

Tesis de Posgrado

Metabolismo hepático del nifurtimox, un nitrofurano antichagásico

Carrizo, Patricia H.

1995

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. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Carrizo, Patricia H.. (1995). Metabolismo hepático del nifurtimox, un nitrofurano antichagásico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2802_Carrizo.pdf

Cita tipo Chicago:

Carrizo, Patricia H.. "Metabolismo hepático del nifurtimox, un nitrofurano antichagásico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2802_Carrizo.pdf

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Centro de Investigaciones Bioenergéticas (CONICET)

METABOLISMO HEPÁTICO
DEL NIFURTIMOX,
UN NITROFURANO ANTICHAGÁSICO

TESIS

presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Autor: Lic. Patricia Hebe Carrizo.

Director: Prof. Dr. Andrés O. M. Stoppani.

Co-director: Dra. Marta Dubin.

Consejero de Estudios: Dra. Ana María Stella.

- 1995 -

N. J. 2

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi reconocimiento a todos aquellos cuya colaboración posibilitó la realización de este trabajo de Tesis:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por los medios económicos otorgados que hicieron posible el desarrollo de los estudios que aquí se describen y mi dedicación a la investigación científica.

Al Dr. Andrés O. M. Stoppani, por su apoyo y por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis bajo su dirección en el Centro de Investigaciones Bioenergéticas.

A la Dra. Marta Dubin, con quien hemos compartido tantas horas en el laboratorio y muchos momentos más.

A la Dra. Ana María Stella, por su afecto, colaboración y consejos.

Al Dr. Joaquín Cannata, por su participación en el análisis cinético.

A la Dra. Amanda Pellegrino de Iraldi y Pablo Corazza, por su colaboración en la realización e interpretación de las imágenes de microscopía electrónica.

Al Dr. Eduardo Gross, por su colaboración en el análisis de la espectrometría de masa de los metabolitos de la reducción del nifurtimox.

A Pilar y a Silvia, por su afecto, comprensión, generosidad, estímulo y aporte desinteresado de ideas y colaboración personal.

A mis compañeros del CIBIERG: Alejandra, Cristinita, Claudia, Ana María, Esther, Juan, José, Cristina, Miguel, Daniel y Dante, quienes no sólo hicieron grato mi trabajo en el laboratorio, sino que me brindaron su cariño, solidaridad y todos los momentos agradables que pasamos juntos.

A Graciela y a Sara, por su constante colaboración.

A mi familia, por su incondicional apoyo.

Parte de los resultados aquí presentados fueron publicados o presentados en Congresos y Reuniones Científicas según se detalla:

- Effect of 5-nitroindole on adenylate energy charge, oxidative phosphorylation, and lipid peroxidation in rat hepatocytes.
Biochemical Pharmacology 48: 1483-1492, 1994.
Marta Dubin, Patricia H. Carrizo, Ana M. Biscardi, Silvia H. Fernández Villamil y Andrés O. M. Stoppani.

- El citocromo P450 no participa en la reducción microsomal del nitrofurano antichagásico nifurtimox.
XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB).
Huerta Grande, Córdoba, 18-21 de noviembre de 1992.
P.H. Carrizo, J.I. Young y A.O.M. Stoppani.

- Metabolismo reductivo de nitrofuranos en microsomas hepáticos.
XXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE).
Buenos Aires, 23-25 de noviembre de 1992.
P.H. Carrizo, J.I. Young y A.O.M. Stoppani.

- Efecto del 5-nitroindol sobre la carga energética de adenilatos en hepatocitos.
XXIX Reunión Nacional de SAIB.
Villa Carlos Paz (Córdoba) 17-20 de noviembre de 1993.
M. Dubin, P.H. Carrizo, A.M. Biscardi, S.H. Fernandez Villamil y A.O.M Stoppani.

- Effect of 5-nitroindole on adenylate energy charge, oxidative phosphorylation and lipid peroxidation in rat hepatocytes.
XIV Congreso Latinoamericano de Farmacología.
Chile, 20 al 24 de noviembre de 1994
M. Dubin, P.H. Carrizo, A.M. Biscardi, S.H. Fernandez Villamil and A.O.M. Stoppani.

ABREVIATURAS

AADP	3-aminopiridina adenina dinucleótido fosfato
Cat	Catalasa
Clotrimazol	1-[(2-clorofenil)-difenilmetil]-1 <i>H</i> -imidazol
Co-Proto	Cobalto(III)-Protoporfirina IX
DETAPAC	Ácido dietilen-triamino-pentaacético
DMFA	<i>N,N</i> -dimetilformamida
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetiléter)- <i>N,N'</i> -tetraacético
FCCP	Cianocarbonil-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GOx	Glucosa oxidasa
GP	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación (forma reducida)
GSSG	Glutación (forma oxidada)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperacín-etan-sulfónico
LDH	Láctico deshidrogenasa
MDA	Malondialdehído
Metimazol	1-metil-2-mercaptoimidazol
MGM	L-malato-L-glutamato-malonato
Microsomas Control	Microsomas aislados de ratas que recibieron el vehículo de las drogas
Microsomas Co-proto	Microsomas aislados de ratas previamente tratadas con Co-proto
Microsomas CoCl ₂	Microsomas aislados de ratas previamente tratadas con CoCl ₂
Microsomas Metimazol	Microsomas aislados de ratas previamente tratadas con Metimazol
MOPS	Ácido 4-morfolino-propano-sulfónico
NF	(5-nitrofurfuriliden)amino
NF-pirazol	1-[NF]-pirazol

NF-triazol	4-[NF]-1,2,4-triazol
NFA	Nitrofurantoína
NFX	Nifurtimox
NFZ	Nitrofurazona
NI	5'-nitroindol
Nifurtimox	Tetrahidro-3-metil-4-[NF]-2 <i>H</i> -1,4-tiacina-1,1-dióxido
Nitrofurantoína	<i>N</i> -(5-nitro-2-furfuriliden)-1-aminohidantoína
Nitrofurazona	5-nitro-2-furaldehído semicarbazona
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -butilhidroperóxido
TCA	Ácido tricloroacético

ÍNDICE

Pág.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La enfermedad de Chagas	1
1.1.1. Características	1
1.1.2. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas	2
1.1.3. Mecanismo de acción de los agentes terapéuticos contra el <i>T. cruzi</i>	7
1.1.3.1. Efectos adversos del NFX " <i>in vitro</i> "	10
1.1.3.2. Efectos tóxicos del NFX y del benznidazol en el huésped mamífero	13
1.2. Especies reactivas del oxígeno (ERO)	15
1.2.1. Generación y metabolismo de las ERO	18
1.2.2. Peroxidación de lípidos	21
1.2.3. Estrés oxidativo	24
1.2.4. Sistemas de protección contra el estrés oxidativo	24
1.2.4.1. Sistemas enzimáticos	25
1.2.4.2. Sistemas no-enzimáticos	27
1.3. Nitrocompuestos heterocíclicos	29
1.3.1. Características	29
1.3.2. Metabolismo	30
1.4. Sistema mono-oxigenasa de función mixta.	35
1.4.1. NADPH-citocromo P-450 reductasa	37
1.4.2. Citocromo P-450	39
1.4.3. Factores de regulación	41
1.5. Objetivos	45

2. MATERIALES

2.1. Animales de experimentación	46
2.2. Reactivos	46

3. MÉTODOS

3.1. EN MICROSOMAS HEPÁTICOS	48
3.1.1. Tratamiento previo de los animales	48

3.1.1.1. Tratamiento con Co-proto48
3.1.1.2. Tratamiento con CoCl_248
3.1.1.3. Tratamiento con Metimazol49
3.1.2. Obtención de microsomas hepáticos49
3.1.3. Actividades y contenidos enzimáticos.50
3.1.3.1. Contenido de citocromo P-450.50
3.1.3.2. Contenido de citocromo b_551
3.1.3.3. Actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa51
3.1.3.4. Actividad NADH-citocromo b_5 reductasa52
3.1.3.5. Peroxidación de lípidos52
3.1.3.6. Consumo de oxígeno.54
3.1.3.7. Generación de anión superóxido54
3.1.3.8. Formación de peróxido de hidrógeno55
3.1.4. Reducción microsomal del NFX56
3.1.4.1. Efecto de la concentración de nitrofurano56
3.1.4.2. Efecto de la concentración de proteína microsomal.57
3.1.4.3. Efecto de la anaerobiosis.57
3.1.4.4. Efecto de la inactivación del citocromo P-45058
3.1.4.5. Efecto de los inhibidores de la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa y del citocromo P-45058
3.1.4.5.1. Clotrimazol58
3.1.4.5.2. Aminopiridina adenina dinucleótido fosfato (AADP)59
3.1.5. Aislamiento y caracterización de los productos de la reducción microsomal del NFX60
3.1.5.1. Espectros de absorción.60
3.1.5.2. Detección de aminas60
3.1.5.3. Cromatografía en placa delgada61
3.1.5.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)62
3.1.5.5. Espectrometría de masa63
3.2. EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS64
3.2.1. Preparación de mitocondrias64
3.2.2. Medida de la velocidad de respiración64
3.2.3. Determinación del aumento del volumen mitocondrial65
3.2.4. Estado redox de los citocromos66

3.2.5. Actividad ATPasa latente67
3.2.6. Peroxidación de lípidos67
3.2.7. Microscopía electrónica68
3.3. EN CÉLULAS HEPÁTICAS70
3.3.1. Aislamiento de hepatocitos70
3.3.2. Determinación de la viabilidad celular.71
3.3.2.1. Ensayo de exclusión del azul de Tripán.72
3.3.2.2. Liberación de la actividad LDH al medio extracelular72
3.3.3. Incubación de hepatocitos en aerobiosis74
3.3.4. Determinación de los parámetros bioquímicos celulares.74
3.3.4.1. Niveles de adenín nucleótidos, relación ATP/ADP y balance energético74
3.3.4.2. Peroxidación de lípidos77
3.3.4.3. Consumo de oxígeno.78
3.3.5. Incubación de los hepatocitos en anaerobiosis79
3.3.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)79
3.4. Determinación de proteínas81
3.5. Análisis estadístico81

RESULTADOS y DISCUSIÓN

4. METABOLISMO MICROSOMAL HEPÁTICO DE LOS NITROFURANOS82
4.1. Contenido de citocromos y actividades enzimáticas microsomales84
4.2. Consumo de oxígeno y generación de anión superóxido87
4.3. Producción de peróxido de hidrógeno93
4.4. Peroxidación de lípidos inducida por NADPH-Fe95
4.5. Reducción del nifurtimox por microsomas hepáticos.96
4.5.1. Efecto de la concentración de NFX.98
4.5.2. Efecto de la concentración de proteína microsomal	101
4.5.3. Requerimiento de cofactor enzimático	104
4.5.4. Efecto de inhibidores " <i>in vivo</i> "	105
4.5.5. Efecto del monóxido de carbono (CO)	110
4.5.6. Efecto de inhibidores " <i>in vitro</i> ".	112

4.5.6.1. Clotrimazol	112
4.5.6.2. Aminopiridina adenina dinucleótido fosfato (AADP)	114
4.6. Ensayos para el aislamiento y caracterización de los productos del metabolismo hepático del NFX	116
4.6.1. Espectros de absorción de luz	117
4.6.1.1. Luz visible	117
4.6.1.2. Luz ultravioleta y visible. Extracción con solvente orgánico de la mezcla de reacción.	119
4.6.2. Cromatografía en placa delgada	120
4.6.3. Cromatografía en fase reversa (filtración por HPLC)	122
4.6.3.1. Metabolismo microsomal hepático del NFX	122
4.6.3.2. Metabolismo del NFX en hepatocito aislado	124
4.6.4. Detección de aminas aromáticas primarias	126
4.6.5. Espectrometría de masa y espectrometría ultravioleta.	126
4.7. Discusión	129
5. METABOLISMO HEPÁTICO DEL 5'-NITROINDOL	146
5.1. Carga energética de adenilatos	148
5.2. Transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa en hepatocito aislado	154
5.3. Actividad ATPasa latente	160
5.4. Aumento del volumen mitocondrial (swelling).	161
5.5. Peroxidación de lípidos	165
5.6. Conformación mitocondrial	167
5.7. Discusión	174
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	179
7. BIBLIOGRAFÍA	182

INTRODUCCIÓN

1.1. La enfermedad de Chagas.

1.1.1. Características.

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), cuyo agente etiológico es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, es endémica en el centro y sur del continente americano. Se ha estimado que afecta entre 15 y 20 millones de personas. En nuestro país, el total de infectados alcanzaría a 2300000 personas, aproximadamente el 7-8% del total de la población (Storino y Milei, 1994; Segura, 1995). Es por ello que, desde el punto de vista sanitario, el estudio de la enfermedad de Chagas reviste gran importancia.

El ciclo de vida del *T. cruzi* incluye el pasaje obligatorio del parásito a través de huéspedes vertebrados e invertebrados, en los que atraviesa diferentes estadios evolutivos. El vector de la enfermedad es la vinchuca (*Triatoma infestans*), un insecto hematófago. Al picar a un organismo infectado, los tripomastigotes ingeridos por el insecto se diferencian en la forma proliferativa llamada epimastigote. Al llegar a la parte posterior del intestino del insecto, los epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos. Cuando la vinchuca pica nuevamente, deja al *T. cruzi* sobre la piel, junto con sus heces. De esta forma el parásito entra en la lesión y circula por la sangre de su huésped como tripomastigote penetrando en el citoplasma celular donde transcurre la diferenciación a la forma amastigote, la cual, después de varios ciclos reproductivos, se transforma en la

forma tripomastigote responsable de la diseminación de la infección. Durante la parasitemia, los tripanosomas pueden ser transmitidos a otro huésped ya sea a través del insecto vector o por transfusión sanguínea.

En los seres humanos, la enfermedad se inicia con una fase aguda de aproximadamente dos meses de duración. En la mayoría de los afectados es asintomática, a pesar de que, en algunos casos, puede provocar la muerte (especialmente en niños). Pasada la primera etapa, la enfermedad ingresa en un período de incubación, también asintomático, que puede durar años. Transcurrido ese período, la enfermedad entra en la etapa crónica, caracterizada por lesiones cardíacas severas (peligrosas arritmias y bloqueo circulatorio de la rama derecha) y trastornos digestivos (mega-colon y mega-esófago) o neurológicos (Storino y Milei, 1994).

1.1.2. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas.

Hasta el presente, no existe un fármaco eficiente para atacar todas las formas de la enfermedad de Chagas (Van den Bossche, 1978; Cançado y Brener, 1979; Gutteridge, 1980; Laplumé y col., 1982; WHO, 1981 y 1986; de Castro, 1993).

