígado de rata activaron anaeróticamente el BZ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente con proteínas nucleares. El proceso es casi nulo en atmósfera con oxígeno o cuando el NADPH no está presente en el sistema (tabla 5). Al emplear núcleos precalentados durante 5 min. a 100°C, la habilidad de activar el BZ se destruye y la interacción es nula (tabla 5)

CONDICION EXPERIMENTAL *	Unión covalente del $^{14}\text{C}$ -BZ al ADN	
	dpm $^{14}\text{C}$ -BZ/ mg de ADN	p moles BZ/ mg de ADN
- NADPH (aire)	1650,0	49,17
- NADPH ( $\text{N}_2$ )	3542,40	105,56
+ NADPH (aire)	905,8	26,30
+ NADPH ( $\text{N}_2$ )	458,00	13,65
Control: -NADPH( $\text{N}_2$ ) + microsomas pre- calentados durante 5' a 100° C	287,10	8,55

Tabla 2. Activación microsomal del  $^{14}\text{C}$ -BZ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente al ADN.

\* El medio de incubación contiene microsomas de hígado de rata, ADN de timo bovino (Sigma Chemical Co.) y BZ 0,02 mM. Las incubaciones fueron realizadas a 37°C durante 60' bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  o aire, en presencia o no de sistema generador de NADPH, según se indica. Cada valor es el promedio de los resultados de 5 frascos de incubación. Los valores tienen restados el blanco de luminiscencia del ADN con el líquido de centelleo usado en las lecturas.

CONDICION EXPERIMENTAL *		Unión covalente del $^{14}\text{C}$ -BZ al ADN	
		dpm $^{14}\text{C}$ -BZ/ mg de ADN	p moles BZ/ mg de ADN
Microsomas de ratas no indu- cidas	- NADPH	3534,50	105,33
	+ NADPH	458,40	13,66
Microsomas de ratas preinduci- das con Fenobar- bital	- NADPH	4225,60	125,92
	+ NADPH	364,40	10,90

Tabla 3. Activación microsomal del  $^{14}\text{C}$ -BZ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente al ADN.

\* El medio de incubación contiene microsomas de hígado de rata, de animales preinducidos con fenobarbital sódico, 3 dosis diarias de 80 mg/kg, i.p., ADN de timo bovino (Sigma Chemical Co.) y  $^{14}\text{C}$ -BZ 0,02 mM. Las incubaciones fueron realizadas a 37°C durante 60' bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ , en presencia o no de sistema generador de NADPH, según se indica. Cada valor es el promedio de 2 determinaciones de cada frasco de incubación. Los valores tienen restados el blanco de luminiscencia del ADN con el líquido de centelleo usado en las lecturas.



CONDICION EXPERIMENTAL *	Unión covalente del $^{14}\text{C}$ -BZ al ADN	
	dpm $^{14}\text{C}$ -BZ/ mg de ADN	p moles BZ/ mg de ADN
+ NADPH	226,20	6,75
+ NADPH + FAD	426,40	12,70
+ NADPH + Metil viológeno	127,70	3,80

Tabla 4. Activación microsomal del  $^{14}\text{C}$ -BZ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente al ADN.

\* El medio de incubación contiene microsomas de hígado de rata, ADN de timo bovino (Sigma Chemical Co.), FAD (2mM) o Metil viológeno (1mM) y  $^{14}\text{C}$ -BZ 0,02 mM. Las incubaciones fueron realizadas a 37°C durante 60' bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  y sistema generador de NADPH. Cada valor es el promedio de 2 determinaciones de cada frasco de incubación. Los valores tienen restados el blanco de luminiscencia del ADN con el líquido de centelleo usado en las lecturas.

CONDICION EXPERIMENTAL *	Unión covalente del $^{14}\text{C}$ -BZ a pro teínas nucleares	
	dpm $^{14}\text{C}$ -BZ/ mg de proteína	p moles BZ/ mg de proteína
- NADPH (aire)	180,15	5,39
- NADPH ( $\text{N}_2$ )	80,25	2,39
+ NADPH (aire)	222,15	6,64
+ NADPH ( $\text{N}_2$ )	1131,55	33,84
Control: +NADPH( $\text{N}_2$ ) + núcleos precalen tados durante 5' a 100°C	91,58	2,74

Tabla 5. Activación nuclear del  $^{14}\text{C}$ -BZ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente a proteínas nucleares.

\* El medio de incubación contiene núcleos purificados de hígado de rata y  $^{14}\text{C}$ -BZ 0,02 mM. Las incubaciones fueron realizadas a 37°C durante 60' bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  o aire, en presencia o no de sistema generador de NADPH, según se indica. Cada valor es el promedio de los resultados de 2 frascos de incubación y 2 determinaciones de cada uno de ellos. Los valores tienen restados el blanco de luminiscencia de proteínas nucleares con el líquido de centelleo usado en las lecturas.

Los intermediarios reactivos formados "in vitro" en suspensiones de núcleos purificados de hígado de rata son además suficientes y capaces de interactuar covalentemente con el ADN de los núcleos (tabla 6).

La unión covalente con el ADN nuclear es máxima en anaerobiosis y en presencia de NADPH, y los valores de radiactividad del  $^{14}\text{C}$ -BZ unida al ADN nuclear son del mismo orden de los observados para proteínas nucleares (tabla 6).

Fracciones de proteínas nucleares involucradas en la unión covalente con metabolitos reactivos del  $^{14}\text{C}$ -BZ.

La mayor parte de los metabolitos reactivos del  $^{14}\text{C}$ -BZ formados durante la activación nuclear anaeróbica, en presencia de NADPH, interactúan con la fracción de proteínas ácidas ligadas al ADN, fracción IV (tabla 7).

También se registra una cantidad importante de marca en la fracción I correspondiente a las proteínas solubles del núcleo. Además están involucradas en la interacción, en menor grado y en orden decreciente, las fracciones V, residual, III y II del procedimiento para fraccionamiento de proteínas nucleares de Steele y Busch (figura 9). La interacción con histonas es casi nula (figura 9).

CONDICION EXPERIMENTAL *	Unión covalente del $^{14}\text{C}$ -BZ a proteínas nucleares		Unión covalente del $^{14}\text{C}$ -BZ al ADN nuclear	
	dpm $^{14}\text{C}$ -BZ/ mg de proteína	p moles BZ/ mg de proteína	dpm $^{14}\text{C}$ -BZ/ mg de ADN	p moles BZ/ mg de ADN
- NADPH	95,89	2,87	88,55	2,65
+ NADPH	662,79	19,82	569,50	17,03

Tabla 6. Activación nuclear del  $^{14}\text{C}$ -BZ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente a proteínas y ADN nucleares.

\* El medio de incubación contiene núcleos purificados de hígado de rata y  $^{14}\text{C}$ -BZ 0,02 mM. Las incubaciones fueron realizadas a 37°C durante 60' bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  en presencia o no de sistema generador de NADPH, según se indica. Cada valor es el promedio de 2 frascos de incubación y 2 determinaciones de cada uno de ellos. Los valores tienen restados el blanco de luminiscencia de proteínas nucleares o ADN nuclear con el líquido de centelleo correspondiente usado en las lecturas.

Fracciones de proteínas nucleares	dpm $^{14}\text{C}$ -BZ/ mg de proteína
I, proteínas nucleares solubles	1036,9
II, proteínas nucleares solubles	155,5
III, proteínas básicas ligadas al ADN	185,1
IV, proteínas ácidas ligadas al ADN	2588,3
V, proteínas ácidas no ligadas al ADN	293,3
Histonas	10,2
Proteínas residuales	230,9

Tabla 7. Activación nuclear del  $^{14}\text{C}$ -BZ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente a diferentes fracciones de proteínas nucleares.

El medio de incubación contiene núcleos purificados de hígado de rata y  $^{14}\text{C}$ -BZ 0,02 m M. Las incubaciones fueron realizadas a 37°C durante 60' bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  y en presencia de sistema generador de NADPH. Los valores tienen restados el blanco de luminiscencia de cada fracción de proteína con el líquido de centelleo usado.

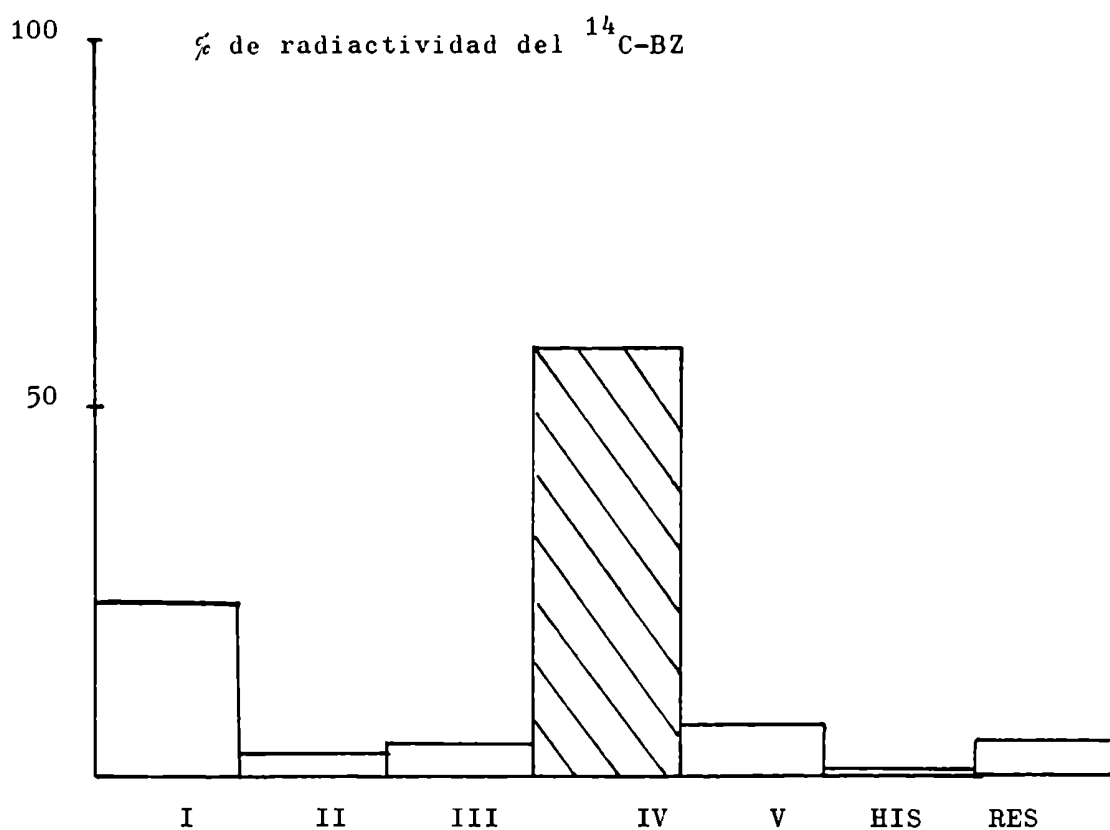


Figura 9. Fracciones de proteínas nucleares de hígado de rata con % de radiactividad del  $^{14}\text{C}$ -BZ unida covalentemente.

Fracciones: I y II, proteínas nucleares solubles.

III, desoxyribonucleoproteínas -1 (proteínas básicas ligadas al ADN)

IV, desoxyribonucleoproteínas -2 (proteínas ácidas ligadas al ADN)

V, ribonucleoproteínas (proteínas ácidas no ligadas al ADN)

HIS: histonas

RES: proteínas residuales.

ENSAYO DEL MICRONUCLEO

La frecuencia de micronúcleos observada en médula ósea de ratones tratados con Nifurtimox y Benznidazol se presenta en las tablas 8 y 9.

El NFX administrado a ratones por vía oral (p.o.), en dosis comprendidas entre 600 y 2.000 mg/kg, indujo un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) en la formación de micronúcleos (tabla 8).

Los valores estadísticamente significativos están marcados en la tabla, con dos asteriscos.

En las fotos 1 y 2 se muestra respectivamente una sección de extendido de médula ósea y el detalle de un eritroblasto policromático micronucleado.

Las fotos 3, 4 y 5 ilustran la presencia de micronúcleos en eritrocitos inmaduros de médula ósea de ratones tratados con NFX en dosis de 2.000 mg/kg p.o.

No se observaron aumentos significativos en la formación de micronúcleos en los tratamientos i.p. de NFX (tabla 8).

En segundo término, el BZ no produjo aumentos significativos en la formación de micronúcleos en médula ósea de ratones tratados con dosis de hasta 2.000 mg/kg. Para el BZ no se observó diferencia en los resultados a efectos de tratamientos p.o. ó i.p. (tabla 9).

La morfología de los micronúcleos a lo largo de todo el recuento fue semejante y aún a la mayor dosis usada los eritroblastos policromáticos contenían como regla general sólo un micronúcleo. El número de eritroblastos ortocromáticos micronucleados en el campo que contiene los 1.000 eritroblastos policromáticos no superó el número de 3,5, eliminando la posible presencia de artefactos.

	Tratamiento * p.o.				Tratamiento*i.p.	
	Control	600 mg/kg	1200 mg/kg	2000 mg/kg	Control	1200 mg/kg
o/oo de eritroblastos policromáticos micronucleados $\bar{X}$ (min/max)	3,5 (2/5)	6,9** (4/12)	7,2 ** (3/11)	7,2 ** (3/10)	1,6 (1/3)	1,6 (1/3)
Número de eritroblastos policromáticos analizados/número de ratones.	9000/9	5000/5	5000/5	6000/6	3000/3	5000/5

Tabla 8. Incidencia de micronúcleos en eritroblastos policromáticos de médula ósea de ratones tratados con Nifurtimox.

\* El tratamiento consistió en dos administraciones de NFX, con 24 hs. de separación, la última 6 hs antes del sacrificio del animal.

\*\*  $P < 0,01$



	Tratamiento * p.o.			Tratamiento* i.p.	
	Control	850 mg/kg	2000 mg/kg	Control	2000 mg/kg
°/oo de eritroblastos policromáticos micro-nucleados $\bar{X}$ (min/máx)	1,8 (1/3)	2,8 (2/4)	3,6 (1/6)	2,5 (2/3)	3,6 (1/6)
Número de eritroblastos policromáticos analizados/número de ratones	5000/5	5000/5	5000/5	2000/2	5000/5

Tabla 9. Incidencia de micronúcleos en eritroblastos policromáticos de médula ósea de ratones tratados con Benznidazol.

\* El tratamiento consistió en dos administraciones de BZ, con 24 hs. de separación, la última 6 hs antes del sacrificio del animal. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos y las dosis empleadas.

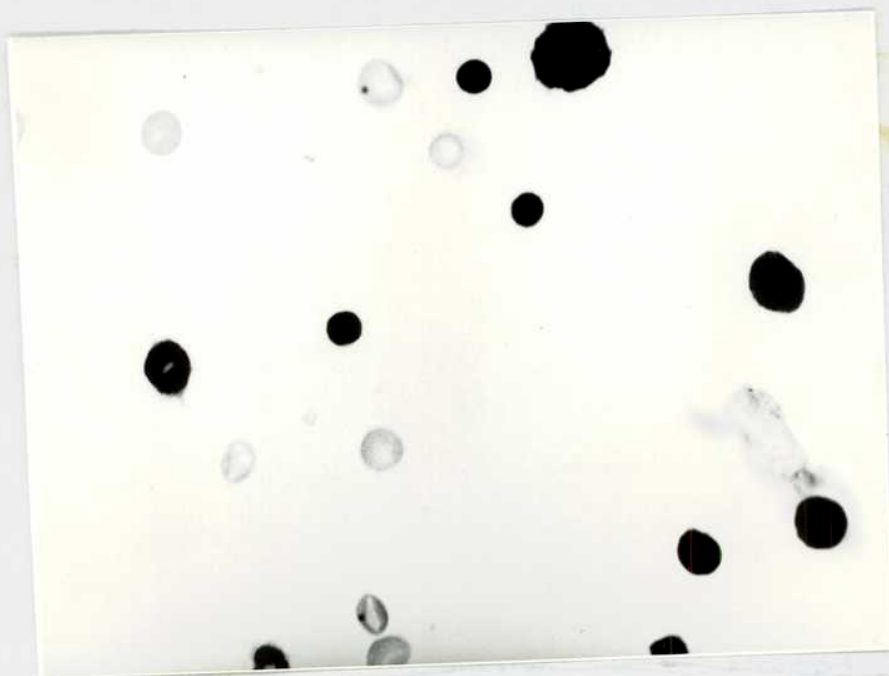


Foto 1.



Foto 2.

Fotos 1 y 2. Ensayo del micronúcleo en médula ósea de ratón.

Foto 1. Extendido de médula ósea de ratón tratado con Nifurtimox 600 mg/kg (p.o.). Aumento total: 780X.

Foto 2. Detalle de la fotografía anterior. Aumento total: 1200X.



Foto 3.

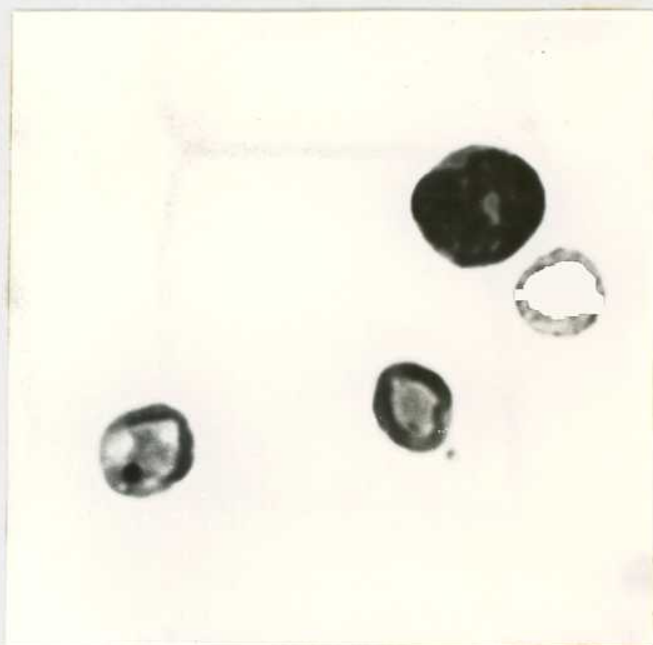


Foto 4.

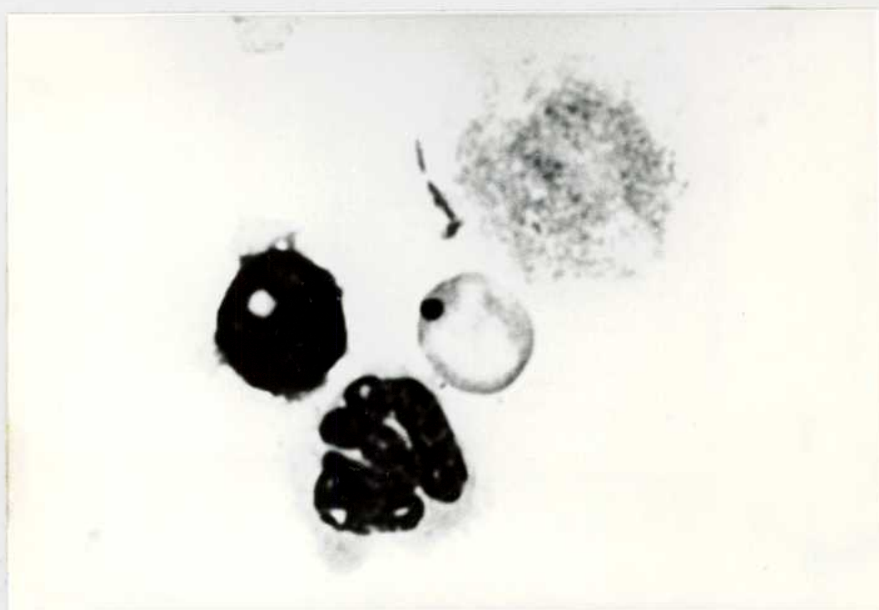


Foto 5.

Fotos 3, 4 y 5. Ensayo del micronúcleo en médula ósea de ratón.

Micronúcleos en eritroblastos policromáticos de médula ósea de ratones tratados con Nifurtimox 2000 mg/kg (p.o.). Aumento total: 1950X.

Metabolismo reductivo del Benznidazol y Nifurtimox en médula ósea de ratón.

Las suspensiones de médula ósea de ratón en incubaciones "in vitro" a 37°C en presencia del NFX o BZ exhibieron capacidad para nitroreducir a ambos fármacos (tabla 10).

Esta actividad nitro-reductiva, bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y en presencia de NADPH fue notoriamente mayor para el caso del Nifurtimox.

Actividad nitro-reductiva (n moles BZ o NFX.min <sup>-1</sup> .(mg prot) <sup>-1</sup>		
	NIFURTIMOX	BENZNIDAZOL
Condición experimental *		
+ NADPH (N <sub>2</sub> )	0,202 ± 0,052	0,075 ± 0,017

Tabla 10. Actividad nitro-reductiva del Nifurtimox y Benznidazol en médula ósea de ratón.

\* El medio de incubación contiene suspensiones de médula ósea de ratón y NFX (0,2 m M) ó BZ (0,2 m M). Las incubaciones fueron realizadas a 37°C durante 60' bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Cada valor es el promedio de 3 determinaciones.

## ENSAYO DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS

Las frecuencias observadas de ICH en linfocitos de bazo cultivado "in vitro", de ratones tratados "in vivo" con los antichagásicos NFX o BZ, se presentan en las tablas 11 y 12.

El NFX (tabla 11) administrado por vía oral (p.o.) a ratones, en una única dosis de 2.000 mg/kg (NFX) indujo un aumento de la incidencia de ICH en las metafases de la 2da. división mitótica ( $M_2$ ) de células de bazo cultivadas en presencia de BrdU.

Las fotos 6, 7 y 8 ilustran respectivamente metafases en la 1ra., 2da. y 3ra. división mitótica ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ) luego de una tinción diferencial de las cromátidas cromosómicas con el colorante Hoechst 33258 más Giemsa. En las  $M_2$  se efectúan los recuentos de ICH. La foto 9 ilustra una  $M_2$  proveniente de animales controles, sin tratamiento. La foto 10 es una  $M_2$  de células de animales con tratamiento de NFX 2.000 mg/kg.

Los resultados estadísticamente significativos obtenidos con este tratamiento están marcados en la tabla 11 con dos asteriscos ( $p < 0,01$ ). Estos valores son de  $7,67 \pm 1,41$  ICH/célula para los animales tratados con una dispersión promedio entre 3,2 a 15,4.

A diferencia de los controles que mostraron un promedio de  $4,33 \pm 1,32$  ICH/célula con una dispersión promedio entre 0,6 a 9,4.

Bajo la estimación de una amplia distribución y dispersión de los valores de ICH en los materiales biológicos se analizaron un promedio de 30 metafases por animal y no menos de 5 animales por tratamiento.

Las figuras 10, 11, 12 y 13 muestran la distribución intra-individual de los datos en la mayoría de los ratones controles (Cn) y las figuras 14, 15, 16 y 17 ilustran cómo es esta distribución en animales tratados

	Tratamiento (p.o.) NFX mg/kg	ICH/célula $\bar{X} \pm S$	min-max	Nºde células	Nºde / ICH / Nºde cromosomas	Nºde ICH por cromosoma
C <sub>1</sub>	0	4,3 <sub>+</sub> 1,6	2 - 8	27	116/ 1080	0,107
C <sub>2</sub>	0	5,7 <sub>+</sub> 2,6	1 -12	36	205/ 1440	0,142
C <sub>3</sub>	0	5,6 <sub>+</sub> 2,9	0 -13	30	167/ 1200	0,139
C <sub>4</sub>	0	2,7 <sub>+</sub> 1,1	0 - 5	30	80/ 1200	0,067
C <sub>5</sub>	0	3,4 <sub>+</sub> 2,2	0 - 9	28	96/ 1120	0,086
		4,3 <sub>+</sub> 1,3	0,6-9,4			$\bar{X}$ : 0,1082
N <sub>1</sub>	1200	6,6 <sub>+</sub> 3,8	2 -16	36	238/ 1440	0,165
N <sub>2</sub>	1200	7,5 <sub>+</sub> 2,0	3 -10	13	97/ 520	0,186
N <sub>3</sub>	1200	4,2 <sub>+</sub> 2,0	1 - 8	30	127/ 1200	0,106
N <sub>4</sub>	1200	6,6 <sub>+</sub> 2,8	3 -13	37	245/ 1480	0,165
N <sub>5</sub>	1200	6,0 <sub>+</sub> 2,9	1 -13	38	230/ 1520	0,151
N <sub>6</sub>	1200	4,9 <sub>+</sub> 2,3	1 - 9	30	146/ 1200	0,122
		5,9 <sub>+</sub> 1,2	1,8-11,5			$\bar{X}$ : 0,149
NF <sub>1</sub>	2000	6,4 <sub>+</sub> 2,2	1 -13	57	365/ 2280	0,160
NF <sub>2</sub>	2000	7,0 <sub>+</sub> 2,6	3 -16	30	209/ 1200	0,174
NF <sub>3</sub>	2000	9,8 <sub>+</sub> 3,0	5 -15	17	166/ 680	0,244
NF <sub>4</sub>	2000	6,5 <sub>+</sub> 2,7	3 -15	31	202/ 1240	0,163
NF <sub>5</sub>	2000	8,2 <sub>+</sub> 3,3	4 - 18	17	139/ 680	0,204
		7,7 <sub>+</sub> <sup>***</sup> 1,4	3,2-15,4			$\bar{X}$ : 0,189 <sup>***</sup>

**Tabla 11: Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos de bazo de ratones tratados con Nifurtimox**

\*\* p < 0,01.

	Tratamiento (p.o.) BZ mg/kg	ICH/ célula $\bar{X} \pm S$	min - max	Nºde células	Nºde ICH / Nºde cromosomas	Nºde ICH por cromosoma
C <sub>1</sub>	0	4,3 $\pm$ 1,6	2 - 8	27	116/ 1080	0,107
C <sub>2</sub>	0	5,6 $\pm$ 2,6	1 -12	36	205/ 1440	0,142
C <sub>3</sub>	0	5,5 $\pm$ 2,9	0 -13	30	167/ 1200	0,139
C <sub>4</sub>	0	2,6 $\pm$ 1,1	0 - 5	30	80/ 1200	0,067
C <sub>5</sub>	0	3,4 $\pm$ 2,2	0 - 9	28	96/ 1120	0,086
		4,3 $\pm$ 1,3	0,6-9,4			$\bar{X}$ :0,1082
BZ <sub>1</sub>	2000	7,0 $\pm$ 3,7	2 - 8	33	233/ 1320	0,176
BZ <sub>2</sub>	2000	6,3 $\pm$ 2,9	1 -15	61	386/ 2440	0,158
BZ <sub>3</sub>	2000	9,5 $\pm$ 3,5	4 -18	14	133/ 560	0,237
BZ <sub>4</sub>	2000	6,9 $\pm$ 2,3	3 -10	12	83/ 480	0,173
BZ <sub>5</sub>	2000	5,6 $\pm$ 2,3	1 -11	40	227/ 1600	0,142
BZ <sub>6</sub>	2000	4,1 $\pm$ 1,9	1 -10	30	124/ 1200	0,103
BZ <sub>7</sub>	2000	4,1 $\pm$ 2,0	1 -10	30	124/ 1200	0,103
BZ <sub>8</sub>	2000	4,7 $\pm$ 2,0	1 -11	30	142/ 1200	0,118
BZ <sub>9</sub>	2000	4,1 $\pm$ 2,3	1 -10	29	121/ 1160	0,104
		5,8 $\pm$ 1,6	1,7- 12,6			$\bar{X}$ :0,146

Tabla 12. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos de bazo de ratones tratados con Benznidazol.

No se observó diferencias significativas en el tratamiento con BZ.



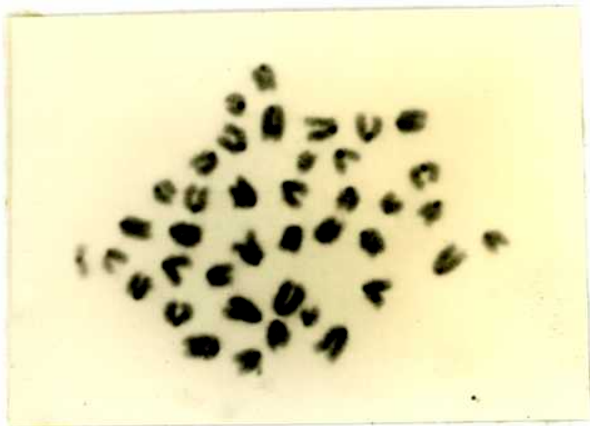


Foto 6.



Foto 7.



Foto 8.

Fotos 6, 7 y 8. Ensayo de intercambio de cromátidas hermanas.

Metafases de linfocitos de bazo de ratón cultivado "in vitro".  
Aumento total: 1200X.

Foto 6. Metafase de la primera división mitótica ( $M_1$ )

Foto 7. Metafase de la segunda división mitótica ( $M_2$ )

Foto 8. Metafase de la tercera división mitótica ( $M_3$ )

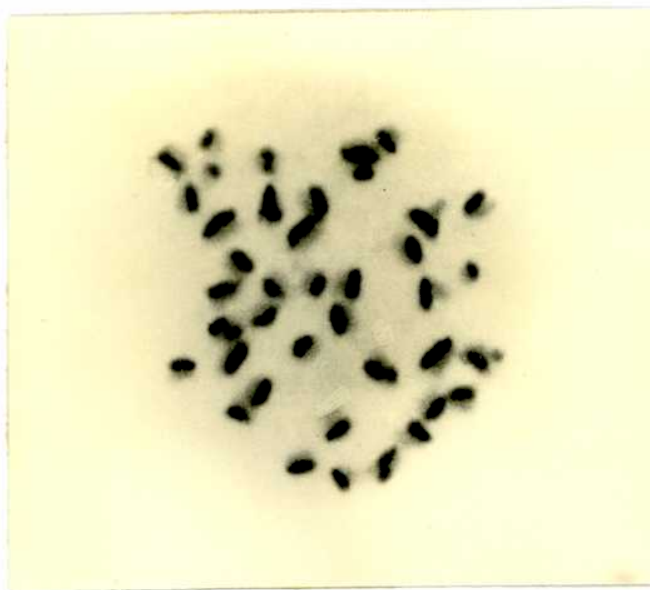


Foto 9.



Foto 10.

Fotos 9 y 10. Ensayo de intercambio de cromátidas hermanas.

Metafases de la segunda división mitótica ( $M_2$ ) de linfocitos de bazo de ratón cultivado "in vitro".

Foto 9. Célula de ratón control, sin tratamiento. Aumento total: 1200 X.

Foto 10. Célula de ratón tratado con Nifurtimox 2.000 mg/kg. Aumento total: 1500 X.

Figura 10.

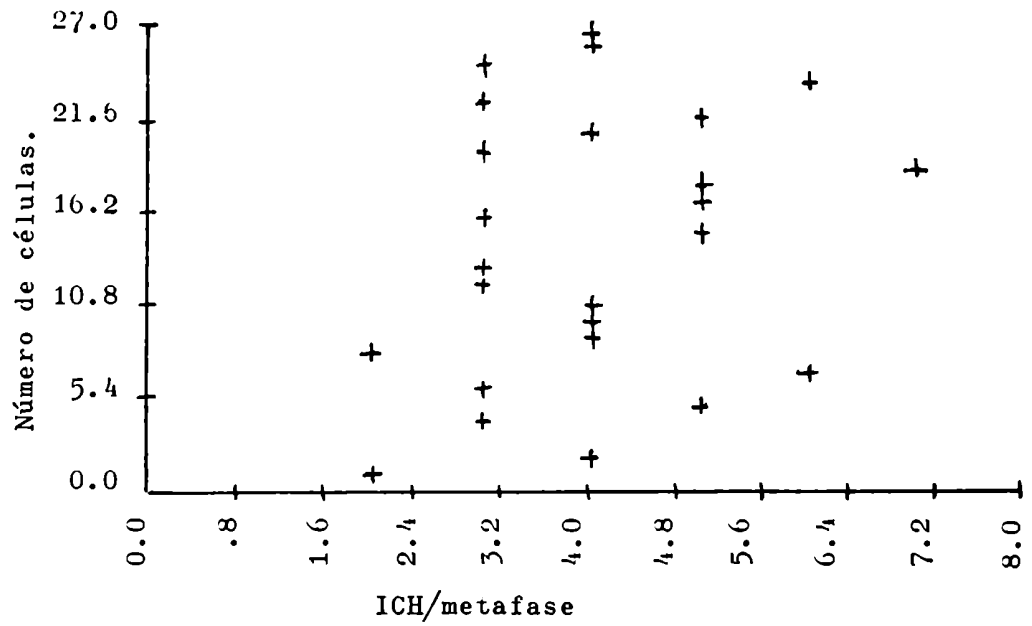
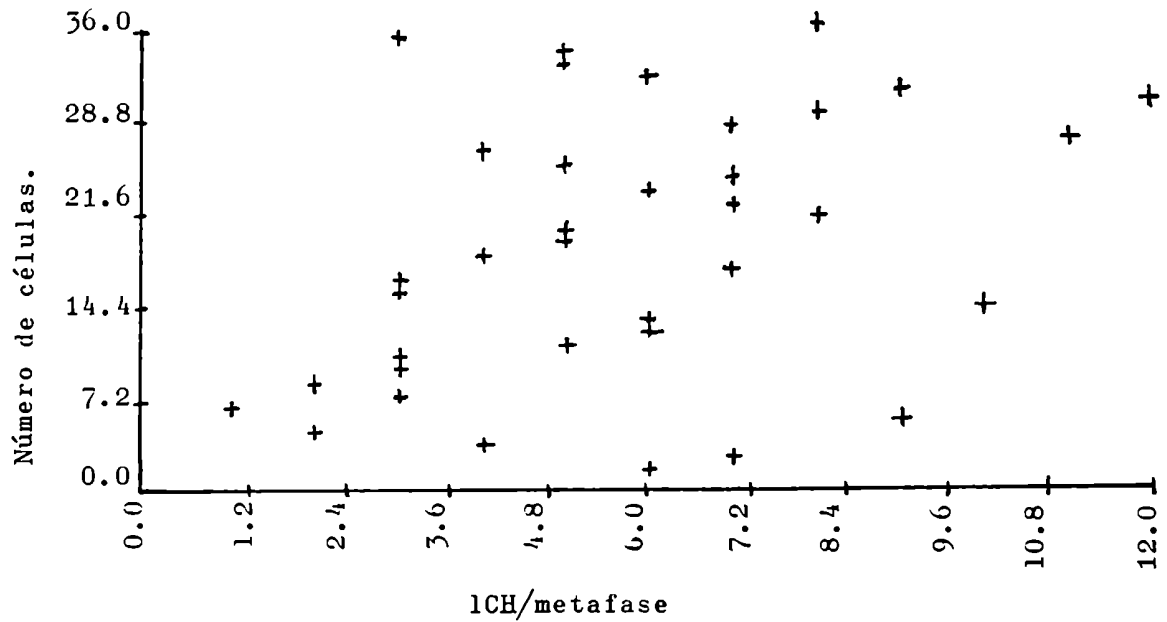
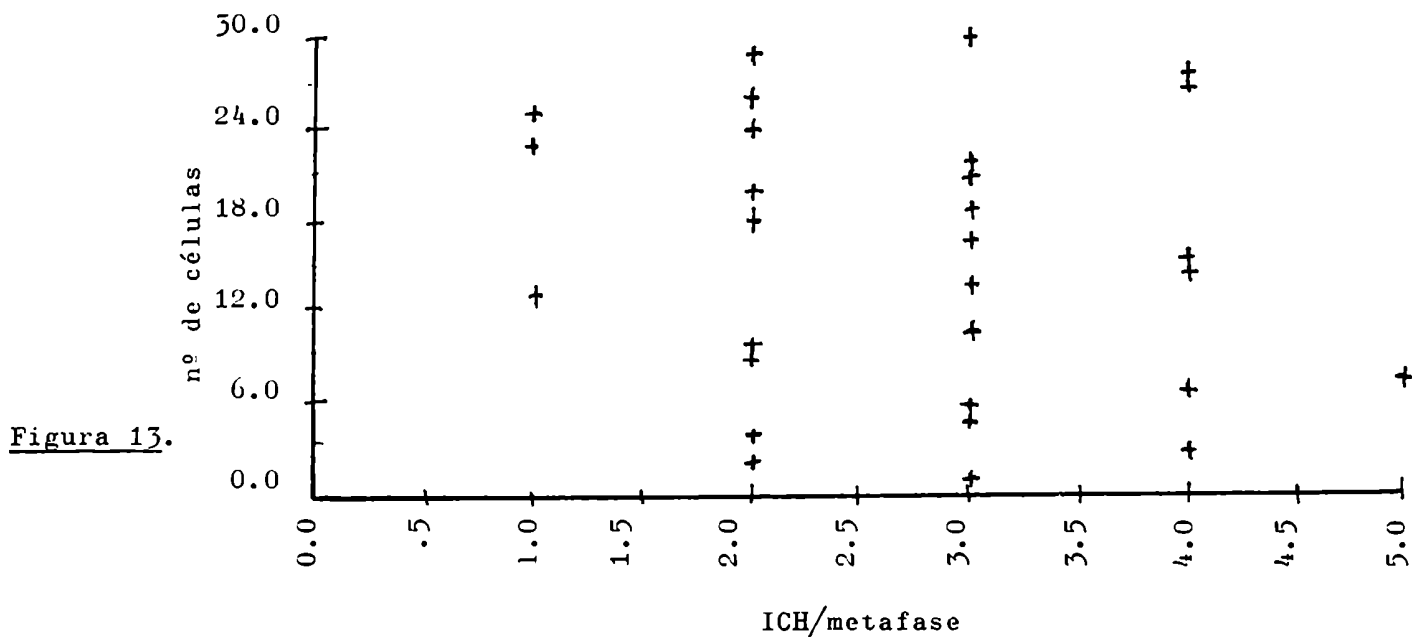
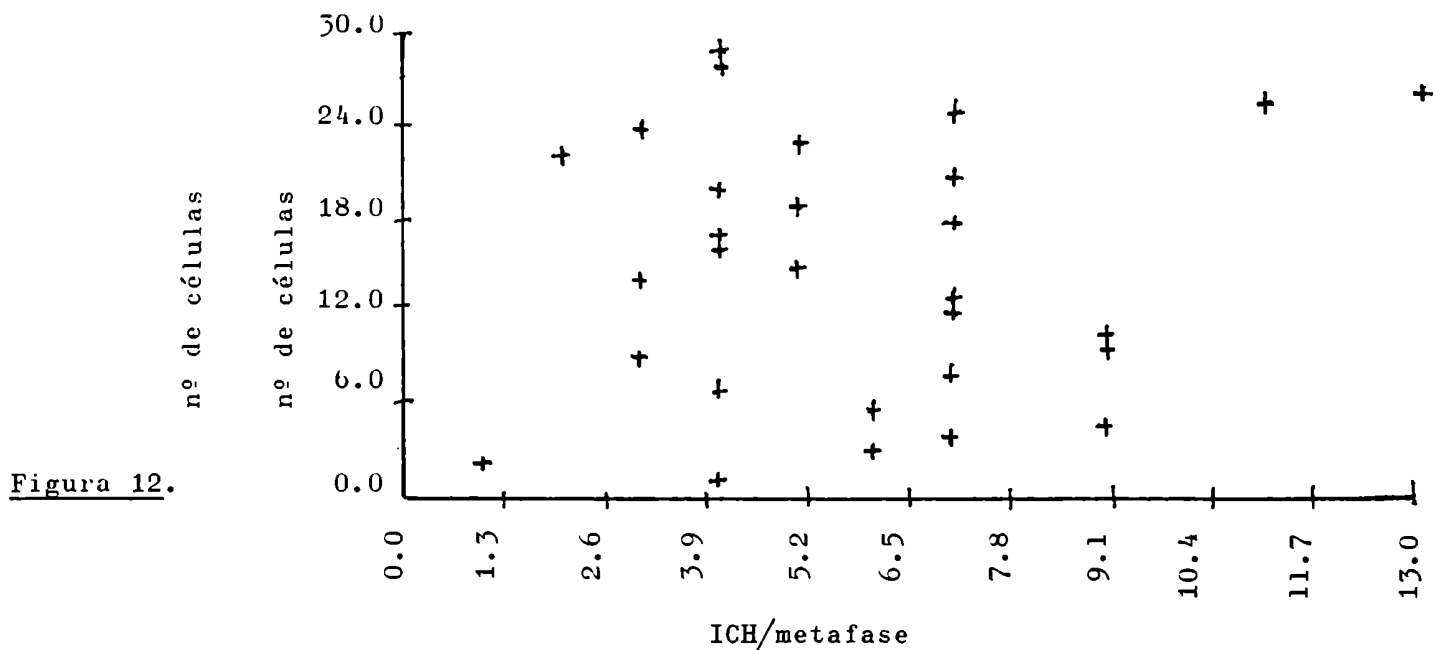