Existen diversos factores que atentan contra la erradicación de la enfermedad. En primer lugar, las malas condiciones de vida favorecen el desarrollo del insecto vector. A

su vez, el establecimiento de la enfermedad en animales salvajes que actúan como reservorios de la misma, hace que el control de la enfermedad requiera el desarrollo de campañas eficientes que incluyan:

- el mejoramiento y desinfección de las viviendas, para la eliminación del vector;
- la educación popular;
- el diagnóstico precoz;
- el desarrollo experimental de compuestos activos contra el *T. cruzi* y no tóxicos para el huésped mamífero.

En los últimos tiempos se han logrado grandes avances en el estudio de la bioquímica básica, biología molecular e inmunología del parásito. Es de esperar que estos avances permitan establecer un tratamiento eficaz para la cura de la enfermedad.

El enfoque racional para el diseño y selección de agentes quimioterápicos consiste en la detección de mecanismos biológicos y bioquímicos que sean, por un lado, esenciales para la supervivencia y la multiplicación del parásito y, por el otro, sensibles a drogas inocuas para el huésped mamífero.

Se ha estudiado "*in vitro*" el efecto de numerosas drogas contra la tripanosomiasis cruzi (Hammond y col., 1984). En general, el *T. cruzi* es resistente a drogas activas contra otras parasitosis relacionadas como, por ejemplo: los compuestos organometálicos (antimoniales) y las diaminas aromáticas utilizadas para el tratamiento de la leishmaniasis humana; los arsenicales aromáticos activos contra la tripanosomiasis africana; los

metronidazoles efectivos contra la *Entamoeba histolytica* y *Trichomona vaginalis*; los antipalúdicos quinina y 4-aminoquinolinas y los antibióticos penicilina, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclinas, rifampicina y estreptomina.

Las sustancias que, "*in vitro*", fueron efectivas contra el *T. cruzi* como para ser consideradas tripanocidas "*in vivo*", incluyen: los antibióticos actinomicina D y anfotericina B; las drogas catiónicas anfífilas acridina, metasulfato de fenacina y cristal violeta; los derivados azol ketoconazol, itraconazol, RS 49676, ICI 195739; los derivados de purina alopurinol, alopurinol ribósido, For A; las naftoquinonas β -lapachona y sus análogos menadiona, mitomicina D y doxorubicina; los complejos metálicos como el *cis*-diamino dicloroplatinum II; los productos naturales miconidina, tingenona, taxol y alcaloides; los derivados de la magainina, violasceína y el propóleo; los derivados carboxamida, fluoroarginina, elipticina, benzoquinolina-1-3-diona, lonidamina, lovastatin, clorhidrato de spirogermano, P-536, gossypol, antioxidantes y el ácido 3-mercapto picolínico; los colorantes fluorescentes de las mitocondrias rodamina 123, DiOC61 y merocianina 540; los inhibidores de las enzimas cisteín proteinasa, tripanotona reductasa y topoisomerasa II; los nitrofuranos y los nitroimidazoles (Jörg, 1974; Brener, 1975 y 1979; Gutteridge, 1976; Mester y col., 1987; Queiroz da Cruz y col., 1991; de Castro, 1993).

En 1957, Packchmanian inició el estudio del efecto tripanocida de diferentes nitrofuranos en ratones con infección experimental. Bock y col. (1969) sintetizaron una

serie de derivados del 4-(5'-nitro-2-furfurilidene)amino, eficaces contra el *T. cruzi*, demostrándose que su 3-metil derivado: Nifurtimox (NFX; Figura 1.1) es el de mayor actividad.

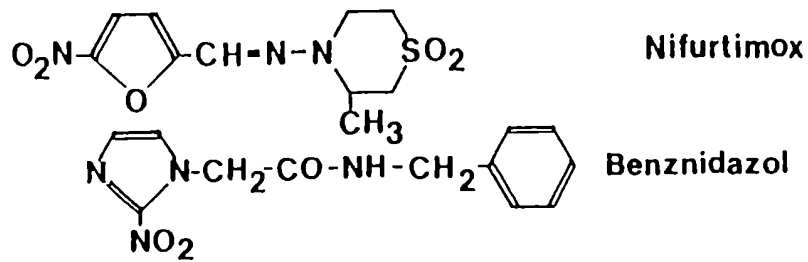


FIGURA 1.1. Estructura del nifurtimox y del benznidazol. Nifurtimox: 3-metil-4-(5'-nitro-2-furfuriliden) amino-tetrahidro-4H-1,4-tiacina-1,1-dióxido. Benznidazol: N-bencil-2-nitro-1-imidazol acetamida.

El efecto tripanocida del nitrofurano NFX fue ensayado "in vitro" en cultivos de células HeLa, de 1 - 2 días, inoculados con 200000 - 400000 tripanosomas/ml de medio de cultivo. El NFX actúa sobre las formas amastigote, intracelular, y tripomastigote, extracelular, del parásito.

Ensayos realizados "in vivo" por Bock y col. (1972) y Haberkorn y Gönnert (1972) demostraron que el NFX fue activo contra ocho cepas distintas de *T. cruzi* en animales infectados en su etapa aguda.

Se ensayaron también los derivados de los nitroimidazoles de uso antiparasitario: el metronidazol, compuesto utilizado en el tratamiento de la infección por *Trichomona*

vaginalis y el benzimidazol (Figura 1.1), que mostró ser mucho más efectivo contra *T. cruzi* tanto "in vitro" como "in vivo" (Polak y Richle, 1978).

Mester y col. (1987) sintetizaron diferentes derivados relacionados estructuralmente con el NFX: el (5-nitro-2-furfurilidene)-amino (NF) con sustituyentes aromáticos heterocíclicos 1,2,4-triazol, pirazol, benzimidazol y triazina, entre otros (Figura 1.2), que presentaron una mayor actividad sobre el *T. cruzi* "in vitro".

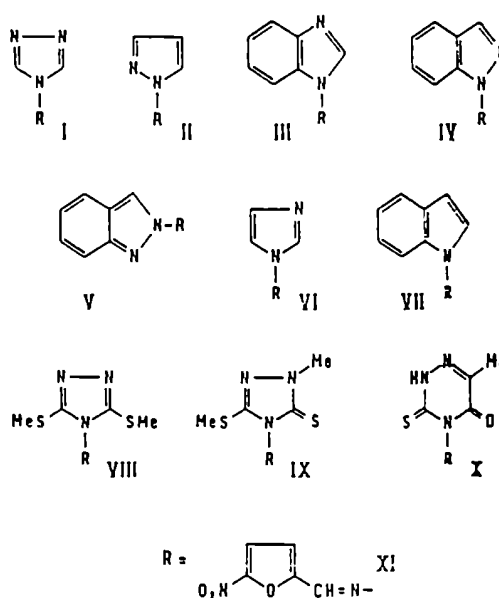


FIGURA 1.2. Estructura de los nitrofuranos análogos del NFX. Todos los compuestos tienen el grupo R = NF, (5-nitro-2-furfurilidene-amino), como el NFX, unido al heterociclo que se describe: I: 1,2,4-triazol; II: pirazol; III. benzimidazol; IV: indazol; V: indazol; VI: imidazol; VII, indol; VIII: 3,5-bis(metiltio)-1,2-4-triazol; IX: 1-metil-3-metiltio-1,2-4-triazol-5-tiona; X: 3-tioxo-6-metil-1,2,4-triazina-5-ona.

Pahn y col (1988) demostraron que dichos compuestos inhibieron el crecimiento de tripanosomatídeos. La sensibilidad de *Leptomonas seymouri* fue similar a la de *T. cruzi*

y significativamente mayor que la de *Crithidia fasciculata*. También ha sido informada una actividad mutagénica directa sobre *Salmonella typhimurium* (Alejandre-Duran y col, 1988), lo cual ha descartado la posibilidad de que estos compuestos sean utilizados como quimioterápicos.

Actualmente, el NFX (un nitrofurano) y el benznidazol (un nitroimidazol) son las drogas de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en su etapa aguda. Ambos compuestos eliminan los síntomas de la fase aguda de la enfermedad, limitando el curso de la infección. En la Argentina y Chile, el NFX dio excelentes resultados en los casos agudos, con desaparición de la parasitemia y negativización de las pruebas serológicas. En los enfermos crónicos sólo se logró la negativización del examen parasitológico aunque no pudo eliminarse la persistencia de positividad serológica (Pinto Dias, 1984). Sin embargo, en algunos casos, los pacientes no responden satisfactoriamente al tratamiento, hecho que puede ser debido, por un lado, a la heterogeneidad de la población de parásitos y, por otro, a los efectos colaterales que estas drogas producen en el organismo infectado.

1.1.3. Mecanismo de acción de los agentes terapéuticos contra el *T. cruzi*.

Un agente tripanocida debe atravesar la membrana de la célula huésped y ser

relativamente inocuo sobre los sistemas metabólicos de dicha célula. Luego, debe atravesar la membrana del parásito e interferir con algún proceso vital de éste. Cualquier agente dirigido contra la célula en replicación, por ejemplo: un inhibidor de la síntesis de ADN, ARN o de sus precursores, será activo sólo contra la forma intracelular del parásito. Otros compuestos que interrumpen procesos metabólicos intermediarios o la producción de energía, como los agentes oxidantes, pueden atacar tanto la forma tripomastigote (extracelular) como a la forma amastigote (intracelular). Una droga ideal debe atacar ambas formas morfológicas del parásito.

La reducción del NFX a radical nitroanión seguida de la auto-oxidación de este radical con la formación de anión superóxido (O_2^-) y otros productos de la reducción parcial del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo serían, al menos en parte, los responsables del efecto tóxico y tripanocida de esta droga. Stoppani y col. (1981) han realizado investigaciones bioquímicas que han aportado nuevos conocimientos del modo de acción de los quimioterápicos nitroheterocíclicos sobre el *T. cruzi*. Docampo y Stoppani (1979 y 1980) demostraron que concentraciones farmacológicas de NFX son capaces de generar productos de reducción parcial del oxígeno como anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Dichas reacciones han sido demostradas en todas las formas del *T. cruzi* (epi-, tripo- y amastigote) y tanto en células enteras como en homogenados, fracción mitocondrial y microsomal del parásito (Docampo y Stoppani 1979 y 1980; Docampo y col., 1981c). Estas reacciones no son exclusivas del *T. cruzi* ya que en

extractos de tejidos de mamífero (hígado, riñón, miocardio, cerebro y testículo) y en presencia de NAD(P)H, el NFX genera anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Docampo y col., 1981a y b; Moreno y col., 1980 y 1982).

La capacidad de los diferentes organismos para prevenir la acción letal de los derivados de la reducción parcial del oxígeno depende de su contenido en superóxido dismutasa (SOD), catalasa (Cat) y peroxidasa. A diferencia de su huésped mamífero, el *T. cruzi* es un organismo pobremente dotado para desintoxicar el peróxido de hidrógeno pues no posee Cat ni glutatión peroxidasa (GP) (Docampo y col., 1976; Boveris y col., 1980; Docampo, 1990). Las diferentes formas del *T. cruzi* son capaces de metabolizar bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno; esta actividad "peroxidasa" se debería a reacciones no enzimáticas entre tioles reducidos endógenos y peróxidos, siendo muy baja comparada con la verdadera actividad peroxidasa presente en células de mamíferos (Carnieri y col., 1993). Como consecuencia de estas diferencias enzimáticas, el *T. cruzi* es particularmente vulnerable a la acción tóxica del anión superóxido y sus derivados.

Los efectos del NFX sobre la replicación, transcripción y traducción del ADN del *T. cruzi* se producen a nivel de la inhibición de la síntesis del ADN, ARN y proteínas, estimulación de la degradación de macromoléculas y estimulación de la síntesis no programada de ADN (Goijman y Stoppani, 1985a). Observaciones de Goijman y col. (1985) pusieron de manifiesto una importante propiedad bioquímica del *T. cruzi*: su capacidad para reparar las roturas del ADN causadas por los agentes tripanocidas. Esta

capacidad explica la necesidad de mantener concentraciones altas y constantes del medicamento en la sangre de los enfermos chagásicos tratados, para evitar períodos de "reparación" que permitan la recuperación del parásito. El conocimiento del mecanismo de acción de estas drogas contribuiría a establecer cuáles son las estructuras bioquímicas o los procesos metabólicos más vulnerables del parásito, para el desarrollo de fármacos con mayor actividad tripanocida y menor toxicidad para el huésped mamífero.

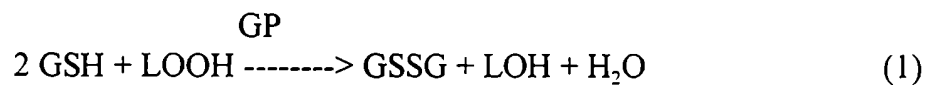
1.1.3.1. Efectos adversos del NFX "*in vitro*".

La incubación de NFX con microsomas de hígado de rata y NAD(P)H en condiciones anaeróbicas lleva a la formación del radical aniónico derivado del nitrofurano (Docampo y col., 1981a). La detección de este radical también puede hacerse utilizando homogenados de tejidos que son blanco de los efectos tóxicos colaterales del NFX como cerebro y testículo (Docampo y Stoppani, 1980). Moreno y col. (1980) y Bernacchi y col. (1986) observaron que el tratamiento de ratas con NFX determinó la aparición de alteraciones ultraestructurales en el testículo que podrían ser imputables a la formación de peróxidos lipídicos en el mismo. Navarro y col. (1984) encontraron cambios significativos en el espermatozoide de rata utilizando concentraciones de droga comparables a las dosis utilizadas clínicamente en humanos.

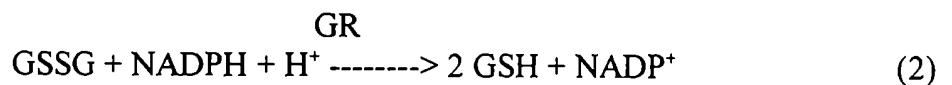
Según Hoffman (1972), dosis de 100 mg NFX/kg peso corporal produjeron inhibición completa de la espermatogénesis con degeneración y atrofia del parénquima testicular. En ratas hembra que recibieron igual dosis de NFX se encontraron severos daños ultraestructurales en mitocondrias de ovario (Castro y col., 1986).

La toxicidad del NFX fue demostrada también por el daño degenerativo en cerebro (Hoffman, 1972).

En el hígado, el mecanismo principal para la detoxificación de los peróxidos lipídicos (LOOH) es la reacción catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (GP; Reacción 1) (Christophersen, 1968; Sies y col., 1972; Simon y col., 1973), por la cual los LOOH son reducidos por el glutatión reducido (GSH), con formación de compuestos no tóxicos (LOH) y glutatión oxidado (GSSG), según la reacción:



Esta reacción consume GSH. En consecuencia, para mantener la actividad de la enzima glutatión peroxidasa a un nivel adecuado, el GSH debe ser repuesto ya sea por la síntesis "de novo" o por la reducción del GSSG, catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR; Reacción 2):



La reacción catalizada por la enzima GR resulta entonces esencial para los procesos de detoxificación, pues de ella depende la velocidad de las reacciones que utilizan GSH. En consecuencia, la inhibición de esta enzima (GR) promueve, indirectamente, todas las lesiones bioquímicas producidas por oxi-radicales o por los peróxidos lipídicos.