Figura 11.



Figuras 10 y 11. Distribución de la frecuencia de ICH/metafase en linfocitos de bazo de ratones controles.

Se ilustra la distribución en 27 células de  $C_1$  y 36 células de  $C_2$ .



Figuras 12 y 13. Distribución de la frecuencia de ICH/metafase en linfocitos de bazo de ratones controles.

Se ilustra la distribución en 30 células de  $C_5$  y 30 células de  $C_4$ .

Figura 14.

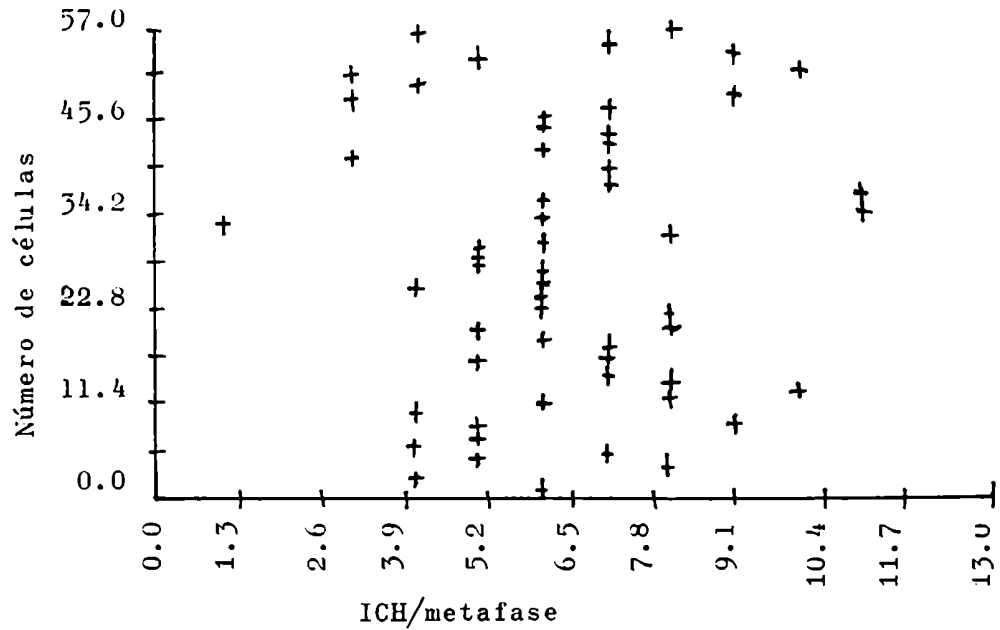
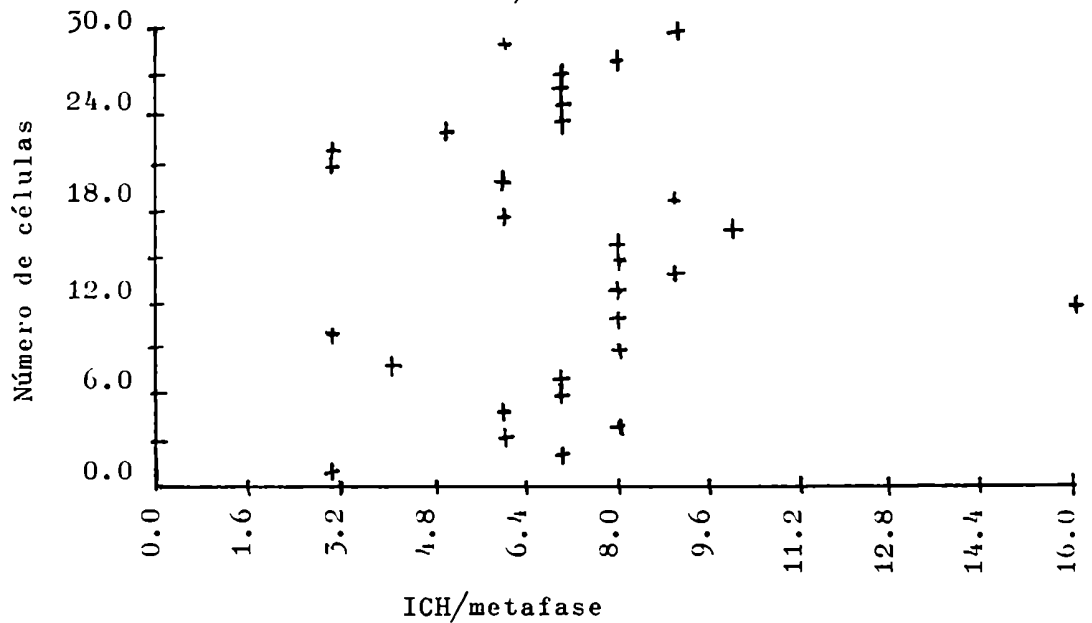


Figura 15.



Figuras 14 y 15. Distribución de la frecuencia de ICH/metafase en linfocitos de bazo de ratones tratados con Nifurtimox.

Se ilustra la distribución en 57 células de NF<sub>1</sub> y 50 células de NF<sub>2</sub>.

Figura 16.

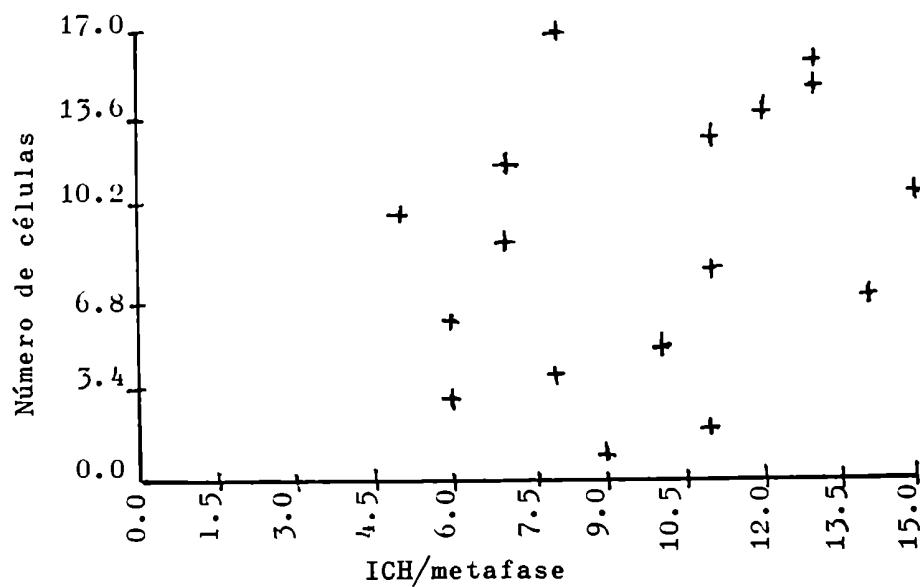
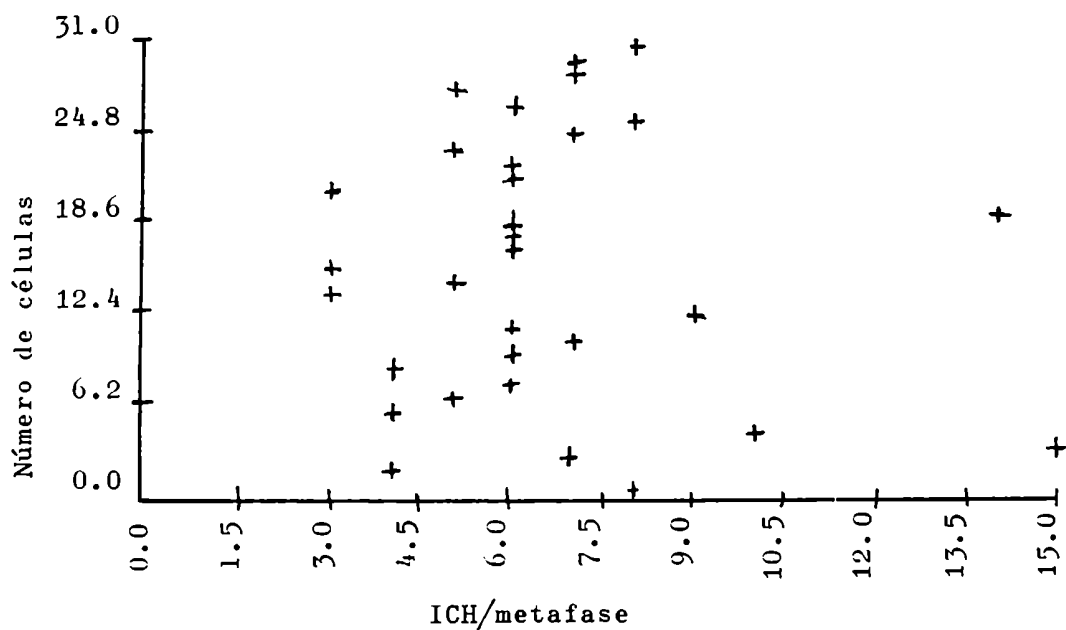


Figura 17.



Figuras 16 y 17. Distribución de la frecuencia de ICH/metafase en linfocitos de bazo de ratones tratados con Nifurtimox.

Se ilustra la distribución en 17 células de NF<sub>3</sub> y 31 células de NF<sub>4</sub>.

con NFX 2.000 mg/kg (NFn).

Como puede deducirse, de las tablas 11 y 12, se infiere la variación en la frecuencia de ICH entre individuos y de las figuras comprendidas entre la 10 a la 17, cómo es la dispersión de ICH dentro de un mismo individuo, mostrando la variación célula a célula.

La distribución de ICH/célula en la muestra de 5 animales controles administrados con carboximetilcelulosa 1% (p.o.) y de los 5 animales tratados con NFX 2.000 mg/kg (p.o.) está graficada en la figura 18. Los puntos más altos de las curvas indican que un 25,0% de las células analizadas de animales controles presentan 3 ICH/célula, le siguen en orden decreciente un 17,6% de células con 4 ICH, un 11,8% con 5 ICH y un 10,7% con 2 ICH/célula. Estos valores de incidencia resultan en el valor promedio de 4,33 ICH/célula para la población control, como ya se indicara. Por otro lado, las células analizadas de los animales tratados reflejan una mayoría de población celular con 6 ICH/célula con un porcentaje de incidencia de 17,7. Le siguen en orden decreciente un 16,1% con 8 ICH, un 14,6% con 7 ICH y un 11,1% con 5 ICH/célula. Estos valores resultan en el valor promedio de 7,67 ICH/célula para la población tratada con NFX 2.000 mg/kg.

En la administración oral del NFX en una única dosis de 1.200 mg/kg (Nn) el aumento en la frecuencia de ICH a  $5,97 \pm 1,21$  ICH/célula no fue estadísticamente significativo respecto de los controles ( $4,33 \pm 1,32$  ICH/célula) (tabla 11). Pero a través de los valores puede inferirse una marcada tendencia, como se indica en la curva dosis-respuesta de la figura 19.

El Benznidazol administrado oralmente (p.o.) a ratones en una única dosis de 2.000 mg/kg (BZn) no induce un aumento estadísticamente sig-

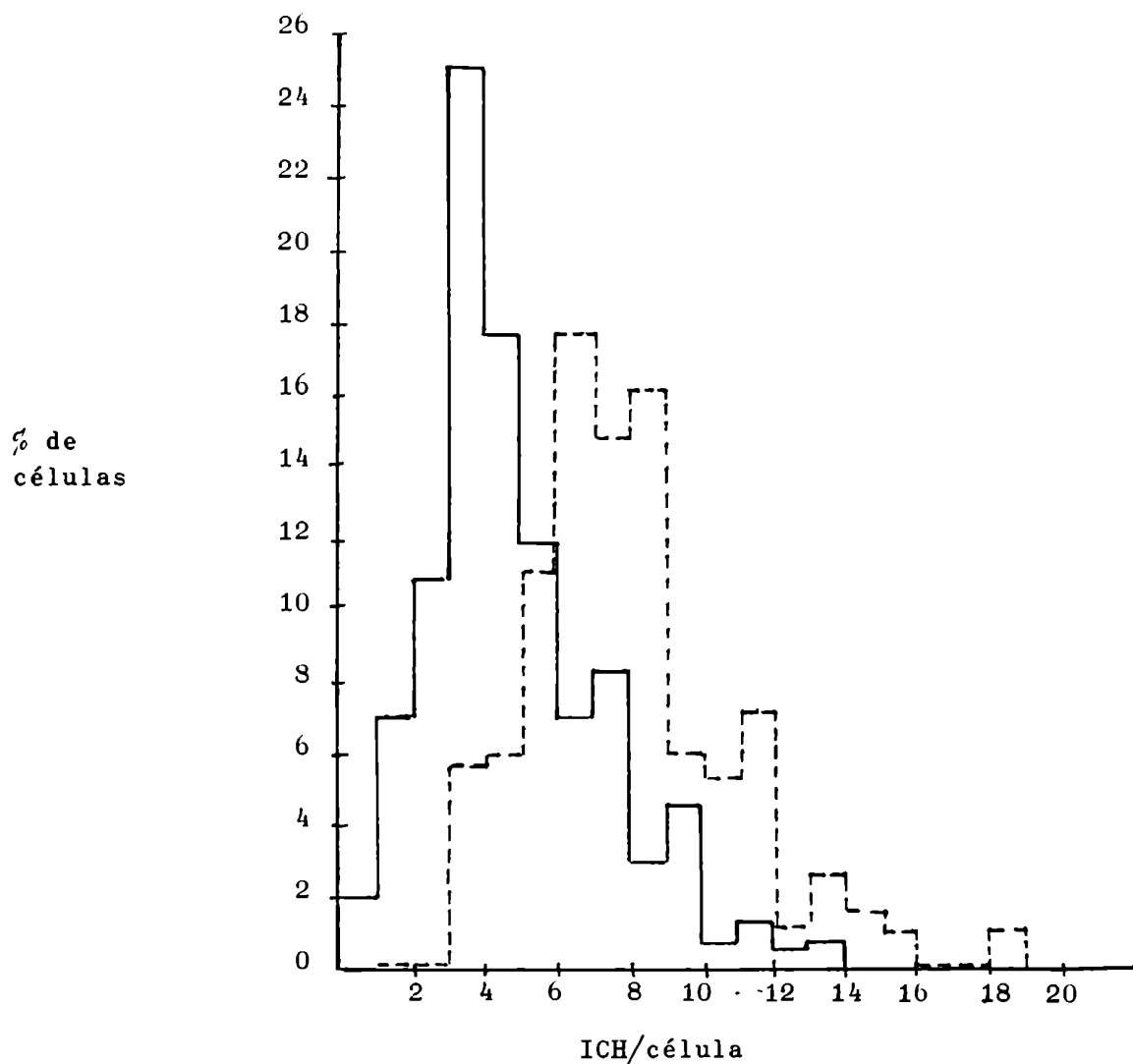


Figura 18. Distribución del % de células con diferentes frecuencias de ICH/célula, en ratones controles y tratados con Nifurtimox.

Se ilustra la distribución para 141 células completas de 5 animales controles (—) y 152 células completas de 5 animales tratados con NFX 2000 mg/kg (p.o.) (-----).



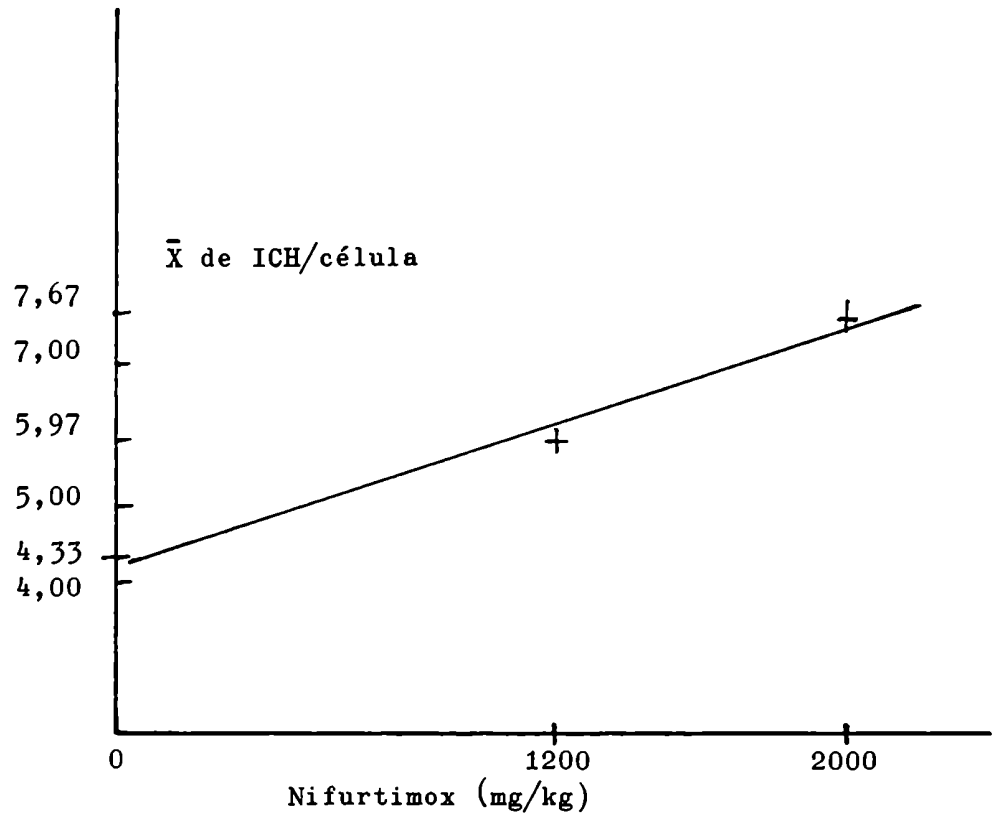


Figura 19. Curva dosis-respuesta de inducción de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos de bazo de ratones tratados con Nifurtimox.

nificativo del ICH/cél. en bazo de ratones tratados (tabla 12). En todos los casos los resultados están expresados como  $\bar{X}$  de ICH/célula  $\pm$  S (desviación estándar) y en número de ICH/cromosoma.

D I S C U S I O N Y C O N C L U S I O N E S .

El Nifurtimox y el Benznidazol son los dos fármacos que se emplean en la actualidad en la terapia de la enfermedad de Chagas, en nuestro país y en el resto de América Latina. Son, hasta el momento, los anti-chagásicos más efectivos de que se dispone (Van der Bossche, 1978; Barclay, 1977; Litter, 1980).

Desafortunadamente ambos presentan efectos colaterales tóxicos agudos, principalmente anorexia, gastralgia, excitación psíquica, vómitos, cefaleas, polineuropatías y reacciones cutáneas del tipo de toxicodermia medicamentosa (Boainain, 1979; Carpintero, 1983; Laplumé et al., 1982).

Experimentalmente se ha demostrado en ratas, para el caso del BZ, que éste o sus metabolitos pueden atravesar la barrera placentaria y llegar al feto (Toranzo et al., 1984).

Todo ésto es preocupante dado que la enfermedad de Chagas afecta a varios millones de personas (World Health Organization, 1981). En cuanto a sus potenciales efectos tóxicos crónicos, se ha informado de la mutagenicidad de ambos en sistemas bacterianos. Del NFX en tres cepas de Escherichia coli con distintos sistemas de reparación del ADN para lesiones con U.V., del BZ con inducción de actividad mutagénica en Klebsiella pneumoniae (Voogd et al., 1975) y de ambos en el ensayo de Salmonella/Ames (Nagel y Nepomnaschy, 1983). Spanó y col. evaluaron los efectos genotóxicos del NFX en la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en Drosophila melanogaster, aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratas Wistar y cambios en el índice mitótico de células de raíces de Allium cepa (Spanó y Takahashi, 1981).

Los estudios de los laboratorios Bayer reportaron para el NFX disminución del peso de los fetos sin llegar a malformaciones, en estudios de embriotoxicidad en ratas y ratones (Lorke, 1972) y falta de carcinogeni-

cidad en ratas (Steinhoff y Grundmann, 1972). No pudieron encontrarse en bibliografía estudios semejantes para el BZ. Como puede extraerse de expuesto es aún incompleta la información que se posee sobre la potencial toxicidad crónica de estos fármacos, particularmente la referida a efectos tóxicos que se manifiestan luego de un largo período de latencia como son los efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos. Ambos son nitroheterociclos y existe una preocupación creciente respecto de la mutagenicidad y carcinogenicidad de estos compuestos (Van der Boosche, 1978; Gutteridge, 1976).

Ante este panorama y considerando la importancia de los procesos que involucran alteraciones a nivel de material genético y potencialmente del patrimonio hereditario de una población expuesta es que se llevó a cabo la evaluación genotóxica efectuada en este trabajo de tesis. Se escogieron ensayos experimentales de corto plazo para la detección de mutágenos y carcinógenos, utilizando diferentes sistemas biológicos, estudios "in vitro" e "in vivo".

Se efectuaron en primer término ensayos de unión covalente del fármaco con macromoléculas celulares. Estos estudios requieren disponer del compuesto marcado radiactivamente. Sólo pudieron ser efectuados con el BZ, donado por Hoffman-La Roche, por cuanto no se tuvo a disposición el NFX radiactivo para poder efectuar estudios similares.

La evaluación genotóxica del BZ mediante estos ensayos, como una medida indirecta de formación de metabolitos químicamente reactivos, comprendió principalmente estudios "in vitro". Se determinó la capacidad de microsomas y de núcleos de hígado de rata de activar el BZ a formas susceptibles de reaccionar con el ADN y proteínas. A tal fin se incubaron en primer término, suspensiones de microsomas en presencia de <sup>14</sup>C-BZ y ADN de timo bovino, altamente polimerizado, agregado al

sistema, determinándose la radiactividad unida a proteínas y ADN. Se emplearon diferentes concentraciones de BZ y distintas condiciones de incubación para conocer posibles mecanismos de metabolización del compuesto. Los resultados indican una diferencia de comportamiento según las concentraciones usadas de BZ. Se utilizaron concentraciones de 0,2 mM de BZ en el medio de incubación, similares a las empleadas por Masana et al. en estudios de metabolismo reductivo "in vitro" y activación del BZ (Masana et al., 1984 a) y también concentraciones menores, de 0,02 mM del orden de las que potencialmente pueden alcanzarse "in vivo", asumiendo una distribución uniforme del fármaco en todo el organismo. La concentración en suero del NFX, luego de una dosis oral única de 15 mg/kg al hombre es de 0,01 - 0,02 mM (Medenwald, 1972). Sorprendentemente, en los estudios a bajas concentraciones del fármaco, el comportamiento del sistema de activación cambia significativamente. En este caso, la presencia de NADPH resulta en una disminución de la intensidad de unión covalente de los metabolitos reactivos del BZ a las proteínas microsomales y al ADN agregado al sistema, en lugar de estar aumentada como ocurre a altas concentraciones del BZ.

Estos resultados sugieren la existencia de por lo menos dos sistemas de activación del BZ, uno dependiente y otro independiente del NADPH. Este último, tendría mayor afinidad por el BZ y se saturaría a concentraciones menores del fármaco, respecto del otro que requiere NADPH. Estas características explicarían porque el sistema de activación independiente del NADPH, actuaría preferentemente a bajas concentraciones del BZ, mientras que el que requiere NADPH es el predominante a altas concentraciones del fármaco. Es difícil imaginar qué reacciones llevarían a la formación de metabolitos reactivos en ausencia de NADPH como agente reductor. Sin embargo, este comportamiento fue

observado repetidamente, siendo además con seguridad un proceso de naturaleza enzimática, por cuanto un pre-calentamiento de las suspensiones microsomales destruye esta capacidad de activación del BZ.

Estos resultados también sugieren la presencia de un camino metabólico de desintoxicación, que no conduce a la formación de metabolitos reactivos. Esto es claramente notorio a bajas concentraciones de BZ cuando la adición de NADPH a las mezclas de incubación disminuye la intensidad de unión covalente de los metabolitos del fármaco a las macromoléculas. Es un comportamiento particular el que se observa a bajas concentraciones de BZ donde se registra la máxima unión covalente en ausencia de NADPH. Se eligió esta concentración del fármaco, para ser utilizada en el resto de los experimentos efectuados "in vitro", para intentar aumentar la información al respecto.

Es sabido que el fenobarbital en tratamientos a animales produce inducción enzimática con un aumento de 3 a 4 veces en los contenidos de citocromo P-450 (Blumberg, 1978). Sin embargo, en incubaciones de microsomas de hígado de ratas tratadas con fenobarbital sódico durante 3 días en dosis diarias de 80 mg/kg i.p. no se produjo un aumento significativo en la intensidad de unión covalente de metabolitos reactivos del BZ al ADN del sistema, o al menos no en la proporción de aumento que se informa para el contenido de citocromo P-450 por efectos del fenobarbital. Esto podría significar que el citocromo P-450 no estaría mayormente involucrado en la formación de metabolitos reactivos en estas condiciones de trabajo. No se descarta, sin embargo la posibilidad de participación del citocromo P-450 en la formación de otros metabolitos que tengan como blanco de ataque otros constituyentes celulares, por ejemplo fosfolípidos, proteínas microsomales, etc. Podría considerarse además una

participación del citocromo P-450 en vías metabólicas de desintoxicación de este fármaco en tal caso su actividad conduciría a la formación de metabolitos no reactivos.

Hasta el momento están descriptos varios sistemas enzimáticos que poseen actividad de nitroreductasa: NADPH -cit c reductasa y NADPH -cit P-450 reductasa microsomales; y DT diaforasa, xantino oxidasa, aldehído oxidasa y lipoil deshydrogenasa citosólicas (Wang et al., 1974). La xantino oxidasa y aldehído oxidasa son metaloflavoproteínas que coexisten en distintas especies, incluyendo al hombre. Llevan a cabo reacciones de reducción y oxidación, estas últimas involucran la hidroxilación oxidativa de un sustrato específico, los electrones cedidos por éste son transferidos a otro aceptor y el átomo de oxígeno incorporado en el producto, es obtenido del  $H_2O$  y no del  $O_2$ , hecho que las diferencia de las enzimas oxidasa de función mixta (Rajagopalan, 1980). Se efectuaron incubaciones de la xantino oxidasa como enzima pura, de su sustrato específico hipoxantina, de BZ y de ADN agregado al sistema. Se determinó, a través de la radiactividad asociada a la macromolécula, una proporción importante de metabolitos del BZ formados a partir de la xantino oxidasa. Se sugiere que esta enzima potencialmente podría estar involucrada en la bioactivación del fármaco. Utilizando mediadores de transporte de electrones como FAD y metil viológeno no se logró modificar significativamente la actividad de la vía metabólica NADPH independiente que actuaría a estas concentraciones de BZ 0,02 mM, en incubaciones de microsomas de hígado de rata. Sin embargo, la adición de FAD a las mezclas de incubación aumenta significativamente la actividad BZ nitroreductasa NADPH- dependiente, cuando se utilizan concentraciones del fármaco de 0,2 mM (Masana et al., 1984 a), donde se supone que la nitro-reducción se efectuaría a expensas del  $FADH_2$  que se forma por la reducción del FAD



con NADPH, catalizado por cit c reductasa ( Masana et al., 1984 a).

La mayoría de las reacciones que metabolizan xenobióticos por enzimas microsomales son reacciones de oxidación y requieren oxígeno y NADPH. En nuestro caso, la bioactivación de los nitrocompuestos sigue una vía reductiva, experimentalmente comprobado para el caso del BZ (Masana et al., 1984 a) y la nitroreducción es activa principalmente bajo condiciones anaeróbicas. Es por ello que la mayor parte de los experimentos efectuados "in vitro" se realizaron principalmente en anaerobiosis. Si bien se confirma este requerimiento de anaerobiosis y una mayor activación del BZ en ausencia de NADPH en estas condiciones puede inferirse a través de los resultados obtenidos que la nitro-reducción no es completamente nula en presencia de oxígeno y que en aerobiosis tiene lugar una proporción de ésta.

El comportamiento y análisis para el BZ de las vías de activación y desintoxicación, en aero y anaerobiosis, en presencia y ausencia de NADPH, es complejo. Y si bien es difícil esclarecer las causas precisas para el confuso cuadro de metabolismo y activación del BZ, los resultados indican claramente que una causa de estas discrepancias podría ser que su metabolismo involucre varios caminos, con más de una vía de activación y quizás más de una posibilidad simultánea de desintoxicación que lleve a productos no reactivos.

Se conoce que la activación de los compuestos químicos a formas reactivas si bien es preponderantemente microsomal no se limita a esta localización. Por ejemplo, el núcleo también posee citocromo P-450 y es potencialmente capaz de metabolizar xenobióticos. A raíz entonces de los resultados obtenidos donde se demuestra la unión covalente del <sup>14</sup>C-BZ al ADN incorporado al sistema, y proteínas microsomales, se supuso ideal estudiar si en núcleos también podía registrarse una actividad similar,

y si la interacción podía producirse con sus proteínas y ADN nucleares. A tal fin se efectuaron incubaciones a 37°C, de suspensiones de núcleos purificados de hígado de rata, libres de retículo endoplásmico y se demostró que son capaces de activar al BZ. Esta activación, aunque de menor proporción que la microsomal, es suficiente para formar metabolitos reactivos que interaccionan con las proteínas y ADN nucleares. Esta activación es NADPH dependiente y enzimática por cuanto el pre-calentamiento de los núcleos los inhabilita para la misma. La importancia de la existencia de esta activación nuclear es que aumenta las posibilidades de que metabolitos reactivos del fármaco, al ser producidos dentro del núcleo puedan interactuar más fácilmente con macromoléculas críticas para la expresión de efectos tóxicos crónicos, como son las proteínas y ADN nucleares. Debido a la cercanía intracelular, los metabolitos producidos en una activación nuclear tendrían mayores probabilidades de producir estos efectos que los metabolitos producto de una activación microsomal.

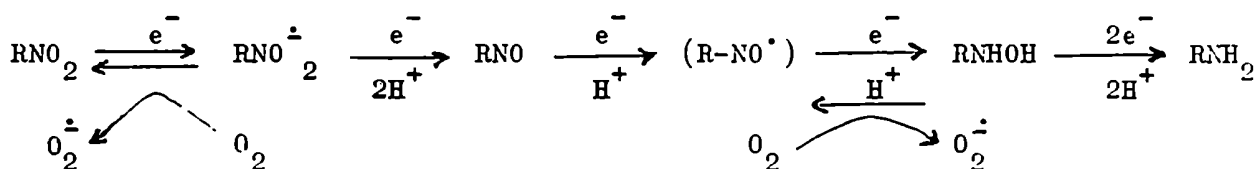
Se efectuó además, en las condiciones en que se había obtenido la máxima radiactividad asociada, la separación de las proteínas nucleares en sus diferentes fracciones para determinar el modo de distribución de la unión covalente en las mismas. Los resultados demuestran que las fracciones de proteínas ácidas (no histonas) ligadas al ADN son responsables de la mayor parte de la radiactividad asociada a proteínas nucleares. Una fracción también significativa, pero menor, está asociada a la fracción I de proteínas nucleares solubles. Es sabido de la importancia del rol de las proteínas nucleares en el control de la expresión genética y la estructura cromosómica. Los estudios publicados sobre interacción de compuestos químicos con constituyentes celulares muestran que la mayor parte de la unión de carcinógenos en el núcleo está localizada con las proteínas nucleares, particularmente las no histónicas (Gronow,

1980). El descubrimiento de la existencia de los oncogenes, obliga a repensar en la teoría epigenética y revaloriza el rol de las proteínas nucleares en la carcinogénesis. No debe olvidarse que el cáncer podría ser producido por otro mecanismo que no involucre la mutagénesis clásica (Gronow, 1980).

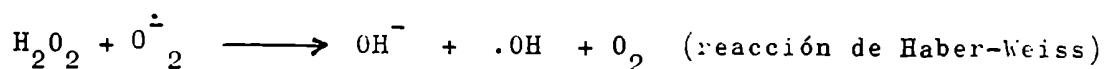
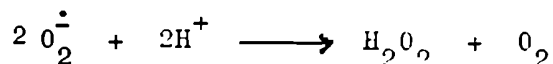
Resumiendo, nuestros estudios indican que principalmente en condiciones anaeróbicas, los metabolitos reactivos del BZ son capaces de interactuar con proteínas microsomales, ADN agregado al sistema, proteínas y ADN nucleares. El ADN es blanco favorito de los metabolitos reactivos, respecto de las proteínas microsomales, por cuanto la marca específica es mayor en el primero. Sorprendentemente las proteínas suelen ser el sustrato de elección para los radicales libres, hecho que se observa para las proteínas nucleares respecto del ADN. Otros autores demostraron estas interacciones para los fosfolípidos y proteínas microsomales (Masana et al., 1984 a; Toranzo et al., 1984; Masana et al., 1985). Más de un camino metabólico estaría involucrado en la activación y desintoxicación del BZ. Mayor número de estudios en el tema completarán la idea de la participación de enzimas microsomales, citosólicas, vías aeróbicas y/o anaeróbicas en la biotransformación del Benznidazol. Pero al margen de los mecanismos que estén involucrados lo que sí puede afirmarse es la formación "in vitro" de metabolitos químicamente reactivos del BZ y la potencialidad de interacción de éstos con macromoléculas celulares de rol protagónico en la vida celular. Cual es la probabilidad de que esta situación ocurra "in vivo" es difícil de asegurar. Quizás el mayor inconveniente, para hacer esta extrapolación, sea la sensibilidad al oxígeno de la nitro-reducción que involucra el metabolismo de estos compuestos. Esta sensibilidad puede determinar la ocurrencia o no de uno u

otro camino metabólico, pudiendo regir consecuencias tan importantes como la producción de efectos tóxicos distintos, y diferentes modos de prevenir éstos sin alterar las cualidades benéficas del fármaco. De allí que las vías metabólicas de los nitrocompuestos sean extensamente estudiadas, porque tienen una gran influencia en el campo de la quimioterapia, toxicología y metabolismo de drogas. Algunos azo y nitro compuestos pueden ser reducidos no-enzimáticamente a aminas por agentes biológicos reductores como NADPH, NADH y flavinas reductoras. Otros azo y nitro compuestos son reducidos enzimáticamente a aminas primarias por una serie de intermediarios autooxidables o pueden ser reducidos por una variedad de sistemas enzimáticos, algunos pertenecientes a las bacterias intestinales (Gillette, 1971). La interrelación entre los distintos sistemas enzimáticos y entre los índices relativos de reducción y reoxidación de los intermediarios dificulta la determinación de cual es el mecanismo importante en los seres vivos.

El primer paso en la reducción enzimática de los nitrocompuestos ( $\text{RNO}_2$ ) es la transferencia de un electrón al sustrato para generar el radical nitroanión ( $\text{RNO}_2^{\cdot-}$ ). Algunos radicales aniones nitroaromáticos en presencia de oxígeno pueden reaccionar para producir anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y regenerar el nitrocompuesto de partida; y en ausencia de oxígeno continuar con la nitro-reducción enzimática hasta la amina correspondiente ( $\text{RNH}_2$ ), a través de los intermediarios hidroxilamina ( $\text{RNHOH}$ ) (Mitchard, 1971).