La actividad GR de preparaciones de distintos orígenes fue inhibida por nitroderivados como la nitrofurantoína (NFA), nitrofurazona (NFZ) (Buzard y Kopko, 1963; Ondarza y Abney, 1970), 5-nitro-2-furfuraldehído oxima (Ondarza y Abney, 1970), trinitrobenzenosulfonato (Carlberg y Mannervick, 1982) y NFX (Dubin y col., 1983 y 1984; Grinblat y col., 1988 y 1989; Sreider, 1994).

El GSSG producido por acción de la enzima GP (Reacción 1) se elimina por la bilis, de manera que la excreción biliar del GSSG es un indicador fidedigno de la formación de peróxidos de lípidos en el hígado (Sies y col., 1972). Dubin y col. (1983) encontraron, en ratas tratadas con NFX, un aumento de la excreción biliar de GSSG y una disminución del contenido de glutatión en el hígado. Esto podría llevar a pensar que algunos de los efectos hepatotóxicos del NFX se deberían a la generación de radicales libres que, en el caso en que ésta excediera la capacidad desintoxicante del hígado, producirían lesiones en la membrana del hepatocito. El NFX no modificó la actividad de la alanina amino transferasa del suero, ni la histología hepática de las ratas tratadas, sugiriendo que no hubo daño en las membranas celulares por los peróxidos formados

(Docampo y col., 1983). Por otra parte, Dubin y Stoppani (1982) demostraron que, en ratas, la inyección intraperitoneal de dosis relativamente altas de NFX aumenta el flujo biliar entre un 17% y 30% y que el incremento de la coleresis debida al NFX es de origen canalicular, a expensas de la fracción del flujo biliar independiente de las sales biliares. La adición de NFX a extractos hepáticos produjo una disminución progresiva del GSH, el cual luego de 150 min. de incubación con NFX prácticamente fue depletado (Dubin y col., 1984). Esto resultaría en una disminución de la velocidad de las reacciones dependientes de GSH, sumando así, a las lesiones bioquímicas producidas por oxirradicales y peróxidos no metabolizados, la baja disponibilidad de GSH para reacciones de conjugación potenciando la citotoxicidad de estos compuestos.

Efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos del NFX y otros nitrofuranos análogos han sido estudiados por Mc Calla (1983) y Alexandre-Duran y col. (1988).

Gorla y Castro (1985) hallaron que una dosis oral única de NFX a ratones estimuló la formación de micronúcleos en médula ósea. También ha sido demostrado que el NFX atraviesa la barrera placentaria de la rata y alcanza al feto (Duhm y col., 1972).

1.1.3.2. Efectos tóxicos del NFX y del benznidazol en el huésped mamífero.

El NFX y el benznidazol están indicados para el tratamiento de la fase aguda de

la enfermedad de Chagas, con el objeto de reducir la parasitemia y minimizar el daño que produce la invasión del parásito a los tejidos del huésped (Storino y Milei, 1994). No está claro si el tratamiento en la infección aguda previene la secuela crónica y la eficacia de estas drogas sobre el Chagas crónico aún no ha sido establecida (Van Voohris, 1990).

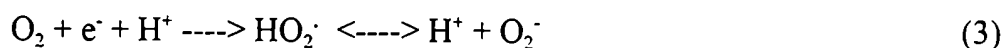
Se ha demostrado que el NFX produce efectos colaterales y secundarios en el 40 a 70% de los pacientes tratados con este nitrofurano (Laplumé y col., 1982). La mayoría de las reacciones adversas están relacionadas con el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal. Son comunes las náuseas y los vómitos, la pérdida de peso y las mialgias. También pueden presentarse convulsiones, polineuritis y síntomas psicóticos (Laplumé y col., 1982).

En tratamientos prolongados con benznidazol se observaron dermatitis, polineuropatías, síntomas digestivos y alteraciones psíquicas (Marr y Docampo, 1986).

La reducción del grupo nitro participa en la toxicidad de estos nitrocompuestos. El NFX y el benznidazol difieren en sus mecanismos de toxicidad sobre células de mamífero al igual que sobre la actividad tripanocida, antes mencionada. En el caso del NFX, la toxicidad estaría relacionada con la formación de radicales libres y su unión directa a componentes celulares o la oxidación de lípidos. Para el benznidazol, la interacción de los metabolitos de la nitro-reducción con componentes celulares sería la principal causa de su toxicidad (Castro y Díaz de Toranzo, 1988).

1.2. Especies reactivas del oxígeno.

En la mayoría de los sistemas biológicos, el O_2 es reducido a agua por acción de la enzima citocromo oxidasa de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, en una reacción acoplada a la síntesis de ATP. Tal mecanismo constituye la base energética para la vida de los organismos eucariotes. Sin embargo, hay otros aspectos del metabolismo del O_2 , como su reducción con un electrón a anión superóxido (O_2^-), o con dos electrones a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que están asociados con procesos tóxicos. "In vivo", éstos son contrarrestados por los sistemas de defensa contra el daño oxidativo (Kappus y Sies, 1981). La reducción parcial del oxígeno lleva a la formación de especies reactivas del mismo, algunas de las cuales son radicales libres. Un radical libre puede definirse como una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo, hecho que le confiere propiedades paramagnéticas. El oxígeno posee dos electrones desapareados con espín paralelo; por lo tanto, es un bi-radical capaz de aceptar electrones (uno por vez). La adición secuencial de electrones al oxígeno (Reacciones 3 a 6) lleva a la formación de las especies reactivas (Gutteridge, 1992).





El radical anión superóxido (O_2^\cdot) es el producto de la reducción parcial del O_2 por un electrón (Reacción 3). En los sistemas biológicos, este radical tiene una reactividad limitada, ya que puede difundir antes de interactuar con otros radicales o moléculas. Además, puede comportarse como un agente reductor (Frimer, 1982) o como un oxidante, participando en las reacciones que llevan a la peroxidación de lípidos.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una especie no radical resultante de la adición de un segundo electrón al superóxido (Reacción 4). En medios acuosos es estable, capaz de atravesar las membranas biológicas y, si bien tiene una reactividad limitada (Halliwell y Gutteridge, 1990), puede actuar como reductor u oxidante de hemoproteínas y moléculas con grupos tiol, dependiendo de las condiciones del medio (Chance y col., 1979; Halliwell y Gutteridge, 1984; Brunori y Rotilio, 1984).

Teniendo en cuenta que, en soluciones acuosas, el O_2^\cdot y el H_2O_2 presentan moderada reactividad, el daño producido por estas especies se debe a su conversión a especies más reactivas (Halliwell y Gutteridge, 1990).

El radical hidroxilo (OH^\cdot) resulta de la adición de un tercer electrón al H_2O_2 (Reacción 5). Este radical es altamente reactivo y, por lo tanto, cuando es generado "*in vivo*", reacciona en o muy cerca del sitio de su formación con azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos y ácidos orgánicos por mecanismos que implican captación de

hidrógeno, adición o transferencia de electrones, entre otros. Durante estas reacciones se producen otros radicales con menor reactividad. En consecuencia, el tipo de daño producido por el $\text{OH}\cdot$ depende del sitio de su formación. Por ejemplo: la producción de $\text{OH}\cdot$ en una zona cercana al ADN puede llevar a la modificación de las purinas o pirimidinas o a la ruptura de las cadenas de ADN (Del Maestro, 1980; Halliwell y Gutteridge, 1984).

Por último, la adición de un cuarto electrón al radical hidroxilo lleva a la formación de agua (Reacción 6).

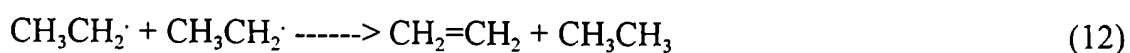
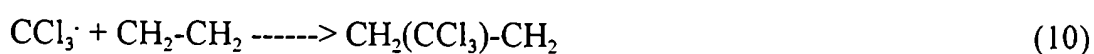
Otras especies reactivas del oxígeno son el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el radical perhidroxilo ($\text{HO}_2\cdot$). El $^1\text{O}_2$ es un estado electrónico excitado del O_2 (Chance y col., 1979) y reacciona rápidamente con varias moléculas biológicas tales como proteínas, lípidos y ADN, generando mutaciones (Joenje, 1989).

La protonación del O_2^- lleva a la formación del radical perhidroxilo (Reacción 3). A pH fisiológico, este radical se disocia para dar O_2^- , debido a su bajo pK_a . Por lo tanto, sólo estará presente en medios ácidos tales como las vacuolas fagocíticas de los macrófagos o en las proximidades de las membranas. Este radical es un oxidante más fuerte que el O_2^- (Fehér y col., 1987) y menos polar que éste, pudiendo atravesar las membranas biológicas e inducir la peroxidación de lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1990).

1.2.1. Generación y metabolismo de las especies reactivas del oxígeno.

En la mayoría de los organismos animales y bajo condiciones fisiológicas, la enzima respiratoria citocromo *c* oxidasa, responsable de más del 98% del consumo de oxígeno, reduce el oxígeno a agua sin la formación de ningún intermediario reducido del oxígeno (Ernster, 1986).

La auto-oxidación de compuestos biológicos como hemoproteínas, leucoflavinas, tetrahidrobiopterinas, catecolaminas, etc. produce O_2^- y otras especies reactivas del oxígeno (Fridovich, 1983). Los radicales del oxígeno pueden provenir también de la auto-oxidación de hidroquinonas, dihidrofumarato o ascorbato en presencia de hierro, como así también de la metabolización de numerosos xenobióticos y compuestos exógenos. A su vez, estas especies pueden interactuar entre sí, aceptando o cediendo electrones, captando protones, por reacciones de adición, dismutación o aniquilación produciendo una compleja mezcla de productos (reacciones 7 a 12; Slater, 1984):



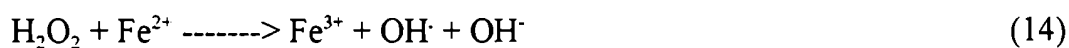
El O_2^- y el H_2O_2 son metabolitos normales en la célula y se encuentran en concentraciones muy bajas. El O_2^- es generado en las mitocondrias y microsomas de células aeróbicas, en reacciones catalizadas por enzimas específicas de determinados tejidos diferenciados, por ejemplo: la xantina oxidasa de hígado y la ferredoxina adrenal. La enzima NADPH-oxidasa presente en leucocitos polimorfonucleares y células fagocíticas también reduce el oxígeno molecular a O_2^- (Ernster, 1986). Por otra parte, la excitación del oxígeno a 1O_2 puede ser producida por la iluminación de diversos pigmentos biológicos como clorofila, retinol, porfirinas y flavinas en presencia de oxígeno (Foote, 1982). El 1O_2 es también generado en ausencia de luz, por ejemplo, como resultado del proceso de peroxidación de lípidos y de ciertas reacciones enzimáticas llevadas a cabo por determinadas oxidasas (peroxidasas, citocromos, lipo-oxigenasas). También puede provenir de la descomposición de especies inestables tales como radicales peroxilos y H_2O_2 , en presencia de hipoclorito, O_2^- o 1,2 dioxietanos (Cadenas, 1985; Kanofsky, 1989).

Las especies reactivas del oxígeno se forman a partir de la reducción parcial del mismo o por reacciones secundarias con protones, metales de transición y/o radicales libres.

En presencia de Fe^{3+} , el O_2^- y el H_2O_2 interactúan entre sí generando radical hidroxilo, anión hidroxilo y oxígeno en un proceso conocido como reacción de Haber-Weiss y que se muestra en la Reacción 13:



"*In vitro*", el ión ferroso reacciona con H_2O_2 formando también radical hidroxilo (OH^\cdot) según la reacción de Fenton (Reacción 14):



Los radicales del oxígeno de naturaleza orgánica son muy importantes en los sistemas biológicos, tienden a reaccionar con otras sustancias y producir nuevos radicales (reacción en cadena), de manera tal que cuando el radical hidroxilo ataca una molécula biológica (RH), le quita un electrón generando así un radical libre de la molécula (R^\cdot). Éste, reacciona rápidamente con el oxígeno, formando el radical peroxilo (ROO^\cdot). Si bien es menos reactivo, este radical peroxilo puede causar daño. Por ejemplo, puede remover otro átomo de hidrógeno de otra molécula biológica ($\text{R}'\text{H}$) para originar un peróxido orgánico (ROOH) más otro radical (Reacciones 15 a 17).



1.2.2. Peroxidación de lípidos.

Cuando la molécula RH es un ácido graso poli-insaturado (PUFA) el proceso descrito por las reacciones 15 a 17 resulta en una reacción en cadena conocida como peroxidación de lípidos, definida como la formación y degradación de los hidrolipoperóxidos, aductos del oxígeno con los lípidos insaturados (Girotti, 1985; Dubin y col., 1990a). Este proceso lleva a la pérdida de la funcionalidad de las membranas celulares, con el consecuente daño celular (Gutteridge, 1992). En las membranas biológicas, el blanco de acción del ataque oxidativo son el colesterol y los fosfolípidos, compuestos que contienen un alto número de ácidos grasos poli-insaturados. Sin embargo, hay también algunos aspectos beneficiosos de la peroxidación como, por ejemplo, su participación en la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos y, posiblemente, en el efecto bactericida de los neutrófilos.

La peroxidación de lípidos implica un mecanismo de reacción por radicales libres, de naturaleza no enzimática y autocatalítica (Girotti, 1985) y comprende las siguientes etapas esquematizadas en la Figura 1.3:

- a) **Iniciación:** una especie altamente reactiva, generalmente un radical libre, sobrepasa la energía de disociación de una unión alílica de un PUFA, abstrayendo un hidrógeno y formando un radical del lípido ($L\cdot$). Las especies iniciadoras de la peroxidación de lípidos son: el radical hidroxilo ($HO\cdot$; Gutteridge y col., 1979), el ión ferrilo (FeO_2^+

o FeOH^{3+}) (Bors y col., 1979; Koppenol y Liebman, 1984); el ión perferrilo (Fe^{2+}O_2 o $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$) (Pederson y col., 1973; Aust y Svingen, 1982) y al complejo ferroso-oxígeno-férrico (Bucher y col., 1983).

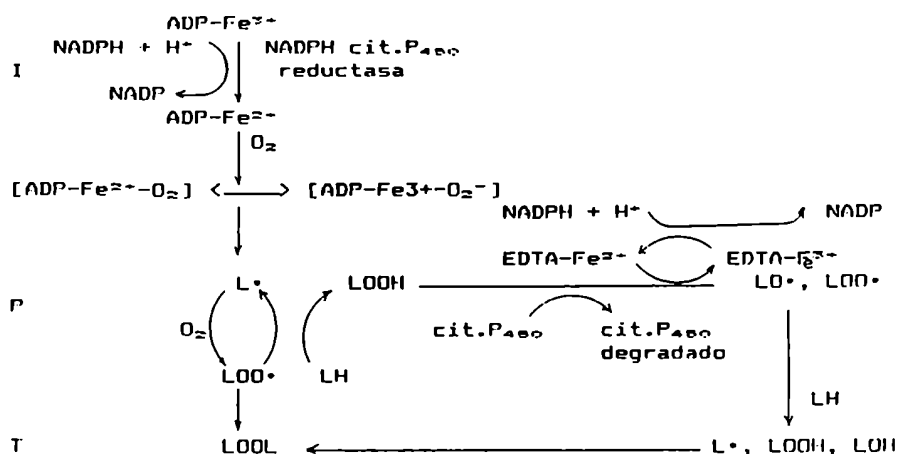


FIGURA 1.3. Esquema de la peroxidación lipídica enzimática dependiente de NADPH, involucrando el papel de los hidroperóxidos. I: iniciación; P: propagación; T: terminación.

- b) **Propagación:** a diferencia del PUFA, L^\bullet puede rápidamente unirse al oxígeno molecular con formación del radical peroxilo (LOO^\bullet). Este LOO^\bullet puede abstraer un átomo de hidrógeno alílico de otro lípido activando una segunda molécula lipídica con formación del hidroperóxido (LOOH). Durante esta etapa el LOOH puede sufrir una ruptura catalizada por hierro, ya sea en forma homolítica para dar LO^\bullet , o heterolítica,

generando LOO^\cdot (aunque en menor cantidad). Estos radicales libres reinician la peroxidación de lípidos sustrayendo nuevamente un hidrógeno lábil de un PUFA. Tanto el hierro hemínico como no hemínico pueden catalizar la ruptura del LOOH. La diferencia reside en que el hierro hemínico (por ejemplo, del citocromo P-450), debe estar como Fe^{3+} , mientras que el hierro no hemínico, quelado (EDTA-Fe^{2+}) o no, reacciona mejor a pH fisiológico en su forma Fe^{2+} (Svingen y col., 1979; Bucher y col., 1983; Fukuzaka y col., 1985; Minotti y Aust, 1987a y 1987b). Los mismos autores postularon la intervención del citocromo P-450 férrico en la ruptura de hidroperóxidos y Weiss y Estabrook (1986a y 1986b) confirmaron esta hipótesis describiendo el mecanismo de acción de este citocromo en la peroxidación lipídica. La descomposición de LOOH también resulta en la acumulación de productos de cadena corta, especialmente aldehídos. Uno de ellos, el malondialdehído (MDA) reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando un compuesto coloreado cuya intensidad refleja el proceso peroxidativo (Buege y Aust, 1978).

- c) **Terminación:** se produce cuando dos radicales libres reaccionan entre sí o cuando las especies reactivas que se formaron durante la iniciación y la propagación son secuestradas o transformadas en especies menos reactivas (Girotti, 1985; Halliwell y col., 1992).

1.2.3. Estrés oxidativo.

Si bien el oxígeno es un componente esencial para los organismos vivientes, algunos de los productos de la reducción parcial del mismo pueden ser altamente dañinos y tóxicos para las células, debido a su alta reactividad con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El daño ocurre especialmente cuando la concentración de especies reactivas del oxígeno sobrepasa la capacidad de los sistemas celulares de defensa (Kappus y Sies, 1981).

El estrés oxidativo ha sido definido como una alteración entre el balance oxidantes/antioxidantes en favor de los primeros, lo cual lleva a un daño potencial para la célula (Sies, 1991). Los efectos nocivos del estrés oxidativo incluyen una serie de desarreglos en el metabolismo celular como rupturas en las cadenas de ADN, modificación de las bases, aumento del Ca^{2+} libre intracelular, daño en los transportadores iónicos de membrana y otras proteínas específicas, inhibición enzimática y peroxidación de lípidos (Halliwell y col., 1992).

1.2.4. Sistemas de protección contra el estrés oxidativo.

Los antioxidantes son aquellas sustancias que, presentes en concentraciones mucho

más bajas que las de un sustrato oxidable, disminuyen o inhiben significativamente la oxidación del mismo (Halliwell y Gutteridge, 1989). Dicha definición comprende tanto a sistemas enzimáticos como no enzimáticos.

El proceso de desactivación de radicales libres consiste en la formación de un producto final no radical. La actividad antioxidante de compuestos naturales y sintéticos involucra el pasaje de un electrón al radical libre, con la formación del radical del antioxidante. Otra función de importancia biológica en la acción de los antioxidantes es transferir la función radical a sitios o compartimientos celulares donde el daño sea menor. En general, esto significa transferir equivalentes de oxidación desde fases hidrofóbicas a fases acuosas; por ejemplo, desde la membrana al citosol, o desde las lipoproteínas sanguíneas a la fase acuosa del plasma. Los antioxidantes más eficientes reaccionan con radicales libres tales como los radicales lipoperoxilo y, a su vez, son capaces de interactuar con compuestos solubles en agua para su posterior eliminación (Sies, 1993).

1.2.4.1. Sistemas enzimáticos.

Las células aeróbicas tienen enzimas protectoras específicas que mantienen las concentraciones de O_2^- y H_2O_2 a niveles extremadamente bajos, reduciendo al mínimo la posibilidad de formación de los radicales hidroxilo (Reacciones 3 a 6). Ellas son: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (Cat) y la glutatión peroxidasa (GP). La Figura

1.4 resume las reacciones de activación de los nitrocompuestos en condiciones aeróbicas para formar el radical nitroanión y la capacidad de la célula para inactivar los oxirradicales y el H_2O_2 producidos como consecuencia del ciclo redox de los nitroderivados. Mc Cord y Fridovich (1969) y Fridovich (1974 y 1975) han informado que las mitocondrias y compartimientos citosólicos contienen SOD, enzima que asegura la dismutación del radical $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 y O_2 ; mientras que la Cat presente en los peroxisomas y las peroxidases mitocondriales detoxifican al H_2O_2 formado.

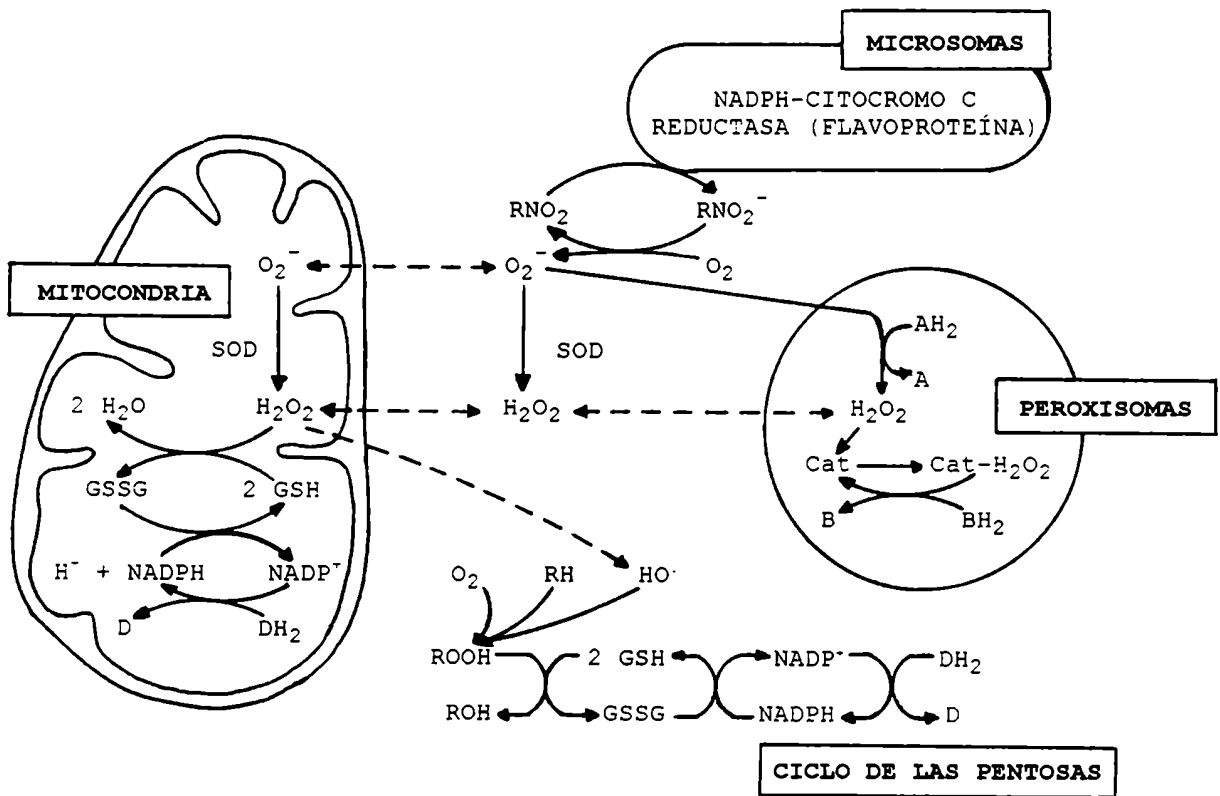


FIGURA 1.4. Compartimientos celulares involucrados en la eliminación del anión superóxido y peróxido de hidrógeno producidos por la activación de los nitrocompuestos (Biaglow y col., 1986).

En los tejidos como hígado, corazón y riñón, el H_2O_2 es normalmente degradado por la Cat, mientras que en los tejidos deficientes en esta enzima, el H_2O_2 difunde a la sangre donde es destruido por la Cat de los eritrocitos. En algunos tipos celulares especializados existen peroxidasas como la glutatión peroxidasa (GP) de hígado, las cuales catalizan la descomposición del H_2O_2 acoplada a la oxidación de sustancias como el glutatión reducido (GSH) (Figura 1.4). La depleción de GSH inhibe las enzimas citosólicas y mitocondriales que tienen como sustrato al GSH. Por ello, es necesario regenerar el GSH a partir de la reducción del glutatión oxidado (GSSG). La enzima glutatión reductasa (GR) reduce al GSSG a expensas de la oxidación del NADPH (Figura 1.4). Tal como fue mencionado en el punto 1.1.3.1. el sistema enzimático glutatión peroxidasa - glutatión reductasa es el responsable de la detoxificación de los peróxidos lipídicos (Reacciones 1 y 2, pág. 12). Por último, el ciclo de las pentosas participa en la inactivación de los peróxidos proveyendo los equivalentes de reducción (NADPH) necesarios para el proceso de reducción (Figura 1.4).

1.2.4.2. Sistemas no-enzimáticos.

Además de los sistemas enzimáticos con capacidad antioxidante, las células cuentan con sistemas no-enzimáticos lipo- o hidrosolubles que cumplen la misma función.

Entre los antioxidantes liposolubles se encuentran el α -tocoferol (vitamina E), el ubiquinol y los carotenos. Los otros antioxidantes como el ácido ascórbico (vitamina C), el ácido úrico y el glutatión reducido (GSH) son de naturaleza hidrosoluble (Cadenas, 1985). También se han sintetizado moléculas con capacidad antioxidante con el fin de emplearlas en forma terapéutica (Tabla 1.1).

TABLA 1.1. Algunos antioxidantes disponibles para uso terapéutico.

Moléculas naturales y sustancias relacionadas	Moléculas sintéticas
Superóxido dismutasa	Tioles (<i>N</i> -acetilcisteína, mercaptopropionilglicina)
Catalasa	Quelantes sintéticos (ICRF-187, hidroxipiridonas)
Glutatión reductasa	Inhibidores de la xantina oxidasa (alopurinol, oxipurinol, amflutizol)
α -tocoferol	Inhibidores de la activación de los fagocitos
Ácido ascórbico	Probucoi
Adenosina	Trolox C
Transferrina	
Lactoferrina	
Glutatión y sus precursores	
Carotenoides y otros pigmentos vegetales	
Deferoxamina	

Tomado de Halliwell y col. (1992).

variedad de bacterias y protozoos patógenos (Mc Calla, 1990).

1.3. Nitrocompuestos heterocíclicos.

1.3.1. Características.

Los heterociclos son compuestos cíclicos en los que uno o más carbonos del anillo han sido reemplazados por otro átomo (un "heteroátomo"). Cuando el heteroátomo es el oxígeno, el compuesto aromático resultante se denomina furano. Dichos heterociclos pueden contener distintos sustituyentes. Los nitrocompuestos contienen un átomo de nitrógeno unido a uno o más átomos de oxígeno. Por lo tanto, si un grupo nitro (NO_2) se encuentra unido a un anillo furano, estamos en presencia de un nitrocompuesto heterocíclico denominado nitrofurano.

El potencial terapéutico de los compuestos nitroheterocíclicos se descubrió en 1944 cuando Dodd y Stillman informaron que la nitración de varios derivados del furano les confería propiedades bacteriostáticas. A partir de allí se han sintetizado varios 5-nitrofuranos que son utilizados como aditivos y conservantes alimentarios (Sorrentino y Hoener, 1987) o en medicina humana y veterinaria gracias a su efectividad contra una variedad de bacterias y protozoos patógenos (Mc Calla, 1990).

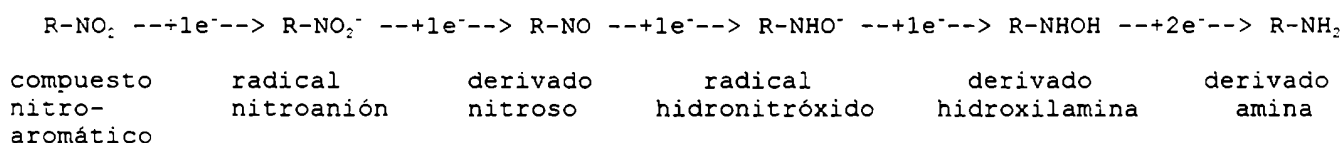
1.3.1. Metabolismo.

Los compuestos nitroheterocíclicos se utilizan en medicina humana como antimicrobianos, antiparasitarios y agentes radiosensibilizantes (Grunberg y Titsworth, 1973; Van den Bossche, 1978; Mc Calla, 1983; Adams y Stratford, 1986). Si bien la presencia del grupo nitro parece esencial para la actividad antimicrobiana de muchos compuestos heterocíclicos, dicho grupo podría incrementar su toxicidad para el organismo huésped (Kedderis y Miwa, 1988).