Por otro lado los aniones superóxido se convierten en  $H_2O_2$  espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa y luego a través de la reacción de Haber-Weiss (Haber y Weiss, 1954) se pueden generar radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ).



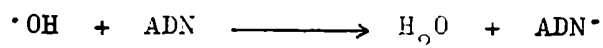
Los compuestos hidroxilaminos también pueden reoxidarse en aire con formación de radicales superóxidos por lo que las condiciones anaeróbicas son necesarias para que tenga lugar toda la secuencia de reducción enzimática delineada en primer término.

Es evidente que los procesos metabólicos oxidativos y reductivos pueden estar en competencia en centros críticos de los compuestos químicos. La ocurrencia alternativa de una u otra secuencia, dependiendo del sustrato y las distintas condiciones posibles conducirá a productos diferentes con los consecuentes efectos resultantes.

De los metabolitos reactivos formados durante la reducción enzimática de los nitrocompuestos algunos autores opinan que las N-hidroxyaminas parecen ser las responsables de procesos importantes como la carcinogénesis de numerosos nitrofuranos (Boyd et al, 1979; Wang et al, 1974). La unión covalente de metabolitos reactivos o radicales libres a constituyentes celulares se sabe que estaría involucrada en diferentes expresiones de daño celular (Castro, 1984). Por otro lado el  $O_2^{\cdot -}$  y el  $\cdot OH$  pueden iniciar reacciones en cadena de radicales libres, que conducen a la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados de las membranas lipídicas (Docampo et al., 1978).

Se cree que el radical hidroxilo es una de las especies reactivas resultantes de la reducción univalente de  $O_2$ , que más involucrado estaría con la producción de daño celular (Docampo y Stoppani, 1979).

El  $\cdot OH$  podría estar involucrado con el daño inicial al ADN con un ataque a la base nitrogenada o a la desoxyrribosa (Favaudon, 1982),



y escisión de la cadena por descomposición/eliminación de la base (Favaudon, 1982).

Respecto de los nitrocompuestos antichagásicos de esta evaluación, los estudios de Docampo y col. muestran que en mezclas de incubación de microsomas de hígado de rata se forman los radicales nitroaniones correspondientes del NFX y del BZ y que concentraciones farmacológicas del NFX son capaces de estimular también "in vitro" la producción de  $O_2^{\dot{-}}$ ,  $H_2O_2$  y peroxidación de lípidos (Docampo et al., 1981). En contraste con el nitrofurano, el nitroimidazol Benzimidazol genera "in vitro" la producción de  $O_2^{\dot{-}}$  y  $H_2O_2$  con menor intensidad que el Nifurtimox, utilizando concentraciones de BZ de una magnitud un orden mayor respecto de las concentraciones utilizadas de NFX (Moreno et al., 1982). Los resultados indican que el BZ es 10 veces menos activo como generador de anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Moreno et al., 1985). Pareciera que los compuestos más tóxicos como los nitrofuranos son más reactivos a través del oxígeno que los menos tóxicos nitroimidazoles (Docampo et al., 1981).

Estudiando la evolución de pentano en ratas, como método para detectar la courrencia de peroxidación de lípidos "in vivo", otro grupo de investigadores informa que en animales tratados con NFX p.o. se produce un aumento significativo en la formación de pentano.

Este aumento se observa nítidamente a las 10 horas de administración del fármaco y no fue detectado en los animales tratados con BZ a 5, 6 y 10 horas después de la administración del mismo (Castro y Castro, 1985). Sin embargo, otros autores ya demuestran dentro de este período la producción de efectos irreversibles causados por BZ en la actividad enzimática del metabolismo hepático de drogas (Masana y Rubio, 1985). En el caso del BZ la peroxidación de lípidos no pareciera ser el mecanismo de acción dominante, pudiendo ser algún otro que involucre las interacciones covalentes de metabolitos activos del compuesto con constituyentes celulares como las antes citadas para proteínas microsomales y fosfolípidos (Masana et al., 1984 a; Toranzo et al., 1984; Masana et al., 1985) además de las descritas en este trabajo de tesis con ADN, proteínas microsomales y proteínas nucleares. Los ensayos clínicos del uso de los 2-nitroimidazoles como radiosensibilizadores en la terapia de los cánceres (Kim y Chu, 1981), apoyan esta hipótesis. Las células tumorales hipóxicas, particularmente las del centro del tumor, resultan especialmente radiorresistentes y los radiosensibilizadores aumentan los efectos letales de la radiación. Esta propiedad reside en el grupo nitro de la estructura nitroheterocíclica y en la formación de metabolitos activos del compuesto por sistemas celulares de nitroreductasas. Por otro lado, los trabajos de mutagénesis en bacterias de los 2-nitroimidazoles suponen que la reducción del grupo nitro es necesaria para la actividad mutagénica de los mismos (Voogd, 1981).

En cuanto al mecanismo de acción del NFX, lo que se informa en la bibliografía apoyaría la hipótesis sobre los efectos del fármaco a través de derivados de la reducción parcial del oxígeno, principalmente del  $\cdot\text{OH}$ . Es posible suponer que, en caso de haber podido disponer de NFX radiactivo, estudios semejantes a los realizados en esta investigación con  $^{14}\text{C}$ -BZ, nada hubieran detectado. En este caso sería difícil llegar a elaborar un

sistema que demuestre la interacción con macromoléculas celulares de radicales hidroxilo provenientes de la nitro-reducción del NTX dado la inexistencia de isótopos radiactivos del oxígeno y el recambio constante de hidrógeno en el medio biológico.

Sintetizando esta parte de la discusión se concluye que un  $\text{RNO}_2$  podría potencialmente presentar una nitro-reducción que resultara en metabolitos reactivos capaces de hacer interacción covalente con constituyentes celulares o en intermediarios electrofílicos capaces de inducir peroxidación de lípidos o atacar el ADN u otros constituyentes celulares. Alternativa o simultáneamente, con mayor o menor intensidad, cualquiera de estos dos caminos metabólicos podría conducir a procesos de toxicidad. Independientemente de la mayor o menor relevancia de uno u otro mecanismo de toxicidad, incógnita que futuras investigaciones pueden llegar a dilucidar, se pretende con este trabajo brindar un pequeño aporte en el tema.

Se podría sugerir un mecanismo de toxicidad diferente del NFX y del BZ, del primero a través de derivados de la reducción parcial del  $\text{O}_2$  y del BZ a través del derivado hidroxylamina correspondiente. Otros estudios deben ser realizados para comprobar esta hipótesis que sugiere la participación de las interacciones con el ADN y proteínas nucleares en los efectos nocivos del BZ y para comprender la naturaleza de los procesos enzimáticos del BZ en ausencia de NADPH. Especialmente sería útil efectuar un mayor número de estudios "in vivo", optimizando las condiciones de trabajo. Nuestros resultados negativos obtenidos "in vivo", en las mediciones de unión covalente de metabolitos reactivos al ADN de hígado de ratas y ratones tratados con  $^{14}\text{C}$ -BZ, luego de 1,6 y 24 horas, y 6 horas respec-



tivamente, luego de la administración del fármaco, deben ser analizados con precaución debido principalmente a la bajísima actividad específica del  $^{14}\text{C}$ -BZ disponible. Esta es sumamente baja respecto de la empleada habitualmente para este tipo de estudios.

Las dosis empleadas fueron de 10 mg/kg, con un promedio de 2,5 a 11,2 uCi/50 gs de peso. Además ante la inexistencia de datos de carcinogénesis para el BZ es difícil la elección del órgano blanco adecuado. Lo lógico sería partir del conocimiento de los órganos susceptibles al fármaco para efectuar los estudios en éstos.

En este trabajo se partió de hígado, bajo conocimiento de que es el órgano más importante en la biotransformación de xenobióticos pero puede no ser el adecuado para el caso. Otras variables a considerar, utilizadas habitualmente en estudios "in vivo" si se poseen las condiciones adecuadas, son: dosis mayores, distinto número de administraciones, dietas especiales, uso de inductores o promotores, hepatectomía, etc.

En cuanto al análisis de los resultados obtenidos en los sistemas citogénéticos empleados en la evaluación genotóxica de ambos antichagásicos, NFX y BZ, puede afirmarse que el NFX aumentó de modo estadísticamente significativo la incidencia normal de daño genético en los sistemas utilizados. Por un lado, en un sistema totalmente "in vivo", aumentó la frecuencia de micronúcleos en médula ósea de ratones bajo tratamiento con el fármaco. Y por otro lado, en un sistema "in vivo"/"in vitro", elevó la incidencia de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de bazo de ratones tratados, respecto de los niveles de intercambio en los animales controles, sin tratamiento.

Por lo cual puede afirmarse que en ensayos experimentales en animales el NFX tiene efectos genotóxicos. Sin embargo, el efecto del NFX en el

ensayo del micronúcleo en médula ósea sólo se observa cuando el fármaco es administrado en forma oral a los animales, y está ausente en la administración intraperitoneal. Esto podría sugerir la participación de la microflora intestinal en la modulación del efecto tóxico final. En la administración oral la sustancia química entra directamente al tracto digestivo, y si bien una gran parte es absorbida en el intestino delgado, por circulación enterohepática podría reingresar rápidamente al tubo digestivo. En la administración intraperitoneal, si bien la absorción a sangre es inmediata porque la sustancia sólo debe atravesar el endotelio de los capilares, existe un mayor número de barreras biológicas (membranas, células y tejidos) hasta llegar a ser sustrato de la microflora intestinal, suponiendo un rol de ésta en la nitro-reducción del NFX. Toranzo y col. han demostrado la presencia de actividad nitro-reductiva muy intensa para el NFX y el BZ en heces humanas y de rata (Toranzo et al., 1983). Una reducción de los grupos nitro por la microflora intestinal no es descartable; este hecho constituyó uno de los primeros descubrimientos en el área del metabolismo microbiano de xenobióticos (Scheline, 1975).

El análisis de los efectos genotóxicos que estos compuestos pueden producir en células de la médula ósea o de bazo de ratón plantea distintas alternativas. Los efectos pueden resultar de la acción de los metabolitos reactivos de los fármacos formados en estos tejidos, "in situ", o en otra parte del organismo. En el primer caso sería necesario demostrar que los mismos son potencialmente capaces de bioactivar al NFX, y en el segundo caso podría suponerse que los metabolitos reactivos llegan por el torrente sanguíneo, después de ser producidos en otras localizaciones. El hígado y la materia fecal serían los de mayor probabilidad. El hígado por su posición estratégica en relación a la entrada de xenobióticos al organismo por el tracto gastrointestinal y por ser el órgano más activo en los sis-

temas que metabolizan estas sustancias. Y la materia fecal porque debido a su medio anaerobio puede estar particularmente favorecida la biotransformación bacteriana de los nitro compuestos y constituye además una masa no despreciable respecto de la masa hepática. Se le otorga a la flora bacteriana un rol importante en la conversión de los nitrocompuestos aromáticos participando en el metabolismo de los mismos, la modulación de sus efectos farmacológicos y su toxicología en el organismo (Gillette, 1971). Otros autores también sugieren que los productos de la biotransformación, formados durante la nitroreducción serían los responsables de la genotoxicidad de los 5-nitrofuranos y la microflora intestinal podría afectar la carcinogenicidad de los mismos (Wang et al., 1984).

Esta nitro-reducción de los nitroheterocíclicos es, como ya expusieramos un proceso reductivo, favorecido en anaerobiosis, cuyas enzimas están ampliamente distribuídas en muchos tejidos animales y en procariotas. Sin embargo, la condición de anaerobiosis no es concluyente y la nitro-reducción aún es un proceso con incógnitas. Hasta la actualidad han sido identificadas dos tipos de nitro-reductasas que funcionan de modo fundamentalmente distinto. La actividad nitro-reductiva tipo I presente solamente en bacterias y la actividad nitro-reductiva tipo II presente en bacterias y en células de mamíferos (Mc Calla, 1981).

Estas actividades nitro-reductivas son diferentes por lo siguiente: la de tipo I es insensible al oxígeno y la de tipo II, la única presente en células de mamíferos, es inhibida por  $O_2$  y cataliza la reducción neta de los nitrocompuestos sólo bajo condiciones de hipoxia. Esta sensibilidad al oxígeno es debida principalmente a que el radical nitroanión (el primer intermediario formado) es fácilmente reoxidado por el oxígeno molecular, en lugar de seguir la reducción a amina, con producción de radical superóxido. Por otro lado, otros metabolitos intermediarios son re-

oxidables. Por todo esto es que la actividad nitro-reductiva de las bacterias intestinales, debido a su ambiente de anaerobiosis, está ampliamente favorecida, respecto de las células de mamíferos. De todos modos nada puede afirmarse con seguridad y muchos son los interrogantes que restan, dado los numerosos factores que pueden modificar el metabolismo de xenobióticos en el organismo. Si bien se supone una absorción rápida del fármaco por el tracto gastrointestinal, otras circunstancias como la motilidad intestinal y la dieta, para citar sólo algunas, pueden afectar el tránsito del fármaco en el tubo digestivo, aumentando o no la probabilidad de ser absorbida.

Otro factor a considerar sería la ocurrencia de excreción biliar del NFX como se sugiere por algunos investigadores (Docampo et al., 1985).

A través de la bibliografía se deduce un mayor conocimiento de la participación de los nitrofuranos en procesos nocivos que involucran al material genético (Olive y Mc Calla, 1977; Boyd et al, 1979; Swaminathan et al., 1981); los nitrofuranos son generalmente más mutagénicos que los nitroimidazoles (Voogd, 1981) y la nitro-reducción en la activación metabólica de los mismos ha sido sugerida como paso inicial en la actividad de los nitrofuranos carcinogénicos (Boyd et al., 1979).

En el presente trabajo, a los fines de conocer si la médula ósea sería potencialmente capaz de nitro-reducir estos fármacos "in situ", se efectuaron incubaciones de suspensiones de médula ósea a 37°C en presencia de NFX y BZ. La actividad nitro-reductiva para el NFX fue de 0,202 nmoles de NFX red./min./mg de proteína, respecto del BZ (0,075 nmoles de BZ red./min./mg de proteína). Se deduce de los valores una mayor actividad nitro-reductiva para el NFX, que apoya los resultados positivos obtenidos para éste respecto del BZ.

Otros autores han demostrado una intensa actividad nitro-reductiva

para el NFX en distintos órganos de rata, que es más importante en hígado y de menor intensidad en el resto de los tejidos (Masana et al., 1984 b).

Estos resultados positivos obtenidos en los tratamientos con NFX en el ensayo del micronúcleo y de ICH evidencian que este fármaco posee actividad genotóxica "in vivo" en ratones pudiendo suponerse que sería potencialmente capaz de producir estos efectos en otras especies. De todos modos, si bien el aumento fue estadísticamente significativo en tablas específicas para detectar significación estadística en frecuencias de mutación, los valores obtenidos con el diseño utilizado evidencian claramente que el aumento es moderado. No puede afirmarse entonces en forma concluyente que el NFX sea un mutágeno o un carcinógeno pero la experiencia recogida por la extensa bibliografía utilizando estos ensayos sugiere que potencialmente podría serlo. Idéntico análisis podría efectuarse para los resultados obtenidos de unión covalente del BZ a macromoléculas celulares. La unión covalente de metabolitos reactivos a proteínas o al ADN no implica necesariamente un efecto tóxico o un efecto mutagénico/carcinogénico, aunque frecuentemente estas correlaciones existen.

Los resultados negativos obtenidos para los tratamientos con BZ en los ensayos citogenéticos pueden deberse a más de un motivo:

a) que no se produzcan efectos genotóxicos que conduzcan a la formación de micronúcleos o al incremento de ICH a causa del BZ (independientemente de que puedan producirse otras lesiones que conduzcan a alteraciones genéticas diferentes).

b) que el daño cromosómico por BZ tenga una cierta especificidad de tejidos, y que no coincida en este caso con médula ósea o con bazo. Algunos premutágenos requieren de una activación metabólica tejido espe-

cífica.

c) que se necesite implementar otros diseños para detectar los efectos, en cuanto a administración del fármaco, dosis, tiempo de exposición y muestreo.

d) que por diferentes razones no llegue a médula ósea la concentración requerida de BZ o de sus metabolitos para inducir efectos genotóxicos. Por ejemplo si los metabolitos son producidos en otros tejidos, pueden tener una corta vida y no llegar a médula ósea en la concentración efectiva. También puede considerarse que la dosis haya sido insuficiente. Los valores del laboratorio Hoffman-La Roche & Co. de DL50 para el ratón son 8000 mg/kg p.o. y 5156 mg/kg i.p. (Pellmont, 1969).

Si se presentaran las situaciones b, c ó d, el efecto genotóxico tampoco podría evidenciarse de usarse otras alternativas útiles de detección como son aberraciones cromosómicas en metafase o anafase de células de médula ósea.

De hecho ninguno de los ensayos de corto plazo debe ser considerado como una técnica fija y estricta, sin posibilidades de ser modificada. Muchas variables participan en estos ensayos y modificaciones profundas o sutiles de una o varias de éstas pueden conducir a resultados diferentes. Por ejemplo, si bien ha sido estudiada la diferente sensibilidad de especies distintas en el ensayo del micronúcleo, no se han efectuado estudios sistemáticos para determinar si algunas cepas de ratones son más adecuadas por su susceptibilidad que otras (Matter y Schmid, 1971). El empleo de agentes inductores podría también aumentar la sensibilidad del ensayo (Heddle y Salamone, 1981). Para el caso del BZ otros autores obtienen, con otros diseños, resultados diferentes (Navarro y Nagel, 1984).

En cuanto a los resultados positivos del NFX en el ensayo del ICH debe contemplarse que durante los últimos años el análisis de ICH es

considerado un medio muy sensible para detectar daño genético. inicial en la formación de ICH se ha visto aumentado por la creciente correlación entre la habilidad de varios agentes de inducir ICH y las actividades de los mismos como mutágenos-carcinógenos (Latt, 1980).

El análisis de ICH parece ser el método más sensible para detectar carcinógenos mutagénicos, utilizando células de mamíferos (Wolff, 1979) y los estudios indican una notoria similitud entre la potencia relativa de inducción de ICH y la conocida potencia tumorigénica de algunos compuestos (Cheng et al., 1981; Cheng y Conner, 1982). Sin embargo, mientras se sabe que los micronúcleos se originan por la acción de agentes mutagénicos sobre el huso acromático o sobre los cromosomas con producción de fragmentos acéntricos, son aún desconocidos los mecanismos de producción de ICH. Abundante bibliografía intenta dilucidar el significado biológico y el mecanismo de formación de los intercambios. Algunos resultados sugieren una cierta correlación entre los mecanismos involucrados en la inducción de ICH y la reparación post-replicación de daño al ADN, que involucra un proceso de recombinación (Bender et al., 1974; Kato, 1973).

Por otro lado, si bien la respuesta de células deficientes en el mecanismo de reparación por escisión sugieren que el daño no reparado producido por irradiación U.V. estaría involucrado en la producción de ICH no existiría una correlación simple entre la frecuencia de ICH y una reparación por escisión del ADN (de Weerd-Kastelein et al., 1977). Carrano y col. demostraron para seis compuestos químicos una correlación lineal entre la inducción de ICH y mutaciones génicas en el locus hipoxantina fosforibosil transferasa (hprt) en células de ovario de hamster chino (Carrano et al., 1978).

En cuanto a los estudios que intentan relacionar la inducción de ICH con citotoxicidad, los resultados indican que la formación de intercambios involucraría un daño al ADN u otro daño a nivel del genoma antes que una citotoxicidad inespecífica (Raffetto et al., 1979).

Los inhibidores de síntesis de proteínas reducen la formación de ICH, quizás por efectos sobre proteínas involucradas en los procesos de recombinación del ADN (Sono y Sakaguchi, 1981).

Ultimamente se sugiere que el ICH podría ser inducido por un amplio espectro de lesiones al ADN, que las lesiones mutagénicas se producirían a consecuencia de la lesión que forma el ICH y que la capacidad celular de reparar al ADN podría afectar dramáticamente la conversión de la lesión a un ICH o a una mutación (Carrano y Thompson, 1982). Se piensa que las lesiones relevantes para tumorigénesis serían aquellas que persisten con poca evidencia de reparación a través de varios ciclos celulares (Conner et al., 1984).

Si bien se requieren aún más estudios para determinar las lesiones moleculares que producen el ICH y las bases moleculares de su formación en relación con procesos de reparación del ADN y mutagénesis, los resultados de incidencia de ICH por NFX en ratones sugieren que el fármaco produce algún tipo de daño al ADN en las condiciones de evaluación empleadas. Además, desde el punto de vista técnico se revaloriza el uso de un sistema para la detección de ICH.

La mayoría de la bibliografía comprende estudios "in vitro", una proporción mucho menor efectúa estudios "in vivo" y son escasos los estudios que, como en el presente trabajo, utilizan un sistema "in vivo"/"in vitro".

La administración del compuesto al animal de experimentación y el posterior cultivo "in vitro" de células expuestas "in vivo" al compuesto químico ofrece una ventaja inigualable frente a los sistemas "in vitro" que es la metabolización y activación del agente químico por el organismo, evitando, por otro lado, el traumatismo y posible sinergismo o antagonismo del BrdU, la colchicina y el compuesto en los estudios "in vivo".



Este sistema proporciona un modo preliminar útil para experimentar la exposición a agentes físicos, químicos, ambientales, etc., previo a un monitoreo de la población humana.

Otro ítem a considerar es la dispersión de los índices de ICH en los experimentos. Estos pueden analizarse respecto de la variación individuo a individuo (variación interindividual) y de la variación célula a célula dentro de un mismo individuo (variación intraindividual). De las desviaciones estándares alrededor del promedio de los valores de ICH/célula de cada individuo y del conjunto de individuos por tratamiento (tablas 11 y 12) puede afirmarse que la mayor fuente de variación en los ICH es intraindividual más que interindividual, dispersión que está graficada en las figuras 10 a la 17.

Estas interpretaciones coinciden con las efectuadas por otros autores (Hirsch et al., 1984). Esta variación es controlada analizando un número suficiente de mitosis por individuo. Si bien algunos autores estiman que ese número es de 50 mitosis por individuo (Hirsch et al., 1984), el número de metafases más comunmente contado es de 15 a 30 (Wulf et al., 1984). Además, con muestras de 30 mitosis analizadas por animal y no menos de 5 individuos por grupo ya puede detectarse con probabilidad de 0.95 un porcentaje mínimo de aumento de 33,7 en el índice de ICH, usando una teoría de distribución normal de los datos (Hirsch et al., 1984).

Comparando los resultados de la tabla 8 del ensayo del micronúcleo y la figura 20 de ICH se puede extraer el siguiente análisis. A las dosis empleadas en la formación de micronúcleos se observa una especie de "sa-

ración" en el daño genético, donde una duplicación de la dosis no produce un aumento concomitante en la frecuencia de micronúcleos. Por otro lado, a idénticas dosis, la curva dosis-respuesta de ICH a efectos del NFX es claramente ascendente estando ausente ese efecto de "saturación" de ICH. Esto sugiere una diferencia de sensibilidad de ambas técnicas, o más de un tipo de efecto genético por NFX y en tal caso un significado genético diferente por la formación de ICH o micronúcleos.

Por último cabe preguntarse sobre la ocurrencia en humanos de los efectos genotóxicos observados en estos 5 ensayos a causa del NFX y BZ. En relación a todas las experiencias realizadas "in vitro" con  $^{14}\text{C}$ -BZ donde se demostró la unión covalente a macromoléculas celulares, bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  para favorecer las posibilidades de nitro-reducción, en un organismo vivo suponemos que las condiciones son preferentemente aeróbicas con, tal vez, situaciones fisiológicas o micro-ambientes celulares de anaerobiosis. Se deduciría que la probabilidad de ocurrencia de un metabolismo oxidativo es mayor, pero no por ello puede negarse la existencia de un metabolismo reductivo de xenobióticos. En este análisis tampoco debe descartarse el importante rol de las bacterias intestinales en la bioactivación de los compuestos químicos y por ende en una suerte de colaboración en los organismos procariontes y eucariontes en la regulación de la acción farmacológica y toxicológica de los fármacos en los organismos superiores. Existen en la actualidad más de 100 ensayos de corto plazo para la detección de mutágenos y carcinógenos.

Estos ensayos comparten el objetivo de pretender detectar alteraciones o daño en el material genético. Difieren entre sí en los diferentes sistemas biológicos que emplean para este fin y esencialmente en que emplean como medio distintos niveles de organización celular. Esto es particularmente necesario. Una mutación puntual inducida, a la que podemos considerar un efecto genotóxico, no necesariamente va a resultar en un efecto visible estructuralmente en la morfología de los cromosomas, y como se sobreentiende aquella no deja de ser importante. Pero podría no ser detectable en un estudio de efectos clastogénicos. La ausencia de aberraciones cromosómicas no indicaría entonces necesariamente una ausencia de daño genético.

Por otro lado dos formas de visualización de daño al ADN, por ejemplo ICH y aberraciones cromosómicas pueden ser respuestas alternativas de daño. Algunos autores de trabajos sobre efectos genotóxicos en niños bajo quimioterapia para cáncer (Aronson et al., 1982), obtienen una ausencia de correlación entre la frecuencia de aberraciones cromosómicas e incidencia de ICH en los grupos bajo terapia en estudio, observándose pacientes con niveles altos de aberraciones cromosómicas y niveles normales de ICH y viceversa, y otros grupos con ambos tipos de lesión, con altos o con bajos niveles.

Por todo esto es que en las evaluaciones de riesgos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos se aconseja el uso de baterías de ensayos "in vitro" e "in vivo", para disminuir los falsos positivos y negativos. Es también por este motivo que puede ser comprensible que en esta evaluación genotóxica de los antichagásicos los metabolitos reactivos del BZ evidenciaran una clara unión covalente a macromoléculas celulares pero no aumentaran los niveles normales de incidencia de micronúcleos o de intercambio de cromátidas hermanas.

Para finalizar debe recalcar que se conocen para el NTX y el BZ efectos tóxicos agudos en el hombre bajo tratamiento con estos anti-chagásicos y aún cuando escasa, existe bibliografía sobre estudios experimentales de probables efectos crónicos nocivos de estos fármacos en distintos sistemas biológicos, incluidos los resultados obtenidos en este trabajo.

Debido a la gran variabilidad y complejidad de las situaciones, ningún sistema experimental puede reproducir fielmente las consecuencias futuras de la actual exposición de grupos humanos a estos anti-chagásicos o una cuantificación de riesgo del uso de los mismos. Sería útil realizar un monitoreo de la población expuesta, hacer un seguimiento de los grupos humanos bajo tratamiento para evaluar efectos genotóxicos. El análisis cromosómico es el procedimiento más fácilmente aplicable para analizar daños genotóxicos en humanos expuestos "in vivo", a través de aberraciones cromosómicas o de intercambio de cromátidas hermanas. Aún cuando el proceso de producción de ICH no sea claro, sigue siendo un fenómeno genético de interés. Al igual que los resultados que se obtengan con el uso de animales intactos, éstos constituyen un sistema de relevancia porque involucran al metabolismo "in vivo" de los xenobióticos. Y hasta tanto no puedan ser trasladados al hombre los estudios de riesgo efectuados experimentalmente en animales, de algún modo deben ser tenidos en cuenta con un conveniente análisis riesgo-beneficio en el uso de los mismos. Donde no solo sea considerado el beneficio de los mismos, que de ningún modo significa que no pueden ser empleados, sino que el profesional médico pueda indicarlos bajo el conocimiento de los potenciales riesgos, conocimiento que puede y debería aún ampliarse, especialmente para aquellas etapas de la enfermedad donde se duda de la eficacia de estos anti-chagásicos o en situaciones particulares como embarazo o lactancia.

Pertenece esta responsabilidad a la toxicología genética como ciencia interdisciplinaria que pretende estudiar los mecanismos de acción de agentes que inducen mutaciones y estimar los riesgos de la exposición humana a los mismos.

A través de los resultados obtenidos en las experiencias realizadas, bajo las condiciones descriptas, se concluye que:

El BZ o sus metabolitos reactivos fueron capaces de interaccionar covalentemente "in vitro" con macromoléculas celulares, proteínas microsomas, ADN y proteínas nucleares.

El NFX, en ratones, en dos sistemas experimentales totalmente diferentes demostró tener efectos a nivel de material genético aumentando la formación de micronúcleos y de intercambio de cromátidas hermanas.

Estos resultados, sumados a los ya existentes, citados al comienzo de la discusión de este trabajo, reforzarían las hipótesis de que ambos fármacos no son inocuos.

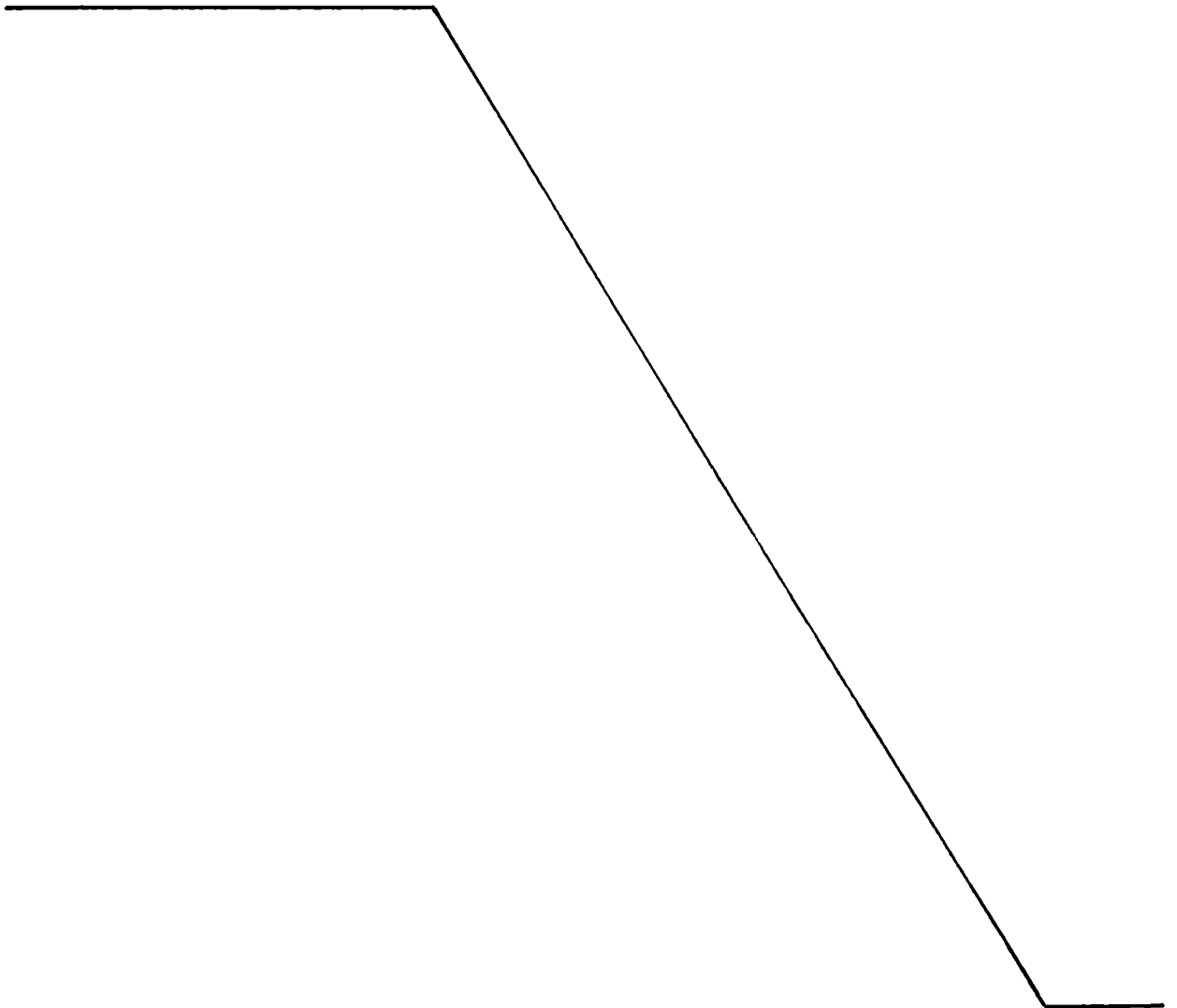
Además de los efectos tóxicos agudos en humanos que están documentados para el NFX y el BZ puede agregarse que potencialmente podrían presentar efectos crónicos tóxicos como son los efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos.

Al advertirse sobre la toxicidad aguda y potencialmente crónica del NFX y del BZ no se pretende proclamar el "no uso" de estos fármacos, sino sugerir que sean empleados con cautela y en las etapas clínicas de la enfermedad donde demuestren efectividad, contemplando claramente los riesgos en relación a los beneficios.

No habría que cesar en la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuti-

cos específicos de la enfermedad de Chagas, modificaciones de los existentes o en tratamiento combinados con otras sustancias para mejorar la acción contra esta endemia.

*Dr. Alberto Coz*



## BIBLIOGRAFIA

1. Abrahamson, S.; Lewis, E.B. (1971). The detection of mutations  
Drosophila melanogaster. En: Chemical mutagens Principles and  
methods for their detection. V.2, p.461. Ed.: Hollaender,  
Plenum Press, New York.
  
- Acha, P.N.; Sayfres, B. (1977). Zoonosis y enfermedades transmissi-  
bles comunes al hombre y a los animales. Organización Panaméri-  
cana de la Salud, Washington.
  
3. Allen, J.W.; Latt, S.A. (1976). Analysis of sister chromatid  
exchange formation in vivo in mouse spermatogonia as a new  
system for environmental mutagens. Nature 260: 449.
  
4. Ames, B.N.; Lee, F.; Durston, W. (1975). An improved bacterial test  
system for the detection and classification of mutagens and  
carcinogens. Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) 70: 782.
  
5. Ariëns, F.J.; Simonis, A.M.; Offermeier, J. (1976). Introduction  
to general toxicology.
  
6. Arlett, C.F.; Lehmann, A.R. (1978). Human disorders showing  
increased sensibility to the induction of genetic damage. Ann.  
Rev.Genet. 12: 95.
  
7. Armitage, P. (1982). The assessment of low-dose carcinogenicity.  
Biometrics supplement: Current topics in Biostatistics and  
Epidemiology, p. 119.
  
8. Aronson, M.M.; Miller, R.C.; Hill, R.B.; Nichols, W.W.; Meaduros,  
A.T. (1982). Acute and long-term cytogenetic effects of  
treatment in childhood cancer. Mutation Research 92: 191.

9. Barclay, C.A. (1977). Aspectos metodológicos para el estudio de la actividad quimioterápica y evaluación terapéutica del Benznidazol en la infección chagásica. Simposio sobre enfermedad de Chagas-Mazza, Buenos Aires.
10. Barclay, C.A. (1980). Evolución de la serología y parasitemia en pacientes con infección chagásica tratados con Benznidazol. *Folia Therapeutica* III, nº 14.
11. Barclay, C.A. (1977). Tratamiento con Benznidazol en las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas. *Rev. Neurol. Argent.* 5: 477.
12. Bartsch, H. (1980). Problems associated with the metabolic activation of carcinogens and mutagens in short-term tests. En: *Mechanisms of toxicity and hazard evaluation*, p.153. Elsevier/North Holland Biomedical Press.
13. Basler, A. (1982). SCE<sub>s</sub> in lymphocytes of rats after exposure in vivo to cigarette smoke or to cyclophosphamide. *Mutation Research* 102: 137.
14. Bender, M.A.; Griggs, H.G.; Bedford, J.S. (1974). Recombinational DNA repair and sister chromatid exchanges. *Mutation Research* 24: 117.
15. Bernacchi, A.; Castro, C.R.de; Castro, J.A. (1984). Efecto de distintos tratamientos sobre el daño testicular producido por el fármaco antichagásico Nifurtimox. III Congreso y IV Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología, Buenos Aires.
16. Berrill, N.J. (1943). Malignancy in relation to organization and differentiation. *Physiol.Rev.* 23: 101.



17. Bianchi, N.O.; Larramendy, M.L. (1983). The effects of incorporated tritium and bromodeoxyuridine on the frequency of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 88: 11.
18. Blobel, G.; Potter, V.R. (1966). Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science* 154: 1662.
19. Blumberg, W.E. (1978). Enzymic modification of environmental intoxicants: the role of cytochrome P-450. *Quarterly Reviews of Biophysics* 20: 481.
20. Boainnain, E. (1979). Tratamiento etiológico da doença de Chagas fase crônica. *Rev. Goiana de Medicina* 25: 1.
21. Bocca Tourres, C.L. (1969). La enfermedad de Chagas en período agudo y su tratamiento con el Bay 2502. *Bol.Chil.Par.* 24: 24.
22. Bock, M.; Gönnert, R.; Haberkorn, A. (1969). Studies with Bay 2502 on animals. *Bol.Chil.Par.* 24: 13.
23. Bock, M.; Haberkorn, A.; Herlinger, H.; Mayer, K.H.; Petersen, S. (1972). The structure-activity relationship of 4-(5'-nitrofurfuryl idene-amino)-tetrahydro-4H-1,4-thiazine-1,1-dioxides active against Trypanosoma cruzi. *Arzneim. Forsh (Drug Res.)* 22: 1564.
24. Bonet, A.H. (1972). Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Simp. Internac. sobre Enfermedad de Chagas*, p. 163. Buenos Aires.
25. Boyd, M.R.; Stiko, A.W.; Sasami, H.A. (1979). Metabolic activation of nitrofurantoin-possible implications for carcinogenesis. *Biochem. Pharmacol.* 28: 601.
26. Brener, Z. (1975). Chemotherapy of Trypanosoma cruzi infections. *Adv. Pharmacol.Ther.* 13: 1.