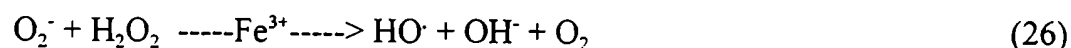
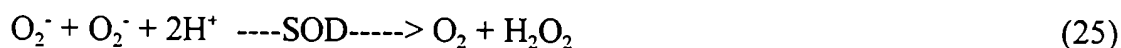
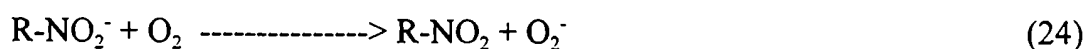
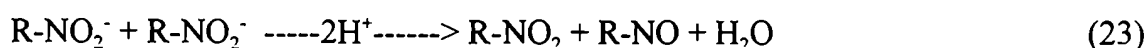
El efecto terapéutico y tóxico de estos compuestos involucra la reducción del grupo nitro (Kedderis y Miwa, 1988). Varias flavoproteínas intervienen en la reducción de los nitroderivados: las enzimas microsomales NADPH-citocromo P-450 reductasa y NADH-citocromo b₅ reductasa (Masana y col., 1984b; Minchin y col., 1986; Wong y Agrawal, 1988); las enzimas citosólicas xantina oxidasa (Tatsumi y col., 1979), aldehído oxidasa (Wolpert y col., 1973) y DT-diaforasa (Tatsumi y col., 1979) y las enzimas mitocondriales NADH-deshidrogenasa de cadena respiratoria (Smyth y Orsi, 1989), succinato deshidrogenasa (Westfall, 1946), lipoamida deshidrogenasa (Tsai, 1987) y NADPH-nitro-reductasa de membrana externa (Moreno y col., 1984a). El citocromo P-450 también puede catalizar la reducción de varios nitrocompuestos (Gillette y col., 1968; Kato y col., 1969; Harada y Omura, 1980). Los derivados nitro-aromáticos son reducidos por estas enzimas a intermediarios poco estables y a productos estables.

Estudios realizados en condiciones anaeróbicas y aeróbicas con estos compuestos sugieren una serie de vías metabólicas para las células de mamífero:

1) Condiciones anaeróbicas (Reacción 21):



2) Condiciones aeróbicas:



La transferencia inicial de un electrón (primer paso de la Reacción 21 y Reacción 22) es catalizada por las flavoenzimas mencionadas. El producto inicial de esta reducción es el radical libre nitroanión ($R-NO_2^{\cdot -}$), que puede ser detectado por espectroscopía de

resonancia paramagnética electrónica (EPR) en condiciones anaeróbicas (Docampo y col., 1981a; Fernández Villamil y col., 1990a). La posterior reducción a compuestos inestables o metabolitos estables depende de la tensión de oxígeno del medio y de la velocidad de reacción (Holtzman y col., 1981). Los radicales nitroanión y nitróxido han sido detectados como intermediarios (Mason y Holtzman, 1975; Holtzman y col., 1981) y se postula que estas reacciones proceden secuencialmente por reducción con un electrón. Dependiendo del potencial redox de los sustratos o de sus intermediarios, estas reacciones pueden ser catalizadas enzimática o no enzimáticamente e involucrar agentes reductores como el ácido ascórbico (Rao y Mason, 1987), nucleótidos de piridina, flavín nucleótidos reducidos (Leskovac y col., 1989) y compuestos con grupos tiol como cisteína y GSH (Wilson, 1978). El oxígeno inhibe la nitro-reducción por reoxidar a los intermediarios (Pérez-Reyes y col., 1980) o a las coenzimas involucradas en la catálisis. La formación de radicales libres derivados de las drogas y del oxígeno puede llevar a daño celular importante a través del estrés oxidativo generado por las reacciones con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

La Figura 1.5 esquematiza el metabolismo de los nitrocompuestos. Los radicales libres nitroanión formados por reducción del nitroderivado con un electrón pueden intervenir en varias reacciones químicas que son responsables de la toxicidad de estos compuestos:

a) Dismutación de dos radicales libres entre sí (Reacción 23), (Peterson y col., 1979;

- Holtzman y col., 1981; Docampo y col., 1981a; Moreno y col., 1984b). El radical nitroanión formado en sistemas biológicos decae por el mismo proceso de dismutación que el observado en sistemas químicos simples. Esta reacción puede funcionar como reacción de desintoxicación, debido a la destrucción del radical libre, o ser la precursora de especies más tóxicas como el nitrosoderivado y la hidroxilamina (Reacción 21), compuestos altamente reactivos, cancerígenos y causantes de methemoglobinemia y hemólisis de eritrocitos (Kiese, 1974; Biaglow y col., 1986);
- b) Unión covalente del radical libre a las macromoléculas de los tejidos. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los radicales nitroanión provenientes de diferentes nitroderivados no reaccionan con tioles, proteínas o ADN (Polnaszek y col., 1984; Josephy y Mason, 1985; Mason y Josephy, 1985), indicando que ellos no son los electrófilos reactivos;
- c) Oxidación espontánea del radical libre en presencia de oxígeno (Reacción 24 y Figura 1.5), con regeneración del nitroderivado original y formación de anión superóxido (Mason y Josephy, 1985). La dismutación del O_2^- , ya sea espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), lleva a la producción de H_2O_2 (Reacción 25 y Figura 1.5). El O_2^- es poco activo por sí mismo, pero es precursor del radical hidroxilo ($HO\cdot$; Reacción 26 y Figura 1.5) y perhidroxilo ($HO_2\cdot$; Chance y col., 1979), todos ellos considerados especies reactivas del oxígeno;

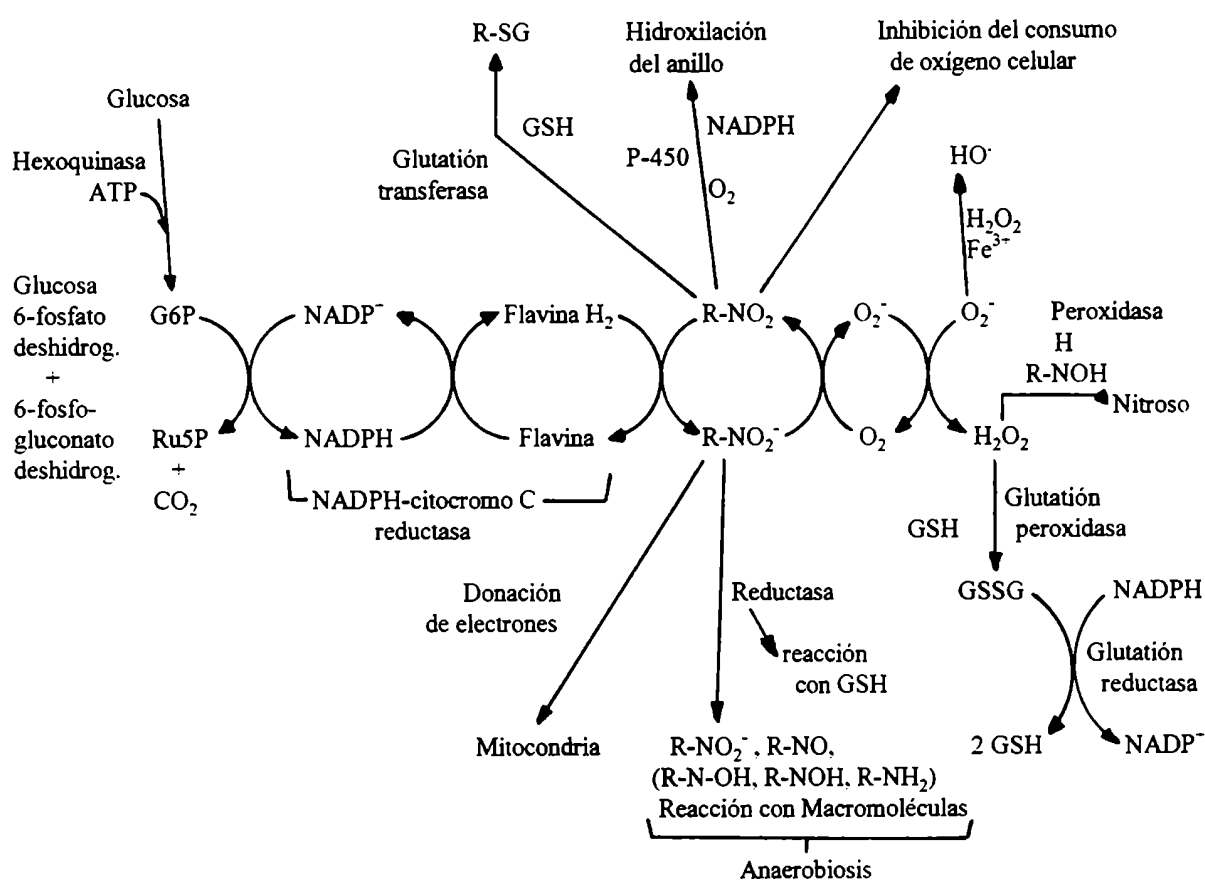


FIGURA 1.5. Metabolismo de los nitrocompuestos (Biaglow y col., 1986).

- d) formación de conjugados con GSH, en una reacción catalizada por la glutatión transferasa (Figura 1.5);
- e) hidroxilación del anillo furano mediada por el citocromo P-450 y en presencia de NADPH y oxígeno (Figura 1.5);

- f) inhibición del consumo de oxígeno celular a través de la interacción con los componentes de la cadena mitocondrial de transporte de electrones (Figura 1.5);
- g) transferencia de electrones a la cadena mitocondrial de transporte de electrones (Figura 1.5).

1.4. Sistema mono-oxigenasa de función mixta.

El metabolismo de una variedad de compuestos incluyendo drogas, alcanos, ácidos grasos, esteroides e hidrocarburos aromáticos policíclicos es llevado a cabo por una cadena microsomal de transporte de electrones conocida como sistema mono-oxigenasa de función mixta. Este sistema enzimático está compuesto por la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa (EC 1.6.2.4), el citocromo P-450 (EC 1.14.14.1) y fosfolípidos, todos ellos constituyentes del retículo endoplásmico (Kaschnitz y Coon, 1975; Ojha y Kohli, 1994).

La oxidación de compuestos catalizada por este sistema involucra la secuencia de eventos ilustrados en la Figura 1.6. Una molécula de citocromo P-450 oxidado ($P450[Fe^{3+}]$) se une al sustrato (Figura 1.6 A) en un evento asociado a un corrimiento de bajo a alto espín del citocromo oxidado. El segundo paso en el ciclo (Figura 1.6 B) implica la reducción del citocromo P-450 férrico de alto espín por un electrón proveniente

1.4.1. NADPH-citocromo P-450 reductasa.

La enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa se encuentra en las membranas nuclear y del retículo endoplásmico (microsomas). Cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH hacia el citocromo P-450 cumpliendo un papel importante en el mantenimiento de la función catalítica del citocromo P-450. También puede transferir electrones hacia otras proteínas microsomales y varios aceptores finales de electrones (Lu y Coon 1968; Masters, 1980; Ernster y col., 1982; Shen y col., 1991).

Está compuesta por una sola cadena polipeptídica de peso molecular 70000-80000, asociada a una molécula de FMN y una molécula de FAD (Iyanagi y Mason, 1973). Se han identificado cinco dominios funcionales incluyendo un dominio amino terminal de anclaje a la membrana (Black y col., 1979) y las regiones que participan en la unión del FMN, FAD, NADPH y el citocromo P-450 (Nisimoto, 1986; Porter y Kasper, 1986; Shen y col., 1989; Sutter y col., 1990). Contiene una cantidad relativamente baja de aminoácidos aromáticos. El pH óptimo es 7,6-8,2. La actividad aumenta con la fuerza iónica, siendo óptima con fosfatos 0,2 M, pH 7,6. La $V_{\text{máx}}$ es 1200 moles citocromo *c* reducidos por mol de flavina. Para el NADPH, el K_M es 4 μM , mientras que, para el citocromo P-450, el K_M es 5,5 μM . La constante de disociación es 4,6 μM . El NADP^+ y el AMP son inhibidores competitivos (Williams CH Jr, 1976).

El mecanismo de acción de esta enzima implica la transferencia de los electrones

desde el NADPH hacia el FAD, luego hacia el FMN y, por último, hacia el grupo hemo del citocromo P-450 (Iyanagi y col., 1981; Vermilion y col., 1981; Kurzban y Strobel, 1986; Shen y col., 1991). Montilva y col., (1988) han demostrado que esta enzima tiene un comportamiento no micaliano para ambos sustratos (NADPH y citocromo P-450) y postularon el mecanismo esquematizado en la Figura 1.7.

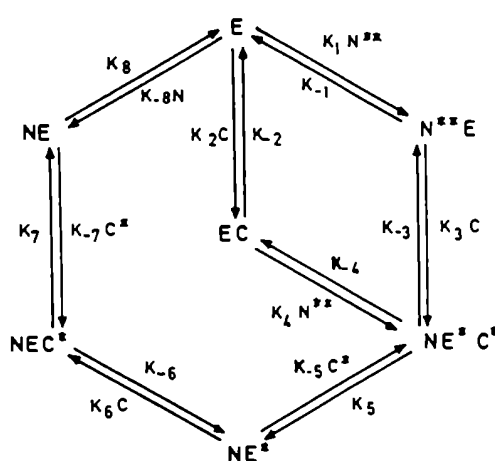


FIGURA 1.7. Mecanismo propuesto para la reducción del citocromo *c* con la reductasa. N^{**}: NADPH; N: NADP⁻; C^{*}: ferrocitocromo *c*; C: ferricitocromo *c* y E: reductasa (Montilva y col., 1988).

Además de la unión inicial del NADPH a la reductasa (N^{**}E), el esquema propuesto incluye la formación posible de un complejo bimolecular de adición entre la reductasa y el citocromo *c* (EC). Ambas rutas llevan a la formación de un complejo ternario compuesto por NADPH, reductasa y citocromo *c* (NE^{*}C^{*}). Una vez que se produjo la transferencia de un electrón hacia el aceptor (citocromo *c*), se libera el producto

de este complejo ternario (citocromo *c* reducido), junto con una forma intermediaria de la enzima, portadora de un electrón que puede ser transferido al aceptor (NE^*). La reducción de una segunda molécula de citocromo *c* está acompañada por la liberación de otra forma intermediaria de la enzima (NE) compuesta de la reductasa en su estado semi-reducido y $NADP^+$, inhibidor reversible de la reductasa. Finalmente, la disociación del último complejo dejará a la enzima en condiciones de ser capaz de iniciar un nuevo ciclo catalítico.

1.4.2. Citocromo P-450.

Antes de ser eliminados, cientos de xeno- y endobióticos sufren una biotransformación, cuya función esencial es aumentar la hidrofiliidad y facilitar, de esta forma, la remoción de la droga del organismo. En el hígado, el metabolismo oxidativo es catalizado por la familia de enzimas del citocromo P-450.