- Bresnick, E.; Eastman, A. (1982). Alkylation of Mammalian Cell DNA, persistence of Adducts, and relationship to carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews* 15: 189.
28. Bridges, B.A. (1976). Short-term screening tests for carcinogens. *Nature* 261: 195.
29. Brookes, P.; Lawley, V.R. (1977). Effects on DNA Chemical Methods En: Chemical mutagens, principles and methods for their detection. v.1, p.121. Ed.: Hollaender, A. Plenum Press, New York.
30. Brookes, P. (1966). Quantitative aspects of the reaction of some carcinogens with nucleic acids and the possible significance of such reactions in the process of carcinogenesis. *Cancer Research* 26: 1994.
31. Cançado, J.R.; Marra, U.D.; Lopes, M.; Mourão, O.; Franco Faria, C.A.; Alvares, J.M.; Abreu Salgado, A. (1969). Toxicidad y valor terapéutico del BAY 2502 en la enfermedad de Chagas crónica en tres esquemas posológicos. *Bol.Chil.Par.* 24: 28.
32. Cançado, J.R.; Salgado, A.de A.; Marra, U.D.; Alvares, J.M.; Machado, J.R. (1975). Ensaio terapêutico clínico na doença de Chagas crônica com o Nifurtimox em tres esquemas de duração prolongada. *Rev. Inst.Med.Trop. São Paulo* 17: 111.
33. Carpintero, D.J. (1985). Uso del ácido tióctico para la prevención de los efectos secundarios provocados por el Benznidazol en pacientes con infección de Chagas crónica. *Medicina* 45: 285.
34. Carrano, A.V.; Thompson, L.H.; Lindl, P.A., Minkler, J.L. (1978). Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271: 551.

35. Carrano, A.V.; Thompson, L.H. (1982). Sister chromatid exchange and gene mutation. *Cytogenet.Cell.Genet.* 33: 57.
36. Castro, J.; Gillette, J. (1967). Species and sex differences in the kinetic constants for the N-demethylation of ethyl-morphine liver microsomas. *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 28: 426.
37. Castro, J.A. (1983). Cánceres de origen medicamentoso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamer.* 17: 369.
38. Castro, J.A. (1984). Mechanistical studies and prevention of free radical cell injury. *Proceedings of the IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology*, 2: 243.
39. Castro, C.R.de; Bernacchi, A.; Díaz de Toranzo, G.; Castro, J.A. (1985 ). Estudios bioquímicos y ultraestructurales de la interacción de los antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol con el ovario de la rata. IV Congreso y V Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología, Río Cuarto (Córdoba).
40. Castro, G.D.; Castro, J.A. (1985 ). Studies on pentane evolution by rats treated with Nifurtimox or Benznidazole. *Toxicology* 35: 319.
41. Castro, J.A. (1985 ). Biotransformación de sustancias extrañas al organismo. Reacciones y enzimas involucradas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamer.* 19, 201.
42. Cattanaach, B.M. (1971). Specific locus mutation in mice. En: *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*, v.2, p.535. Ed.: Hollaender, A. Plenum Press, New York.
43. Cerisola, J.A. (1969). Evolución serológica de pacientes con enfermedad de Chagas aguda tratados con BAY 2502. *Bol.Chil.Par.* 24: 54.

- Cichero, J.A.; Segura, E.; Quatrochi, J.C. (1969). Evolución clínico-parasitológica y tolerancia a la droga de 55 niños con infección chagásica crónica tratados con BAY 2502. Bol.Chil.Par. 24: 59.
45. Cohen, S.M.; Ertürk, E.; Von Esch, A.M.; Crovetti, A.J.; Bryan, G.T. (1975). Carcinogenicity of 5-nitrofurans and related compounds with amino heterocyclic substituents. J.Natl.Cancer Inst. 54: 841.
46. Cohen, S.M.; Ertürk, E.; Von Esch, A.M.; Crovetti, A.J.; Bryan, G.T. (1975). Carcinogenicity of 5-nitrofurans, 5-nitroimidazoles, 4-nitrobenzenes and related compounds. J.Natl.Cancer Inst. 51: 405.
47. Committee 17 Council of the Environmental Mutagen Society. (1975). Environmental mutagenic hazards. Science 187: 505.
48. Conner, M.K.; Cheng, M.; Biegel, J.A. (1984). A path probability model for sister chromatid exchanges induced by alkylating agents. Mutation Research 126: 35.
49. Cooper, G.M. (1982). Cellular transforming genes. Science 217: 801.
50. Coutiño, E.R. (1980). Determinación de daño genético mediante el análisis de anafases en células en cultivo. En: Manual de Métodos para la identificación de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales, p.119. Instituto de Investigaciones Biomédicas, México.
51. Chagas, C. (1909). Nova Trypanosomiasi humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n.gen. n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1: 159.
52. Cheng, M.; Conner, M.K.; Alarie, Y. (1981). Potency of some carbamates

- as multiple tissue sister chromatid exchange inducers and comparison with known carcinogenic activities. *Cancer Research* 41: 4489.
53. Cheng, M.; Conner, M.K. (1982). Comparison of sister chromatid exchange induction and known carcinogenic activities of vinyl and allyl carbamates. *Cancer Research* 42: 2165.
54. Dain, L.; Migliorini, A.M.; Nagel, R. (1985). Estudio del efecto de dos drogas antichagásicas sobre cromosomas humanos. II Congreso y III Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología, Buenos Aires.
55. Darlington, C.D. (1948). The plasmagene theory of the origin of cancer. *Brit.J.Cancer* 2: 118.
56. De la Iglesia, F.A.; Lake, R.S.; Fitzgerald, J.E. (1980). Short-term tests for mutagenesis and carcinogenesis in drug toxicology: How to test and when to test is the question. *Drug Metabolism Reviews* 11: 103.
57. de Oliveira Ferreira, H. (1969). Comparación de la tolerancia medicamentosa de la nitrofurazona, la levofuraltadona (NF-602) y el BAY 2502. *Bol.Chil.Par.* 24, 101.
58. de Oliveira Ferreira, H. (1976). Ensaio terapêutico clínico com o Benzonidazol na doença de Chagas. *Rev.Inst. Med.Trop. São Paulo* 18:557.
59. De Serres, F.J.; Malling, H.V. (1971). Measurement of recessive lethal damage over the entire genome and at two specific loci in the ad-3 region of Neurospora crassa with a two-component heterokaryon. En: *Chemical mutagens: Principles and methods for their detection*, v.2, p.311. Ed.: Hollaender, A. y de Serres, F. J. Plenum Press, New York.

60. De Serres, F.J. (1976). Mutagenicity of chemical carcinogens. *Mutation Research* 41: 43.
61. de Weerd-Kastelein, E.A.; Keijzer, W.; Rainaldi, G; Bootsma, D. (1977). Induction of sister chromatid exchanges in Xeroderma pigmentosum cells after exposure to ultraviolet light. *Mutation Research* 45: 253.
62. Díaz Gómez, M.I.; Castro, J.A.; de Ferreyra, E.C.; D'Acosta, N.; Castro, C.R.de (1975). Irreversible binding of  $^{14}\text{C}$  from  $^{14}\text{CCl}_4$  to liver microsomal lipids and proteins from rats pretreated with compounds altering microsomal mixed function oxygenase activity. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 25: 554.
63. Di Carlo, F.J. (1982). Metabolism, pharmacokinetics and toxicokinetics defined. *Drug Metabolism Reviews* 15: 1.
64. Docampo, R.; Cruz, F.S.; Boveris, A.; Muniz, R.P.; Esquivel, D.M.S. (1978). Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion and hydrogen peroxide in B-Lapachone-treated Trypanosoma cruzi epimastigotes. *Archives Biochem. Biophys.* 186: 292.
65. Docampo, R.; Dubin, M.; Martino, E.E.; Moreno, S.N.J. (1983). Influencia del Nifurtimox sobre el contenido en glutatión del hígado y de la bilis en la rata. *Medicina* 43: 33.
66. Docampo, R.; Moreno, S.N.J.; Stoppani, A.O.M. (1981). Nitrofurán enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 207: 316.

67. Docampo, R.; Stoppani, A.M. (1979). Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by Nifurtimox in Trypanosoma cruzi. Arch. Biochem. Biophys. 197: 517.
68. Duhm, B.; Maul, W.; Medenwald, H.; Patzsche, K.; Wegner, L.A. (1972). Investigations on the pharmacokinetics of Nifurtimox- <sup>35</sup>S in rat and dog. Arzneim. Forsch. 22: 1617.
69. Dulout, F.N.; Pastori, M.C.; Olivero, O.A.; González Cid, M.; Loria, D.; Matos, E.; Sobel, N.; Bujan, E.C. de; Albiano, N. (1985). Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. Mutation Res. 145: 257.
70. Editorial. Bol.Chil.Par. (1969) 24: 1.
71. Ehling, U.H. (1977). Dominant lethal mutations in male mice. Arch. Toxicol. 38: 1.
72. Ejden, J. (1969). Efecto del BAY 2502 en adultos asintomáticos con infección chagásica crónica. Bol.Chil.Par. 24: 99.
73. Elías, Z.; Cavelier, C. (1982). Utilisation des tests de transformation cellulaire dans la détection des cancérogènes chimiques. Bull. du Cancer 69: 3.
74. Evans, H.J.; O'Riordan, M.L. (1977). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. En: Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
75. Fairlamb, A. (1982). Biochemistry of trypanosomiasis and rational approaches to chemotherapy. Trends in Biochemical Sciences 7: 249.

76. Favaudon, V. (1982). On the mechanism of reductive activation in the mode of action of some anticancer drugs. *Biochimie* 64: 457.
77. Fowler, A.K.; Hellman, A.; Steinman, H.G.; Quatralo, A.C. (1971). Studies on the blastogenic response of murine lymphocytes. I. Quantitative measurement of stimulation by Phytohemagglutinin (55895). *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 158, 345.
78. Fraser, F.C.; Nora, J.J. (1986). *Teratology. En: Genetics of Man.* Lea & Feabiger, Philadelphia.
79. Friedman, M.A.; Staub, J. (1976). Inhibition of mouse testicular DNA synthesis by mutagens and carcinogens as a potential simple mammalian assay for mutagens. *Mutation Research* 37: 67.
80. Gad, S.C.; Weil, C.S. (1982). *Statistics for toxicologists. En: Principles and methods of toxicology, p. 273.* Ed.: A. Wallace Hayes. Raven Press, New York.
81. Garfield, E. (1982). Risk analysis, Part 2. How we evaluate the health risks of toxic substances in the environment. *Current Comments. En: Current Contents n° 35, p.5.*
82. Generoso, W.M.; Cain, K.T.; Huff, S.W.; Gosslee, D.G. (1978). Heritable traslocation test in mice. *En: Chemical mutagens Principles and methods for their detection, v.5, p. 55.* Ed.: Hollaender, A. y de Serres, F.J. Plenum Press, New York.



83. Gillette, J.R. (1971). Reductive enzymes. En: Handbook of Experimental Pharmacology, 28: 549. Ed.: Brodie, B.B. and Gillette, J.R. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
84. Goldstein, A., Aronow, L.; Kalman, S.M. (1978 ). Carcinogénesis química. En: Farmacología, p. 785. Ed. Limusa, México.
85. Gönnert, R.; Bock, M. (1972 ) The effect of Nifurtimox on Trypanosoma cruzi in tissue cultures. *Arzneim.Forsch. (Drug Res.)* 22: 1582.
86. Gönnert, R. (1972 ). Nifurtimox: causal treatment of Chagas' disease. *Arzn.Forsch. (Drug Res.)* 22: 1563.
87. Gram, T.E.; Gillette, J.R. (1971). Biotransformation of drugs. En: Fundamentals of biochemical pharmacology, p.571. Eds.: Bacq, Z.M.; Capek, R.; Paoletti, R.; Renson, J. Pergamon Press, Oxford.
88. Gronow, M. (1980). Nuclear proteins and chemical carcinogenesis. *Chem. Biol. Interactions* 29: 1.
89. Guengerich, F.P.; Mac Donald, T.L. (1984). Chemical Mechanisms of catalysis by cytochromes P-450. A unified view. *Accounts of Chemical Research* 17: 9.
90. Gutteridge, W.E. (1976). Chemotherapy of Chagas' disease: The present situation. *Tropical Diseases Bull.* 73: 699.
91. Haber, F.; Weiss, J. (1934). *Proc. Royal Soc. London, Ser. A.*, 147: 332.
92. Haberkorn, A.; Gönnert, R. (1972). Animal experimental investigation into the activity of Nifurtimox against Trypanosoma cruzi. *Arzn. Forsch. (Drug Res.)* 22: 1570.

95. Hanawalt, P.C. (1977). DNA repair processes:An overview. En: DNA repair processes. Ed.: Nichols, W.N.; Murphy, D.G. Symposia Specialists Inc., USA.
94. Heddle, J.A.; Salamone, M.F. (1981). The micronucleus assay I. In vivo. En: Short term tests for chemical carcinogens. Ed.: Stich, H.F. and San, R.H.C. Springer Verlag, New York.
95. Hemminki, K. (1985). Nucleic acid adducts of chemicals carcinogens and mutagens. Arch. Toxicol. 52: 249.
96. Higginson, J. (1969) Present trends in cancer epidemiology. En: Canadian Cancer Conf., p.40. Ed.: J.F.Morgan. Pergamon Press, Oxford.
97. Hirsch, B.; Mc Gue, M.; Cervenka, J. (1984). Characterization of the distribution of sister chromatid exchange frequencies. Implications for research design. Human Genet. 65: 280.
98. Hite, M.; Skepps, H.; Noveroske, J.; Peck, H. (1976). Mutagenic evaluation of Ronidazole. Mutation Research 40: 289.
99. Hoffmann, K. (1972). Toxicological investigations on the tolerability of Nifurtimox. Arzn.Forsch. (Drug Res.) 22: 1590.
100. Hollstein, M.; Mc Cann, J.; Angelosanto, F.A.; Nichols, W.W. (1979). Short term tests for carcinogens and mutagens. Mutation Research 65: 133.
101. ICPEMC News n°1, (1978). International Commission for the protection against environmental mutagens and carcinogens. Mutation Research 54: 379.
102. Interagency Regulatory Liabison Group (1979). Scientific bases for identification of potencial carcinogens and estimation of risks.

J.Nat.Cancer Inst. 65: 241.

103. Jenssen, D.; Ramel, C. (1980). The micronucleus test as a part of short term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. Mutation Research 75: 191.
104. Jörg, M.E. (1974). Tripanosomiasis cruzi humana o enfermedad de Chagas-Mazza. Actualización de tratamientos, nº 380. Roche, Buenos Aires.
105. Kastenbaum, M.A.; Bowman, K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Research 9: 527.
106. Kato, H. (1973). Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine. Experimental Cell Research 82: 383.
107. Kim, J.H.; Chu, F.C.H. (1981). Chemical radiation sensitizers and protectors: Recent developments. Clinical Bull. 11: 5.
108. Lambert, B.; Bredberg, A.; Mc Kenzie, W.; Sten, M. (1982). Sister chromatid exchange in human populations: the effect of smoking, drug treatment, and occupational exposure. Cytogenet. Cell Genet. 33: 62.
109. Laplumé, H.; Barousse, A.P.; Cabrera, H. (1982). Efectos indeseables de Nifurtimox y Benznidazol. Medicina 42: 223.
110. Latt, S.A. (1973). Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 70: 3395.
111. Latt, S.A.; Schreck, R.R. (1980). Sister chromatid exchange analysis.

Am.J.Hum.Genet. 52: 297.

112. Legator, M.S.; Connor, T.H.; Stoeckel, M. (1975). Detection of mutagenic activity of metronidazole and Niridazole in body fluids of human and mice. *Science* 188: 1118.
113. Legator, M.S.; Rinkus, S.J. (1981). Mutagenicity testing: Problems in application. En: Short term tests for chemical carcinogens, p. 483. Ed.: Stich, H.F. and San, R.H.C. Springer Verlag, New York.
114. Levi, G.C.; Amato Neto, V.; Sant'Anna, I.F. de A.B. (1975). Análise de manifestações colaterais devidas ao uso do medicamento Ro 7-1051 Nitroimidazólico preconizado para tentativas de tratamento específico da doença de Chagas. *Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo* 17: 49.
115. Litter, M. (1978). Qué se espera de una droga antichagásica. Simposio sobre Enfermedad de Chagas-Mazza. Buenos Aires.
116. Litter, M. (1980). Quimioterapia de la Tripanosomiasis. En: Farmacología experimental y clínica, Cap.53, p.1776. El Ateneo, Buenos Aires.
117. Livingston, G.K.; Fineman, R.M. (1983). Correlation of human lymphocyte SCE frequency with smoking history. *Mutation Research* 119: 59.
118. Lorke, D. (1972). Embryotoxicity studies of Nifurtimox in rats and mice and study of fertility and general reproductive performance. *Arzneim. Forch. (Drug Res.)* 22: 1603.
119. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193: 265.

120. Lu, A.Y.H. (1979). Multiplicity of liver drug metabolizing enzymes. *Drug Metabolism Reviews* 10: 187.
121. Lugones, H.S.; Peralta, F.; Canal Feijóo, D.; Marteleur, A.E.A. de (1969). Evolución de la sintomatología clínica y la función hepática en la enfermedad de Chagas aguda tratada con BAY 2502. *Bol. Chil.Par.* 24: 19.
122. Lugones, H.S. (1978). Tratamiento de la enfermedad de Chagas aguda con Benznidazol. Simposio sobre Enfermedad de Chagas-Mazza. Buenos Aires.
123. Lutz, W.K.; Schlatter, C. (1979). In vivo covalent binding of chemicals to DNA as a short-term test for carcinogenicity. *Arch.Toxicol. Suppl.* 2, 411.
124. Magee, P.N.; Pegg, A.E.; Swan, P.F. (1975). Molecular mechanisms of chemical carcinogenesis. En: *Hanbuch der allgemeinen Pathologie*. Springer Verlag, Berlin.
125. Majone, F.; Montaldi, A.; Ronchese, F.; De Rossi, A.; Chieco-Bianchi, L.; Levis, A.G. (1985). Sister chromatid exchange induced in vivo and in vitro by chemical carcinogens in mouse lymphocytes carrying endogenized Moloney leukemia virus. *Carcinogenesis* 4: 55.
126. Marra, U.D. (1969). Comparación de la tolerancia medicamentosa de la nitrofurazona, levofuraltadona y el preparado BAY 2502. *Bol.Chil. Par.* 24: 38.
127. Masana, M.; Toranzo, E.G.D. de; Castro, J.A. (1984 a). Reductive metabolism and activation of Benznidazole. *Biochem.Pharmacol.* 33: 1041.
128. Masana, M.; Toranzo, E.G.D.de; Castro, J.A. (1984 b). Studies on

Nifurtimox nitroreductase activity in liver and other rat tissues.  
Arch.Internat.Pharmacodyn.Thér. 270: 4.

129. Masana, M.I.; Rubio, M.C. (1985). Effect of trypanosomicide benznidazole on varios enzymatic systems. Medicina 45: 525.
130. Masana, M.; Toranzo, E.G.D. de; Rubio, M.; Castro, J.A. (1985). Effect of Benznidazole on the mixed function oxygenase system from rat liver microsomes. Arch.Internat.Pharmacodyn.Thér., in press.
131. Matter, B.; Schmid, W. (1971). Trenimon induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micro-nucleus test. Mutation Research 12, 417.
132. Maugh, T.H. (1978). Chemicals: How many are there? Science 199, 162.
133. Mc Calla, D.R. (1981). Metabolic activation of nitroheterocyclic compounds in bacteria and mammalian cells. En: Short-term tests for chemical carcinogens, p.36. Ed.: Stich, H.F. and San, R.H.C. Springer Verlag, New York.
134. Mc Calla, D.R.; Voutsinos, D. (1974). On the mutagenicity of nitrofurans. Mutation Research 26: 3.
135. Mc Cann, J.; Ames, B.N. (1976). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella microsome test: assay of 300 chemicals. Discussion. Proc.Natl.Acad.Sci USA 73: 950.
136. Mc Cann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; Ames, B.N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Natl.Acad.Sci.USA, 72: 5135.
137. Medenwald, H.; Brandan, K.; Schlossmann, K. (1972). Arzneim.Forsch. (Drug Res.) 22: 1613.

138. Medicina y Salud. (1981). Enfermedad de Chagas-Mazza. Serie 2, nº 9. Buenos Aires.
139. Miller, J.A. (1970). Carcinogenesis by chemicals: An Overview. G.H.A.Clowes Memorial Lecture. Cancer Research 30: 559.
140. Mitchard, M. (1971). Bioreduction of organic nitrogen. Xenobiotica 1: 469.
141. Montesano, R.; Slaga, T.J. (1985). Initiation and promotion in carcinogenesis: An appraisal. Cancer Surveys 2: 613.
142. Moorhead, P.S.; Nowell, P.C.; Mellman, W.J.; Battips, D.M.; Hungerford, D.A. (1960). Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. Exp.Cell Res. 20: 613.
143. Morales Ramírez, P. (1980). Analysis in vivo of sister chromatid exchange in mouse bone-marrow and salivary gland cells. Mutation Research 74: 61.
144. Moreau, P.; Bailone, A., Devoret, R. (1976). Prophage  $\lambda$  induction in Escherichia coli, K 12 envA uvrB: a highly sensitive test for potential carcinogens. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 73: 5700.
145. Moreno, S.N.J.; Docampo, R.; Mason, R.P.; Leon, W.; Stoppani, A.O.M. (1982). Different behaviors of Benznidazole as free radical generator with mammalian and Trypanosoma cruzi microsomal preparations. Arch. Biochem. Biophys. 218: 585.
146. Moreno, S.N.J.; Docampo, R.; Stoppani, A.O.M. (1985). Sobre efectos indeseables del Benznidazol y el Nifurtimox. Medicina 43: 291.
147. Moreno, S.N.J.; Palmero, D.J.; Palmero, K.E. de; Docampo, R.; Stoppani, A.O.M. (1980). Estimulación de la peroxidación lipídica y alteraciones ultraestructurales inducidas por Nifurtimox en tejidos de mamíferos. Medicina 40, 553.

148. Morris, J.E.; Price, J.M.; Lalich, J.J.; Stein, R.J. (1969). The carcinogenic activity of some 5-nitrofurán derivatives in the rat. *Cancer Res.* 29, 2145.
149. Mortimer, R.K.; Manney, T.R. (1971). Mutation in yeast. En: *Chemical Mutagens; Principles and methods for their detection.* v.1, p.289. Ed.: Hollaender, A. Plenum Press, New York.
150. Nagao, M.; Sugimura, T.; Matsushima, T. (1978). Environmental Mutagens and Carcinogens. *Ann.Rev. Genet.* 12, 117.
151. Nagel, R.; Nepomnaschy, I. (1985). Mutagenicity of 2 anti-chagasic drugs and their metabolic deactivation. *Mutation Research* 117, 257.
152. Nava, C.C. de; Wegman, P.O. de; Galvan, S. (1980). Principios de mutagénesis y su relación con carcinogénesis y teratogénesis. En: *Manual de métodos para la identificación de Mutágenos y Carcinógenos Químicos Ambientales*, pag. 1. Instituto de Investigaciones Biomédicas, México.
153. Navarro, M.L.; Dain, L.; Migliorini, A.N.; Nagel, R. (1984 a). Clastogenic activity of two antichagasic drugs. *Comunicaciones biológicas* 3, 25.
154. Navarro, M.L.; Nagel, R. (1984 b). Sperm-head abnormalities in mice induced by two antichagasic drugs. *Comunicaciones biológicas* 3, 29.
155. Nichols, W.W.; Knudson, A.G.; Siminovitch, L. (1982). Cytogenetics and somatic cell genetics of malignancy workshop. *Journal Natl. Cancer Institute* 69, 543.
156. Nowell, P.C. (1960). Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20; 462.
157. O'Connor, P.J. (1981). Interaction of Chemical Carcinogens with Macromolecules. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 99, 167.



158. Ohnishi, T.; Ohashi, Y.; Nozu, K.; Inoki, S. (1980). Mutagenicity of Nifurtimox in Escherichia coli. *Mutation Research* 77, 241.
159. Olive, P.L.; Mc Calla, D.R. (1977). Cytotoxicity and DNA damage in mammalian cells by nitrofurans. *Chem.Biol.Interact.* 16: 225.
160. Organización Mundial de la Salud (1960). Enfermedad de Chagas. Serie de Informes Técnicos nº 202. Ginebra.
161. Packchanian, A. (1957). Chemotherapy of experimental Chagas disease with Nitrofuran Compounds. *Antibiot. and Chemother.* 7, 15.
162. Painter, R.B. (1981). DNA Synthesis Inhibition in Mammalian Cells as a Test for Mutagenic Carcinogens. En: Short-Term Tests for Chemical Carcinogens, pag.59. Ed.: Stich, H.F. and San, R.H.C. Springer Verlag, New York.
163. Painter, R.B. (1977). Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature* 265, 650.
164. Pellmont, B. (1969). Extended acute toxicity study in mice and rats after intraperitoneal and oral administration of R0 7-1051. Departamento de Investigaciones, F.Hoffman-La Roche & Co. Basilea.
165. Perry, P.; Woltt, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156.
166. Pinto Dias, J.C. (1984). Enfermedad de Chagas. Epidemiología - Clínica- Terapéutica. Programa de Salud Humana. Buenos Aires.
167. Polak, A.; Richle, R. (1978). Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 72, 45.

168. Programa de Salud Humana (1983). Normas para atención médica del infectado chagásico. Buenos Aires.
169. Public Health Reports Supplement (1983). Public Health Service implementation plans for attaining the objectives of the nation: Toxic agent and radiation control, U.S. Dept of Health and Human Services, PHS, Washington.
170. Purchase, J.F.H.; Longstaff, E.; Ashby, J.; Styles, J.A.; Anderson, D.; Lefevre, P.A.; Westwood, F.R. (1978). An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. Br. J.Cancer 37, 873.
171. Purchase, I.F.H.; Longstaff, E.; Ashby, J.; Styles, J.A.; Anderson, D.; Lefevre, P.A.; Westwood, F.R. (1976). Evaluation of six short-term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use. Nature 264, 624.
172. Raffetto, G.; Parodi, S.; Faggini, P.; Maconi, A. (1979). Relationship between cytotoxicity and induction of sister chromatid exchanges in mouse foetal cells exposed to several doses of carcinogenic and non-carcinogenic chemicals. Mutation Research 63, 335.

173. Rajagopalan, K.V. (1980). Xanthine oxidase and aldehyde oxidase. Enzymatic basic of detoxication. Ed.: Jacoby, W.B. Academic Press. New York.
174. Rhodin, J.A.G. (1974). Blood cell formation. En: Histology, pag.111. Ed.: Rhodin, J.A.G. Oxford University Press, New York.
175. Richle, R. (1973). Chemotherapy of experimental acute Chagas' disease in mice; beneficial effect of R0 07-1051 on parasitaemia and tissue parasitism. Le Progrès Méd. 101: 282.
176. Roper, J.A. (1971). Aspergillus. En: Chemical Mutagens. Principles and Methods for their detection, v.2, pag.343. Ed.: Hollaender, A. Plenum Press, New York.
177. Russell, W.L. (1977). The role of mammals in the future of Chemical Mutagenesis Research. Arch.Toxicol.38, 141.
178. Rustia, M.; Shubik, P. (1972). Induction of lung tumor and malignant lymphomas in mice by metronidazole. J.Natl.Cancer Institute 48, 721.
179. Sasaki, M.S. (1977). Sister chromatid exchange and chromatid interchange as possible manifestation of different DNA repair processes. Nature 269, 623.
180. Scheline, R.R. (1975). Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganism. Pharmacol.Rev. 25, 451.

181. Schenone, H.; Concha, L.; Aranda, R.; Rojas, A.; Alfaro, E. (1969).  
Experiencia terapéutica con el BAY 2502 en la infección chagásica crónica del adulto. Importancia del uso adecuado del xenodiagnóstico. Bol.Chil.Par. 24, 66.
182. Schenone, H.; Concha, L.; Aranda, R.; Rojas, A.; Kierim, F.; Rojo, M. (1982). Tratamiento de la infección chagásica crónica con Lampit. Biol.Clin.Parasitol. 27, 11.
183. Schmid, W. (1976 a). Mutagen/Carcinogen induced chromosome damage in human and mammalian cells "in vivo" and "in vitro". Proceedings of the Fifth International Congress of Human Genetics. Mexico.
184. Schmid, W. (1976 b). The Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis. En: Chemical Mutagens. Principles and Methods for their detection. V.4, pag.31. Ed. Hollaender, A. Plenum Press. New York.
185. Schmid, W. (1977). The Micronucleus Test. En: Handbook of Mutagenicity Test procedures, pag.235. Ed.: Kilbey et al. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
186. Seiler, J. P. (1981). Testicular DNA synthesis inhibition. An In Vivo system for the detection of mutagenic and carcinogenic chemicals. En: Toxicological and Environmental Chemistry, pag.239. Gordon & Breach Science Publishers Inc., Great Britain.
187. Shubik, P. (1985). Objective of carcinogenicity testing. Fundamental and Applied Toxicology 5, 137.

188. Sierra Iglesias, J.P.; Sierra Guzmán, J.C. (1979). Nuestra experiencia en tratamientos de pacientes chagásicos con la droga Benznidazol. Resúmenes del II Simposio Interracional de Enfermedad de Chagas. Buenos Aires.
189. Sierra, J.P. (1978). Semblanza de Salvador Mazza. Simposio sobre Enfermedad de Chagas-Mazza. Buenos Aires.
190. Singer, B. (1985). Mutagenic effects of Nucleic Acid Modification and repair assessed by in vitro transcription. En: Induced Mutagenesis, pag.1. Ed.: Lawrence, C.W. Plenum Publishing Corp., Washington.
191. Sobels, F.H. (1977). Some problems associated with the testing for environmental mutagens and a perspective for studies in "comparative mutagenesis". Mutation Research 16, 245.
192. Sono, A.; Sakaguchi, K. (1981). Inhibition of protein synthesis antagonizes induction of sister chromatid exchanges by exogenous agents. Mutation Research 80, 121.
193. Spanó, M.A.; Takahashi, C.S. (1981). Genetic effects of Nifurtimox on Drosophila melanogaster, Wistar rats and Allium cepa. Rev.Brasil. Genet. IV, 3, 357.
194. Steele, W.J.; Busch, H. (1965) Studies on Acidic Nuclear Proteins of the Walker Tumor and Liver. Cancer Research 25, 1155.
195. Steinhoff, D.; Grundmann, E. (1972). Test for carcinogenicity of Nifurtimox on oral and subcutaneous administration to rats. Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 22, 1607.
196. Stich, H.F.; San, R.H.C.; Freeman, H.J. (1981). DNA repair synthesis

- (UDS) as an in vitro and in vivo Bioassay to Detect Precarcinogens Ultimate carcinogens and organotropic carcinogens. En: Short-term Tests for Chemicals carcinogens, pag.65. Ed. Stich, H.F. and San, R.H.C. Springer-Verlag, New York.
197. Stoltz, D.R.; Poirier, L.A.; Irving, C.C.; Stich, H.F.; Weisburger, J. H.; Grice, H.C. (1974). Review article: Evaluation of short-term tests for Carcinogenicity. *Toxicol. and Applied Pharmacology* 29, 157.
198. Stoppani, A.O.M; Docampo, R.; Moreno, S.N.J. (1981). Bases bioquímicas de la Terapéutica Antichagásica. *Rev. de la Asoc. Méd. Argentina* 94 175.
199. Sugimura, T. (1982). Mutagens, Carcinogens and Tumor Promoters in our Daily Food. *Cancer* 49, 1970.
200. Suzuki, N.; Okada, S. (1976). Isolation of nutrient deficient mutants and quantitative mutation assay by reversion of alanine requiring L 5178 Y cells. *Mutation Research* 54, 489.
201. Swaminathan, S.; Ertürk, E.; Bryan, G.T. (1981). Mutagenicity, carcinogenicity, distribution and nitroreduction of N-(5-nitro-2-furyl)thiazole in the rat. *Cancer Research* 41, 2648.
202. Swann, P.F.; Magee, P.N. (1968) Nitrosamine induced carcinogenesis, dimethylnitrosamine, dimethylsulphate and methylmethasulphonate. *Biochem.J.* 110, 39.
203. Swenberg, J.A. (1981). Utilization of the Alkaline elution assay as a Short-Term Test for Chemical Carcinogens. En: Short-Term Tests for Chemical Carcinogens, pag.48. Ed.: Stich, H.F. and San, R.H.C. Springer-Verlag, New York.

204. Taylor, J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes. *Genetics* 43, 515.
205. Tchoulamjan, A. (1978). Criterios de curación en la Enfermedad de Chagas-Mazza. Simposio sobre Enfermedad de Chagas-Mazza. Buenos Aires.
206. Thompson, L.H.; Harkins, J.L.; Stanners, C.P. (1973). A mammalian cell mutant with a temperature sensitive leucyl-transfer RNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70, 3094.
207. Tonomura, A.; Sasaki, M. (1973). Chromosome aberrations and DNA repair synthesis in cultured human cells expose to nitrofurans. *Jpn. J. Genet.* 48, 291.
208. Toranzo, E.G.D. de; Masana, M.; Castro, J.A. (1984). Administration of Benznidazole, a chemotherapeutic agent against Chagas' disease to pregnant rats. Covalent binding of reactive metabolites to fetal and maternal proteins. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 272, 17.
209. Toranzo, E.G.D. de; Masana, M.; Castro J.A. (1985). Nitroreduction of Benznidazole and Nifurtimox by rat and human feces. *Research Communications in Chemical Phatol.and Pharmacol.*41, 341.
210. Tsanev, R.; Hadjiolov, D. (1978). Chromosomal proteins in hepato carcinogenesis. *Z.Krebsforsch.* 91, 237.
211. Van den Bossche, H. (1978). Chemotherapy of parasitic infections. *Nature* 273, 626.
212. Vaught, J.; Bresnick, E. (1976). Binding of polycyclic hydrocarbons to nuclear components in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 69, 587.

213. Voigt, W.H.; Bock, M.; Gönner, R. (1972). Ultrastructural observations on the activity of Nifurtimox on the causative organism of Chagas' disease. *Arzneim.Forsch. (Drug Res.)* 22, 1586.
214. Voogd, C.E. (1981). On the mutagenicity of Nitroimidazoles. *Mutation Research* 86, 243.
215. Voogd, C.E.; Van der Stel, J.J.; Jacobs, J.A. (1975). The mutagenic action of nitroimidazoles II. Effects of 2-nitroimidazoles. *Mutation Research* 31, 149.
216. Wang, C.Y.; Behkens, B.C.; Ichikawa, M.; Bryan, G.T. (1974). Nitro reduction of 5-nitro-furan derivatives by rat liver xanthine oxidase and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c-reductase. *Biochem.Pharmacol.* 23, 3395.
217. Wang, C.; Croft, W.; Bryan, G.T. (1984). Tumor production in germ free rats fed 5-nitrofurans. *Cancer Letters* 21, 303.
218. Wegner, D.H.G.; Rohwedder, R.W. (1972 a). Experience with Nifurtimox in chronic Chagas' Infection. *Arzneim.Forsch. (Drug Res.)* 22, 1635.
219. Wegner, D.H.G.; Rohwedder, R.W. (1972 b). The effect of Nifurtimox in acute Chagas' Infection. *Arzneim.Forsch. (Drug Res.)* 22, 1624.
220. World Health Organization (1981). Workshop on guidelines for standardized protocols for the chemotherapy of Chagas' disease. TDR/CHEMCHA DC WHSHP 81.3 Washington, D.C.
221. Wintersberger, U (1982). Chemical carcinogenesis. The price for DNA repair? *Naturwissenschaften* 69, 107.
222. Wolff, S.; Bodycote, J.; Painter, R.B. (1974). Sister chromatid exchanges induced in chinese hamster cells by U.V. irradiation of



different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. Mutation Research 25, 73.

223. Wolff, S. (1977). Sister chromatid exchange. Ann.Rev.Genet. 11, 185.
224. Wolff, S. (1979). Sister chromatid exchange: the most sensitive mammalian systems for determining the effects of mutagenic carcinogens. En: Genetic Damage in Man caused by environmental agents. Ed.: Berg, K. pag.229. Academic Press.
225. Wulf, H.C.; Husum, B., Plesner, A.M.; Niebuhr, E. (1984). Distribution of SCEs in lymphocytes in persons with normal, slightly increased, and heavily increased SCEs. Mutation Research 125, 263.
226. Wyrobek, A.J.; Bruce, W.R. (1978). The induction of sperm-shape abnormalities in mice and humans. En: Chemical Mutagens. Principles and Methods for their detection. v.5, pag. 257. Ed.: Hollaender, A.; de Serres, F.J. Plenum Press, New York.
227. Yager, J.W.; Benz, R.D. (1982). Sister chromatid exchanges induced in rabbit lymphocytes by ethylene oxide after inhalation exposure. Environmental Mutagenesis 4, 121.
228. Yahagi, T.; Matsushima, M.; Nagao, M.; Seino, Y.; Sugimura, T.; Bryan, G.T. (1976). Mutagenicities of Nitrofurantoin derivatives on a bacterial tester strain with an R factor plasmid. Mutation Research 40, 9.
229. Yoneda, S.; Kimura, E.; Ribas Castellani, B. (1977). Some observations on the effect of RO 7-1051 on Trypanosoma cruzi, particularly in cell culture. Experientia 33, 1201.
230. Zakharov, A.F.; Egolina, N.A. (1972). Differential spiralisation along mammalian mitotic chromosomes, 1, BUdR revealed differentiation

in chinese hamster chromosomes. *Chromosoma* 38, 341.

231. Zeledón, R.; Rabinovich, J.E. (1981). Chagas' disease: An Ecological Appraisal with special emphasis on its Insect Vectors. *Ann. Rev. Entomol.* 26, 101.
232. Ziegler, D.M. (1980). Microsomal Flavin-containing Monooxygenase: Oxygenation of nucleophilic Nitrogen and Sulfur compounds. *En: Enzymatic basis of detoxication*, pag. 201. Ed.: Jacoby, W.B. Academic Press, New York.