En las reacciones catalizadas por el citocromo P-450, los electrones donados por el NADPH son transferidos a esta hemoproteína a través de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa. Dependiendo del blanco de la posterior transferencia de electrones, dicho citocromo puede catalizar reacciones de oxidación o reducción. En las reacciones oxidativas, los electrones son utilizados para reducir al oxígeno molecular y generar

especies reactivas del oxígeno (ver 1.2.), las que pueden ser luego insertadas en sustratos para dar un producto oxigenado. Por ejemplo, el citocromo P-450 cataliza reacciones de hidroxilación de compuestos alifáticos y aromáticos, *N*-oxidación, *N*-, *S*- y *O*-dealquilación, peroxidación, deaminación, desulfuración y dehalogenación (Goldstein y Faletto, 1993). En las reacciones de reducción, los electrones son utilizados directamente para reducir al sustrato como, por ejemplo, en la reducción de grupos azo, nitro, *N*-óxidos y epóxidos que involucran la transferencia de un electrón (Coon y Vaz, 1987; Goldstein y Faletto, 1993).

Es evidente que estas múltiples funciones deben ser llevadas a cabo en más de un sitio en la molécula, por la misma o diferentes isoenzimas del citocromo P-450 y así poder producir distintos metabolitos. Se ha demostrado que varios citocromos P-450 pueden catalizar reacciones de oxidación que involucran diferentes mecanismos (White y Coon, 1980; Guengerich y Mc Donald, 1984).

Se ha establecido que el citocromo P-450 cataliza el metabolismo de varios sustratos endógenos como esteroides, ácidos grasos y biliares (Kupfer, 1982; Coon y Koop, 1983) e interviene en la conversión de provitaminas a vitaminas activas, las cuales actúan sobre el intestino, hueso y riñón para proveer calcio y fósforo para la mineralización ósea y la actividad neuromuscular. Por ejemplo, durante su metabolismo, la vitamina D₃ es sustrato del citocromo P-450 microsomal hepático y, luego, del mitocondrial del riñón, para ser transformada en vitamina D₃ activa. El citocromo P-450

microsomal hepático también está involucrado en el metabolismo del retinol (vitamina A; Leo y Lieber, 1985), de la vitamina E y de la riboflavina (vitamina B₂; Ohkawa y col., 1983). Otro grupo importante de sustratos del citocromo P-450 está constituido por el ácido araquidónico, las prostaglandinas y los leucotrienos, precursores de la síntesis de prostaciclina y tromboxanos. El ácido araquidónico es oxidado y forma numerosos compuestos con importantes funciones fisiológicas y farmacológicas (Guengerich, 1987).

1.4.3. Factores de regulación.

Existen diferentes factores que pueden operar sobre el sistema mono-oxigenasa de función mixta: inducción, disponibilidad de sustrato, de cofactor y factores de activación o de inhibición. Los eventos metabólicos que influyen en la formación de cofactores juegan un papel muy importante, por ejemplo en el caso del NADPH. La difusión de oxígeno, el transporte de la droga al sitio de unión en el citocromo P-450, como el del NADPH a la flavoproteína actúan como reguladores de la velocidad, aunque de ellos el más importante es la disponibilidad de NADPH, ya que, en condiciones fisiológicas, tanto la difusión de oxígeno como la de la droga parecen no ser factores limitantes.

La inducción de los componentes enzimáticos es una forma leve de regulación. En la mayoría de los casos, no es absolutamente específica para un componente del sistema.

Por ejemplo, el fenobarbital induce varias isoformas del citocromo P-450 (Coon y col., 1977). Entre los compuestos que activan al citocromo P-450 "*in vitro*" se encuentran solventes, iones divalentes, detergentes, poliaminas, esteroides, sustratos, etc. La mayoría de los efectos dependen de la isoenzima y del sustrato en consideración. Algunos compuestos estimulan una actividad e inhiben otras, por ejemplo, la metirapona (Weilbel y col., 1971) o el tricloroetileno (Pessayre y col., 1979).

Un gran número de compuestos inhiben al sistema mono-oxigenasa por unirse al grupo hemo o al sitio de unión del sustrato al citocromo P-450. Otros compuestos requieren ser metabolizados para que la inhibición ocurra. Por ejemplo, el paratién es oxidado a un producto que reacciona con la apoproteína, inhibiendo al citocromo P-450 (Neal y Halpert, 1982).

Los peróxidos lipídicos formados durante la peroxidación de lípidos destruyen rápidamente al citocromo P-450 microsomal hepático (Iba y Mannering, 1987).

Los efectos del cobalto inorgánico han sido estudiados en profundidad (Maines y Kappas, 1974, 1975 y 1976; Chetty y col., 1979). Una inyección de Co^{2+} por vía subcutánea causa la disminución en el contenido de hemo, de citocromo P-450 y en la *N*-demetilación de la etilmorfina. Además hay un aumento en la actividad hemo-oxigenasa y una inhibición inicial seguida de la recuperación en la actividad δ -aminolevulinato sintetasa, enzimas limitantes en la degradación hepática y síntesis del hemo, respectivamente. Estos cambios ocurren rápidamente luego de la inyección de Co^{2+} . De

cualquier manera, los parámetros recién comentados vuelven a la normalidad dentro de las 72 horas.

Se ha observado que la dosis de Co^{2+} necesaria para inducir cambios significativos en el contenido de citocromo P-450 no produce cambios aparentes en la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa (Maines y Kappas, 1975 y 1976).

Los efectos de la administración de cobalto (III) protoporfirina IX (Co-proto), son más sustanciales que los producidos por la inyección de Co^{2+} . Una dosis de Co-proto (125 $\mu\text{moles/kg}$ peso corporal) puede disminuir el contenido microsomal de citocromo P-450 al 25% del valor normal. El contenido de hemo microsomal y la actividad *N*-demetilasa caen a cerca del 50% y 10% del control, respectivamente. La actividad hemo-oxigenasa es aumentada pero, a diferencia del Co^{2+} , la actividad δ -aminolevulinato sintetasa se ve disminuida. Esta combinación, junto con la incapacidad del sistema hemo-oxigenasa de metabolizar la Co-proto, está probablemente relacionada con la severidad de la depleción de citocromo P-450. La actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa se ve disminuida al 50% del control, a diferencia del Co^{2+} (Muhoberac y col., 1989).

Estudios recientes realizados por Ram y Waxman (1992) revelaron que existen factores hormonales que regulan la expresión de los genes del citocromo P-450 en el hígado. Tanto la hipofisectomía como el tratamiento de las ratas con la droga antitiroidea metimazol disminuyen la actividad NADPH citocromo P-450 reductasa en más de un 80% (Ram y Waxman, 1992). Este efecto es revertido sólo después del suministro de la

hormona T_4 pero no ocurre así con otras hormonas pituitario-dependientes (Waxman y col., 1989). Dos mecanismos fueron propuestos para explicar la dependencia de la NADPH citocromo P-450 reductasa de la hormona tiroidea. Primero, la disminución de la actividad enzimática en el estado hipotiroideo involucra la disminución en el ARNm de la enzima, lo cual fue confirmado por Ram y Waxman (1992). Además, es probable que esta forma de regulación abarque también mecanismos transcripcionales y regulación post-transcripcional, como ocurre en el caso de la proteína S14 (Jump, 1989) y la enzima mállica (Song y col., 1988). Segundo, la apoproteína P-450 reductasa recién sintetizada podría ser rápidamente degradada en las ratas hipotiroideas, tal vez como consecuencia de la disminución de la disponibilidad de FMN y FAD, cofactores de esta flavoproteína (Lee y McCormick, 1985). La síntesis de estos cofactores a partir de la riboflavina es estimulada por la hormona tiroidea a través de su efecto sobre la enzima flavokinasa (Rivlin y Langdom, 1969).

1.5. Objetivos

Teniendo en cuenta que, hasta el presente, la quimioterapia de la enfermedad de Chagas es un problema no resuelto, el objetivo de este trabajo de Tesis ha sido estudiar: a) el metabolismo hepático del nifurtimox (NFX), nitrofurano que, hasta el momento, resulta una de las terapias más eficaces contra esta endemia; b) el mecanismo de acción del 5'-nitroindol (NI), un nitrocompuesto heterocíclico. Específicamente se estudió la participación de las enzimas microsomales NADPH-citocromo P-450 reductasa y/o del citocromo P-450 en el metabolismo reductivo del NFX y el efecto del NI sobre la viabilidad, carga energética, peroxidación de lípidos y transporte de Ca^{2+} y K^{+} en microsomas, mitocondrias y hepatocitos de rata, para poder establecer los posibles mecanismos de acción de esta droga. Si bien el NI es utilizado sólo como modelo experimental, la información obtenida en este estudio sería útil para dilucidar el mecanismo de acción de los compuestos nitroheterocíclicos.

El conocimiento de los mecanismos por los cuales estos nitroderivados actúan y sus efectos biológicos en mamíferos, ya sean tóxicos o no, contribuiría a esclarecer cuáles son las estructuras bioquímicas y los procesos metabólicos más comprometidos para así crear mejores fármacos, más efectivos en su acción y menos tóxicos para el huésped mamífero.

MATERIALES

2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se utilizaron ratas macho, cepa Wistar (240-280 g). Los animales se mantuvieron a 24°C sometidos a ciclos de luz y oscuridad de 12 hs de duración y fueron alimentados con Roedores Dieta 3 (dieta similar a Purina) provista por Nutrimentos S.A. (Buenos Aires, Argentina) y agua "*ad libitum*". Dicha dieta contiene un 23% de proteínas y todos los aminoácidos esenciales.

2.2. REACTIVOS.

Colagenasa A (de *Clostridium histolyticum*) fue suministrada por Boehringer Mannheim (GmbH, Alemania); Co-proto fue suministrada por Porphyrin Products Inc., Logan UT, USA; monóxido de carbono fue adquirido a Matheson (East, Rutherford NJ, USA); NFX fue obtenido de Bayer A.G., Leverkusen, Alemania, por cortesía del Dr. A. Haberkorn; NF-derivados fueron sintetizados por Mester y col., (1987) y enviados por la Dra. Claramunt, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, U.N.E.D., 28040, Madrid, España; FCCP fue adquirido a Aldrich Chem. Co., Millwakee, WI, USA); DMFA, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y nitrito de sodio fueron provistos por May & Baker LTD., Dagenham, Inglaterra; cianuro de potasio, CoCl_2 , ditionito de sodio, ferricianuro de potasio, FeCl_3 , KCl , MgCl_2 , NaCl , NaHCO_3 , sulfato amónico ferroso y TCA fueron

adquiridos a Mallinckrodt Chemical Works, New York NY, USA; adrenalina, ascorbato (Na), AADP, albúmina sérica bovina (A-4503), alcohol deshidrogenasa, ATP, ADP (grado IV), juego de reactivos para monitoreo de ATP, azul de Tripán, catalasa (de hígado bovino), citocromo *c* (tipo VI), clotrimazol, DETAPAC, EDTA, EGTA, D-glucosa, G6P, G6PD, GSH, GSSG, HEPES, hidroperóxido de *t*-butilo, L-glutamato, L-malato, malonato, metimazol, MOPS, NADH, NADP⁺, NADPH, diclorhidrato de *N*-(1-naftil) etilendiamina, NFA, NFZ, NI, ácido *p*-aminobenzoico, piruvato de sodio, rotenona, SOD (de eritrocitos bovinos), sacarosa, succinato, sulfamato de amonio, TBA, trizma base y valinomicina fueron adquiridos a Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA. Todos los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico y de la más alta pureza disponible.

MÉTODOS

3.1. EN MICROSOMAS HEPÁTICOS

3.1.1. Tratamiento previo de los animales.

3.1.1.1. Tratamiento con Co-proto.

La solución de Co-proto fue preparada disolviendo la droga en NaOH 0,1 N, agregando HCl para llevar a pH 7,4 y llevando a volumen con solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 25 mM, pH 7,4. Esta solución fue preparada inmediatamente antes de usar.

Las ratas fueron inyectadas por vía subcutánea 72 horas antes del sacrificio con una dosis de 70 μmoles Co-proto/kg de peso corporal (Muhoberac y col., 1989). Los animales control fueron inyectados con un volumen equivalente de solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 25 mM, pH 7,4.

3.1.1.2. Tratamiento con CoCl_2 .

La solución de $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ fue preparada disolviendo la sal en NaCl 0,9% (p/v) y neutralizada con NaOH 0,1 N (Tephly y Hibbeln, 1971). Las ratas fueron inyectadas, en forma subcutánea, con 60 mg CoCl_2 /kg de peso corporal. En estas condiciones, los animales recibieron dos dosis de CoCl_2 , 48 y 24 horas antes del sacrificio. Los animales

control fueron inyectados con un volumen equivalente de NaCl 0,9%.

3.1.1.3. Tratamiento con Metimazol.

Una solución de metimazol 0,025% (p/v) fue preparada disolviendo la droga en el agua de bebida de los animales, la cual les fue suministrada durante 16-24 días tal como fue descrito por Cooper y col. (1984) y Ram y Waxman (1990 y 1992). Los animales control bebieron agua corriente.

3.1.2. Obtención de microsomas hepáticos.

Para la preparación de microsomas hepáticos se utilizaron ratas que ayunaron durante las 24 horas previas al sacrificio por dislocación cervical. Luego se les extrajo el hígado, el cual se lavó con KCl 150 mM, se pesó y homogeneizó según las técnicas habituales con KCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4 en proporción de 4 ml/g hígado. El homogenado se sometió a centrifugación diferencial a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B rotor SS 34. Los núcleos y restos celulares fueron precipitados a 600 g durante 10 min. El sobrenadante fue centrifugado luego a 11000 g durante 15 min para separar las mitocondrias y, finalmente, se separó la fracción microsomal por centrifugación a 105000 g durante 60 min en una ultracentrífuga Beckman L8-70 M, rotor

60 Ti. El sedimento fue resuspendido con KCl 150 mM y centrifugado nuevamente a 105000 g durante 60 min (lavado). Los microsomas así obtenidos (sedimento) se resuspendieron en solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4 (7,5 ml/10 g de hígado) y se utilizaron inmediatamente o fueron conservados en nitrógeno líquido durante los tres primeros meses posteriores a su preparación (Fernández Villamil y col., 1990b).

3.1.3. Actividades y contenidos enzimáticos.

3.1.3.1. Contenido de citocromo P-450.

El citocromo P-450 puede ser bien caracterizado ya que la forma reducida de esta hemoproteína forma un aducto con el monóxido de carbono (CO). Dicho aducto presenta un máximo de absorción a 450 nm (Omura y Sato, 1964). Una suspensión microsomal (2 mg proteína/ml) en solución de fosfatos 0,1 M, pH 7,0 fue dividida en dos cubetas (muestra y referencia) y, luego de reducir ambas cubetas con ditionito de sodio (polvo seco), se registró el espectro de absorción entre 400 y 500 nm (línea de base). Posteriormente, la cubeta "muestra" fue gaseada con CO durante 30 s y se realizó el espectro diferencial del citocromo P-450 reducido-CO contra el citocromo P-450 reducido. Se determinó la variación de absorbancia a 450 - 490 nm en un espec-

trofotómetro Aminco DW-2a™ UV/VIS ($\epsilon_{450-490} = 91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

3.1.3.2. Contenido microsomal de citocromo b_5 .

El contenido de citocromo b_5 es determinado a partir del espectro redox del citocromo b oxidado (Omura y Sato, 1964), cuya reducción es catalizada por la enzima NADH-citocromo b_5 reductasa, una flavoproteína microsomal. La suspensión microsomal (2 mg proteína/ml) en solución de fosfatos 0,2 M, pH 7,4 fue reducida en presencia de NADH 2% (p/v) (Lake, 1987). Se midió la variación de absorbancia entre el máximo a 424 nm y el mínimo a 409 nm del espectro redox entre 400 y 500 nm en un espectrofotómetro Aminco DW-2a™ UV/VIS, ($\epsilon_{424-409} = 185 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

3.1.3.3. Actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa.

La actividad de esta enzima microsomal se determinó utilizando citocromo c como aceptor de electrones. El método se basa en medir la reducción del citocromo c (Fe^{3+}) a citocromo c (Fe^{2+}), el cual, a diferencia de la forma oxidada, presenta un máximo de absorción característico a 550 nm. La mezcla de incubación contenía microsomas (0,1 mg proteína/ml), citocromo c 50 μM y cianuro de potasio 1,2 mM en solución de fosfatos 0,1 M, pH 7,5 (volumen final= 3,0 ml) y a 25°C. El cianuro de potasio se agregó para

prevenir errores ocasionados por la posible contaminación mitocondrial en la suspensión microsomal. La reacción se inició con el agregado de NADPH 0,4 mM. Luego se registró el aumento de absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Aminco DW-2a™ UV/VIS. La velocidad inicial de reducción del citocromo *c* se calculó utilizando un coeficiente $\epsilon_{550} = 21 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Williams y Kamin, 1962; Lake, 1987).

3.1.3.4. Actividad NADH-citocromo *b*₅ reductasa.

La actividad enzimática de esta flavoproteína fue medida utilizando NADH como dador de electrones y ferricianuro de potasio como aceptor. El medio de reacción contenía microsomas (0,1 mg proteína/ml) y ferricianuro de potasio 1 mM en solución de fosfatos 0,1 M, pH 7,5 (volumen final= 3,0 ml). La reacción se inició con el agregado de NADH 0,1 mM. Las medidas se realizaron a 25°C. La reducción del ferricianuro de potasio se siguió espectrofotométricamente a 420 nm en un espectrofotómetro Aminco DW-2a™ UV/VIS. Para calcular la velocidad inicial de reducción del ferricianuro de potasio se utilizó un $\epsilon_{420} = 1,02 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Mihara y Sato, 1978).

3.1.3.5. Peroxidación de lípidos.

La peroxidación lipídica fue determinada en presencia de NADPH - ADP/Fe³⁺. En

estas condiciones, la iniciación de la lipoperoxidación es un proceso enzimático dependiente de la presencia de la enzima NADPH citocromo P-450 reductasa microsomal (Svingen y col., 1979). El medio de reacción contenía microsomas (1,5 mg de proteína/ml) en solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4, una mezcla de ADP/ Fe^{3+} (ADP 1,7 mM y FeCl_3 0,1 mM) preparada previamente por separado, DMFA o droga (la concentración final se menciona en Resultados) y sistema generador de NADPH (NADP⁺ 0,55 mM; G6P 5,5 mM; MgCl_2 5,5 mM y 3,5 U de G6PD).

Las incubaciones se realizaron en Erlenmeyer de 25 ml, tapados, a 37°C, con agitación (90 ciclos/min) y bajo atmósfera de aire durante 60 min en un incubador New Brunswick Girotory Water Bath Shaker modelo G 76 (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison NJ, USA). El volumen final de incubación fue 3,0 ml. Las drogas a ensayar se agregaron disueltas en DMFA y las muestras testigo recibieron el mismo volumen de solvente, cuya concentración final no excedió el 1% (v/v). La DMFA no afectó la formación de peróxidos lipídicos.

Luego de cada incubación las muestras se enfriaron en hielo y se determinó el MDA formado cuantificando las sustancias que reaccionan con el TBA (Placer y col., 1966). A 1,0 ml de cada muestra se agregó 1,0 ml de HCl 25% (v/v) para precipitar las proteínas. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min en una centrífuga refrigerada Sorvall RT 6000 a 4°C. Para determinar el MDA formado se extrajo 1,0 ml de sobrenadante de cada muestra, al que se le agregó 1,0 ml de TBA 0,8% (p/v) en NaOH

0,05 N y luego se incubó a 100°C durante 15 min para el desarrollo del cromóforo. Una vez que las muestras fueron enfriadas en hielo, se les midió la densidad óptica a 535 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer 550 S UV/VIS. Para los cálculos se usó un $\epsilon_{535} = 1,56 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

3.1.3.6. Consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno se midió polarográficamente utilizando un electrodo de Clark en un oxígrafo Gilson modelo 5/6 (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin, USA). Los ensayos se realizaron a 30°C en un sistema que contenía microsomas (1,1 mg de proteína/ml) en solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4; sistema generador de NADPH (tal como fue descrito en el punto 3.1.3.5.) y DMFA o droga (la concentración final se menciona en Resultados). Otras condiciones experimentales se especifican en la leyenda de las tablas y figuras correspondientes.

3.1.3.7. Generación de anión superóxido.

La oxidación irreversible de la adrenalina a adrenocromo por acción del O_2^- es uno de los métodos más difundidos para medir la generación de este radical (Misra y Fridovich, 1972). Las determinaciones realizadas con este método se llevaron a cabo en

un espectrofotómetro de doble haz Aminco DW-2a™ UV/VIS al par 485-575 nm. El medio de reacción contenía microsomas (0,27 mg proteína/ml), adrenalina 1 mM, sistema generador de NADPH (tal como fue descrito en el punto 3.1.3.5.) y DMFA o droga (la concentración final se menciona en Resultados) en solución Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4 (volumen final= 3,0 ml). Luego de iniciar la reacción con G6PD se midió, a 30°C, la velocidad de producción de O₂⁻ durante el primer minuto de reacción (Cadenas y col., 1977). La adición de SOD fue siempre de 6 U/ml. Para los cálculos se utilizó un coeficiente de extinción $\epsilon_{485-575} = 2,96 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

3.1.3.8. Formación de peróxido de hidrógeno.

La formación de H₂O₂ dependiente de NADPH fue medida según una modificación del método del ferritocianato (Thurman y col., 1972). La mezcla de reacción (volumen final 3,0 ml) contenía microsomas (2 - 4 mg proteína/ml), sistema generador de NADPH (tal como fue descrito en el punto 3.1.3.5.), DMFA o droga (la concentración final se menciona en Resultados) y azida sódica 5 mM o catalasa (6 U/ml) en solución Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4. La reacción fue iniciada por el agregado del sistema generador de NADPH. Las incubaciones se realizaron en Erlenmeyers de 25 ml tapados, a 37°C y con agitación (90 ciclos/min) durante 10 o 20 min en un incubador New Brunswick Girotory Water Bath Shaker modelo G 76. Luego se agregó TCA

(concentración final= 0,6 M) para frenar la reacción. Después de remover la proteína precipitada por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min y a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall RT 6000, se tomaron alícuotas de 1,0 ml de sobrenadante, a las que se les agregó 0,2 ml de sulfato amónico ferroso 10 mM y 0,1 ml de tiocianato de potasio 2,5 M. La absorbancia del complejo rojo del ferritiocianato formado en presencia de peróxidos fue medida a 480 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer 550 S UV/VIS. Para los cálculos se utilizó una curva estándar de H₂O₂.

3.1.4. Reducción microsomal del NFX.

La metabolización del NFX por los microsomas de hígado de rata se determinó espectrofotométricamente a través de la disminución de absorbancia a 406 nm (máximo de absorción del NFX) en un espectrofotómetro Aminco DW-2a™ UV/VIS. Se midió la variación de la densidad óptica a 406 nm ($\epsilon_{406} = 14,8 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). La mezcla de reacción (volumen final= 3,0 ml) contenía microsomas (1,5 mg de proteína/ml) y NFX 100 μM en solución Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4. La reacción se inició por el agregado de NADPH 0,6 mM. Todas las medidas se efectuaron a 30°C.

3.1.4.1. Efecto de la concentración de nitrofurano.

Para determinar la relación existente entre la velocidad de reducción microsomal del NFX y la concentración de nitrofurano en el medio de reacción se utilizaron las mismas condiciones de medida explicadas en el punto 3.1.4. pero en presencia de concentraciones variables de NFX (entre 0 y 100 μM). Para los cálculos se consideró la variación de la absorbancia a 406 nm en el primer minuto de reacción ($\epsilon_{406} = 14,8 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

3.1.4.2. Efecto de la concentración de proteína microsomal.

Para establecer la relación existente entre la velocidad de reducción microsomal del NFX en función de la cantidad de proteína microsomal presente en el medio se utilizaron las condiciones experimentales mencionadas en el punto 3.1.4. pero en presencia de cantidades variables de proteína microsomal (entre 0 y 0,6 mg de proteína). Al igual que en el punto anterior, para los cálculos se consideró la variación de la absorbancia a 406 nm en el primer minuto de reacción ($\epsilon_{406} = 14,8 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

3.1.4.3. Efecto de la anaerobiosis.

Para establecer qué efecto produce la anaerobiosis sobre la reducción microsomal del NFX los ensayos se realizaron en las condiciones descritas en el punto 3.1.4. excepto

que se utilizaron cubetas para anaerobiosis y, previo a cada determinación, la mezcla de reacción fue gaseada con argón o nitrógeno (libres de O₂) durante 5 min.

3.1.4.4. Efecto de la inactivación del citocromo P-450.

En los ensayos de inhibición del citocromo P-450 la reducción del NFX se midió en cubetas para anaerobiosis y de la manera descrita en el punto 3.1.4. pero gaseando la mezcla de reacción con monóxido de carbono durante los 5 min previos a la determinación.

3.1.4.5. Efecto de los inhibidores de la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa y del citocromo P-450.

3.1.4.5.1. Clotrimazol.

El clotrimazol inhibe al citocromo P-450 (Rogerson y col., 1977). Los microsomas

(1,8-2,0 mg de proteína/ml) se incubaron durante cinco minutos a temperatura ambiente en presencia de clotrimazol 33 μM y NFX 100 μM . Luego, la reducción del NFX se inició por el agregado de NADPH 0,6 mM y se registró la variación de absorbancia a 406 nm.

3.1.4.5.2. Aminopiridina adenina dinucleótido fosfato (AADP).

Este compuesto análogo del NADP^+ es un inhibidor competitivo de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa (Ebel, 1981). Se determinó el efecto del AADP sobre la velocidad de reducción del NFX 100 μM y AADP (0,4 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína microsomal). Luego de la incubación a temperatura ambiente durante 10 min, la reducción del NFX fue iniciada por el agregado de NADPH 0,6 mM ($\epsilon_{406} = 14,8 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

3.1.5. Aislamiento y caracterización de los productos de la reducción microsomal del NFX.

3.1.5.1. Espectros de absorción.

Con el objeto de hallar el o los posibles productos del metabolismo del NFX se registró, a distintos tiempos, el espectro de absorción de luz visible (350-600 nm), de una mezcla de reacción que contenía microsomas (0,6 mg de proteína/ml) y NFX 100 μ M en solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4. La reacción se inició en presencia de NADPH 0,6 mM (tiempo cero). Otras condiciones experimentales y de medida se especifican en la leyenda de las figuras correspondientes.

3.1.5.2. Detección de aminas.

Para establecer si existe producción de aminas aromáticas como resultado de la reducción microsomal del NFX se utilizó el método del ácido 4-aminobenzoico (Rafii y col., 1991). El sistema contenía: 0,1 ml de microsomas (21,22 mg de proteína/ml); 0,6 ml solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4 y NFX 50 μ M o 100 μ M. La reacción se largó en presencia de NADPH 0,6 mM y se incubó a 30°C durante 3 y 24 horas. 0,3 ml de cada tubo fueron acidificados con TCA 0,21% (concentración final). Se

agregó nitrito de sodio a las mezclas (concentración final 0,007% v/v) para formar la sal de diazonio y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Luego se agregó sulfamato de amonio (concentración final = 0,04% v/v) para neutralizar el nitrito de sodio. Posteriormente a la incubación durante 3 min a temperatura ambiente se adicionó diclorhidrato de *N*-(1-naftil)etilendiamina (NEDD) (concentración final 0,35% v/v). La sal de diazonio formada con el grupo amino se acopla con el NEDD en soluciones acídicas y produce un complejo rojo-púrpura. La densidad óptica de la mezcla fue medida, a 540 nm, empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer 550 S UV/VIS. La cantidad de ácido 4-aminobenzoico formado fue calculada a partir de una curva estándar realizada con ácido *p*-aminobenzoico.

3.1.5.3. Cromatografía en placa delgada.

Este método fue utilizado para aislar los productos de la reducción microsomal del NFX. Para ello los microsomas fueron incubados previamente con el nitrofurano en un sistema de reacción que contenía: microsomas (6 mg proteína/ml), NFX 1 mM, sistema generador de NADPH (tal como fue descrito en el punto 3.1.3.5.) en solución Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4, en un volumen final de 200 μl . La incubación se realizó a 34°C durante 0, 1, 2, 3 y 24 horas con agitación (90 ciclos/min) en un incubador New Brunswick Girotry Water Bath Shaker modelo G 76.

La reacción fue frenada de dos formas diferentes:

1) Se sumergieron los tubos en agua a 100°C y luego se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min en una centrifuga Eppendorf 5414.

2) Se realizó una extracción clorofórmica agregando a cada tubo 0,2 ml de cloroformo, se agitó y la fase orgánica (inferior) se separó con pipeta Pasteur. Luego la muestra fue concentrada por evaporación del solvente burbujeando con argón.

Seguidamente, 20 µl del sobrenadante o 5 µl del concentrado orgánico fueron sembrados en placas para cromatografía en placa delgada Baker Si 250 F TLC plate (J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ, USA). El solvente de corrida fue acetona:acetato de etilo 2:3 (v/v) en ambos casos.

Los resultados fueron observados bajo lámpara de UV (Tsai, 1987).

3.1.5.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para analizar los productos de la reducción microsomal del NFX 50 µM, los microsomas fueron incubados en presencia del nitrofurano. La mezcla de reacción contenía: microsomas (1,5 mg de proteína/ml) y NFX 50 µM en solución Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4. La reacción fue iniciada por el agregado de NADPH 0,6 mM. Después de 2 hs de incubación a 37°C la muestra fue tratada tal como fuera descrito por Reed y col. (1980). Los microsomas se precipitaron por centrifugación

a 105000 g y a 4°C durante 45 min en una ultracentrífuga Beckman L8-70 M, rotor 60 Ti. Las proteínas presentes en 0,5 ml de sobrenadante fueron precipitadas por agregado de 25 µl de ácido perclórico 70% (v/v) y posterior centrifugación a 10000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5414. El sobrenadante se neutralizó con NaHCO₃ (40 mg de polvo seco) y se filtró con filtros de nylon de 0,22 µm (Micro Separations, Inc., Flanders RD, Westboro, USA). La muestra filtrada fue utilizada en el análisis por HPLC, para lo cual se empleó un cromatógrafo HPLC Pharmacia LKB VWM 2141 conectado a un detector espectrofotométrico y una columna Spherisorb 250 x 4 mm (5 µm, Pharmacia, Suecia). La fase móvil fue metanol 70% (v/v) y la velocidad de flujo fue de 0,6 ml/min. La elución de la columna fue seguida espectrofotométricamente a las longitudes de onda indicadas en la leyenda de las figuras correspondientes.

3.1.5.5. Espectrometría de masa.

Se realizó gracias a la colaboración del Dr. Gross, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

3.2. EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS.

3.2.1. Preparación de mitocondrias.

Para el aislamiento de mitocondrias hepáticas se utilizaron ratas ayunadas durante las 24 hs previas, tal como fue descrito por Johnson y Lardy (1967), empleando sacarosa 0,24 M y EDTA 1 mM en solución Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 como medio de homogeneización y en proporción de 9 ml/g de hígado. El homogenado fue sometido a centrifugación diferencial a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B, rotor SS-34. Los núcleos y restos celulares fueron precipitados a 600 g durante 10 min. El sobrenadante fue centrifugado luego a 6800 g durante 10 min. Después de realizar un lavado en la centrífuga a 6800 g con el medio de homogeneización, las mitocondrias fueron resuspendidas en el mismo medio, a una concentración de 20-25 mg de proteína/ml y fueron utilizadas en el día del aislamiento. Cuando fue necesario, las mitocondrias se rompieron por congelamientos y descongelamientos sucesivos (3 veces) en nitrógeno líquido.

3.2.2. Medida de la velocidad de respiración.

La velocidad de respiración fue medida polarográficamente empleando un oxígrafo

Gilson modelo 5/6 (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin, USA) provisto de un electrodo de Clark a 30°C. Para la respiración mitocondrial, la mezcla estándar de reacción (1,8 ml) contenía mitocondrias (1,0-2.0 mg de proteína/ml); sacarosa 0,24 M; KCl 34 mM; MgCl₂ 5 mM; EDTA 0,9 mM; Tris-HCl 9 mM y solución Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 6 mM, pH 7,4. Salvo otra indicación, las concentraciones de sustrato utilizadas fueron las siguientes: L-malato 5 mM; L-glutamato 5 mM (más malonato 2,5 mM) o succinato 10 mM (más rotenona 3 μM) y NADH 2,5 mM. La velocidad de respiración mitocondrial fue medida en el estado metabólico "3" después del agregado de ADP 0,5 mM. El índice de control respiratorio fue calculado según:

$$\text{Índice de control respiratorio (ICR)} = \frac{\text{estado "3"}}{\text{estado "4"}}$$

3.2.3. Determinación del aumento del volumen mitocondrial.

El aumento del volumen mitocondrial inducido por Ca²⁺ o K⁺ fue medido a 30°C siguiendo el cambio de absorbancia de la suspensión mitocondrial a 540 nm (Boveris y Stoppani, 1971), con un espectrofotómetro Perkin Elmer 550 S UV/VIS. La mezcla de reacción contenía 0,4 mg de proteína mitocondrial/ml y DMFA o droga (tipo y concentraciones en las leyendas de las tablas y figuras correspondientes) en solución de sacarosa 0,1 M; KCl 50 mM; MOPS 20 mM; KH₂PO₄ 0,2 mM; pH 7,2. Los sustratos

agregados fueron: L-malato 1,7 mM; L-glutamato 1,7 mM (más malonato 0,8 mM) o succinato 5 mM (más rotenona 0,8 μ M). En el primer caso (inducción por Ca^{2+}) la reacción se inició en presencia de CaCl_2 120 μ M, se frenó con EGTA 0,1 mM y la recuperación mitocondrial se determinó después del agregado de ATP 2,5 mM y MgCl_2 5 mM. Cuando el aumento del volumen mitocondrial fue inducido por K^+ el medio de reacción descrito contenía valinomicina 80 nM. La reacción se disparó con el agregado de ATP 2 mM y la contracción mitocondrial se realizó en presencia de FCCP 2 μ M (Pressman, 1969). La velocidad del aumento del volumen mitocondrial fue calculada a partir de la pendiente de los trazados correspondientes y es expresada como $\Delta A^{540} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg de proteína})^{-1}$. El aumento máximo fue calculado como la diferencia entre la absorbancia lograda después de su estabilización y el valor de absorbancia obtenido antes del agregado de Ca^{2+} o de ATP.

3.2.4. Estado redox de los citocromos.

El estado redox de los citocromos ($\underline{c} + \underline{c}_1$) y \underline{b} fue determinado utilizando un espectrofotómetro Aminco DW 2aTM UV/VIS a 30°C (Chance, 1957). El sistema de reacción contenía mitocondrias (0,5 mg de proteína/ml); DMFA o droga (tipo y concentraciones en las leyendas de las tablas y figuras correspondientes) en sacarosa 0,24 M; KCl 34 mM; MgCl_2 5 mM; EDTA 0,9 mM; Tris-HCl 9 mM y solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$

KH_2PO_4 6 mM, pH 7,4. El sustrato utilizado fue succinato 5 mM (más rotenona 3 μM). En el caso de los citocromos ($\underline{c} + \underline{c}_1$), la absorbancia fue medida a 552 nm, un valor intermedio entre las absorbancias máximas de los citocromos \underline{c} (550 nm) y \underline{c}_1 (553 nm)(Chance, 1957). El citocromo \underline{b} fue determinado al par 430-410 nm, máximo y mínimo de la banda de Soret (Chance, 1957).

3.2.5. Actividad ATPasa latente.

La actividad F_1-F_0 ATPsintasa ATPasa mitocondrial fue medida a 30°C en una mezcla de incubación conteniendo ATP 3 mM; MgCl_2 4 mM; EGTA 0,25 mM en solución Tris-HCl 0,15 M (pH 7,6) en un volumen final de 1,0 ml. La reacción fue iniciada por el agregado de las mitocondrias (0,32 - 0,68 mg de proteína/ml). Después de 20 min de incubación la reacción se frenó agregando 0,1 ml de TCA 50% (p/v). La concentración de ortofosfato presente en el medio fue determinada por el método de Fiske y Subbarow (1925).

3.2.6. Peroxidación de lípidos.

La peroxidación lipídica mitocondrial se determinó midiendo la formación de sustancias reactivas al TBA. El medio de reacción contenía: mitocondrias (1,5 mg

proteína/ml) en solución Tris-HCl 50 mM - KCl 150 mM, pH 7,4, suplementada con NADH 2,5 mM o EDTA/Fe (III) 0,11/0,10 mM más NADH 2,5 mM, como se indica en Resultados. Las incubaciones (volumen final = 3 ml) se realizaron durante 60 min. en Erlenmeyer de 25 ml, a 37°C, con agitación (90 ciclos/min) y bajo atmósfera de aire en un incubador New Brunswick Girotory Water Bath Shaker, modelo G70. El tratamiento posterior de la muestra fue igual al descrito en el punto 3.1.3.5., al describir la metodología aplicada para determinar la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos.

3.2.7. Microscopía electrónica.

Los estudios de microscopía electrónica fueron realizados con la colaboración de la Dra. Amanda Pellegrino de Iraldi y colaboradores, Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, UBA.

Las mitocondrias (2,28 mg de proteína mitocondrial/ml) fueron incubadas durante 60 min en presencia de NI 200 μ M o CG 10-248 100 μ M. Las incubaciones (volumen final = 3 ml) se realizaron en Erlenmeyer, a 37°C, con agitación (90 ciclos/min) y bajo atmósfera de aire en un incubador New Brunswick Girotory Water Bath Shaker modelo G 76 (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison NJ, USA). Al igual que en experimentos anteriores, las drogas se agregaron disueltas en DMFA y las muestras testigo recibieron el mismo volumen de solvente, cuya concentración final no excedió el 1%

(v/v). Terminada la incubación, las mitocondrias aisladas fueron procesadas de acuerdo con los siguientes procedimientos:

1- Osmiofilia post-glutaraldehído: 1,0 ml de incubado fue fijado con 1,0 ml de glutaraldehído 3% en buffer de fosfato 0,2 M, pH 7,3-7,4 durante toda la noche, lavado con el mismo buffer adicionado con sacarosa 0,32 M durante 30 min (3 cambios de 10 min c/u) y refijado durante 2 hs en O₄Os al 1,5% en el mismo buffer. Todo el procedimiento se hizo a 0,4°C.

2- Reacción Uran-afin: 1,0 ml de incubado fue fijado con 1,0 ml de glutaraldehído 3% en buffer de fosfato 0,2 M, pH 7,3-7,4 durante toda la noche, lavado con NaCl 0,9% en agua bidestilada durante 30 min (3 cambios de 10 min c/u) seguido de la inmersión en acetato de uranilo al 4% en agua bidestilada (pH 3,22). Todo el procedimiento se hizo a 0,4°C.

Las muestras resultantes fueron deshidratadas en alcoholes de graduación creciente, pasadas por óxido de propileno e incluidas para microscopía electrónica. Los cortes finos fueron teñidos con citrato de plomo y observados y fotografiados con un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I o un Zeiss 109.

3.3. EN CÉLULAS HEPÁTICAS.

3.3.1. Aislamiento de hepatocitos.

Para el aislamiento de hepatocitos se utilizaron ratas no ayunadas, las cuales fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (5 mg/100 g de peso corporal). Las células hepáticas fueron aisladas según el método de Seglen (1973). Después de cateterizar la vena porta, el hígado fue perfundido "*in situ*" durante 10 min a una velocidad de 40 ml/min con un medio libre de Ca^{++} [Medio A (mM): HEPES, 10; NaCl, 135; KCl, 6,7 y glucosa, 5; pH 7,4], saturado con O_2 y mantenido a 37°C. Luego el hígado fue extraído y perfundido durante 10 min en un sistema de recirculación a 37°C con 90 ml de medio A al que se le agregó $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (5 mM) y colagenasa A (50 mg/100 ml) (medio B). Antes de usar, la solución de colagenasa fue filtrada con filtro Metricel™ GA-6 0,45 μm (Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, Michigan, USA). El pH del sistema fue mantenido en 7,4 por el agregado de 100 μl de NaOH 1 N 4 min después del comienzo de la recirculación. El medio B fue reemplazado por medio A durante 2 min para eliminar la colagenasa remanente y las células rotas. El hígado fue transferido a una cápsula de porcelana que contenía 30 ml de medio B. Las células fueron rápidamente dispersadas con un peine de acero inoxidable. Los vasos y tejido conectivo fueron descartados. Luego de la filtración por Nytrell TI 500 (Ets Desjobert, París, Francia), la

suspensión de hepatocitos fue incubada durante 4 min a 37°C y filtrada nuevamente con un filtro de nylon (150 µm)(Filtration Armentières, París, Francia). Dicha suspensión de hepatocitos fue diluida con 120 ml de medio C conteniendo (mM): NaCl, 130; KCl, 5,2; MgSO₄, 0,9; CaCl₂·2 H₂O, 0,12; Tris, 20 y solución Na₂HPO₄-KH₂PO₄, 3; pH 7,4, saturado con O₂ y centrifugada a 300 rpm durante 90 s; el sobrenadante fue descartado. Los hepatocitos fueron resuspendidos en 50 ml de medio C y fueron sedimentados durante 10 min a 0°C. Luego de descartar el sobrenadante, el sedimento obtenido (suspensión purificada de hepatocitos) fue resuspendido en medio C (hasta obtener una concentración de aproximadamente 5 x 10⁶ cél/ml). Dicha suspensión fue filtrada a través de filtro de nylon (60 µm) y mantenida sobre hielo en frascos de cultivo (25 cm² de área)(Falcon, Div. Becton, Dickinson and Co., Oxnard, California, USA) durante las 4 hs posteriores al aislamiento. Las suspensiones celulares utilizadas contenían más del 85% de células que excluyeron el azul de Tripán y la actividad LDH en el sobrenadante fue menor al 10% de la actividad LDH total (después de la lisis de las células).

3.3.2. Determinación de la viabilidad celular.

La viabilidad de una suspensión de hepatocitos puede ser determinada a partir del número de células que excluyen el azul de Tripán, o por la liberación de enzimas citosólicas al medio extracelular.

3.3.2.1. Ensayo de exclusión del azul de Tripán.

Teniendo en cuenta que, en toda célula viva, la membrana plasmática funciona como una barrera de permeabilidad selectiva que permite el flujo de ciertas sustancias desde y hacia el interior de la misma, la viabilidad celular de una suspensión celular puede ser calculada a partir del número de células que excluyen una solución de azul de Tripán al 0,2% (p/v). Para ello se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión celular (diluida convenientemente para facilitar el conteo) y azul de Tripán 0,4% (p/v) en NaCl 0,9% (p/v) (pH 7,4). Las células fueron contadas al microscopio utilizando una cámara de Neubauer.

3.3.2.2. Liberación de la actividad LDH al medio extracelular.

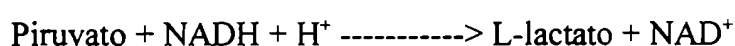
El daño de la membrana celular permite la salida al medio extracelular de ciertas enzimas citosólicas como la LDH, cuya actividad puede ser medida tanto en el medio extracelular (actividad enzimática liberada) como en el medio intracelular. El daño o la toxicidad celular pueden ser expresados en valores absolutos como un aumento de actividad enzimática en el medio extracelular, o como una disminución de la misma en el medio intracelular, o bien en porcentaje de liberación enzimática como:

$$\% \text{Actividad LDH} = \frac{\text{Actividad enzimática liberada}}{\text{Actividad enzimática total (liberada + intracelular)}} \times 100$$

$$\%Viabilidad\ celular = 100\% - \%Actividad\ LDH$$

La reacción bioquímica en la que se encuentra implicada esta enzima es la siguiente:

LDH



La concentración de LDH presente en las muestras es proporcional a la concentración de NAD^+ , el cual se cuantifica espectrofotométricamente a 340 nm.

En los experimentos en los que se midió viabilidad celular en función del tiempo de incubación se determinó la actividad LDH en el medio extracelular de acuerdo con el método de Thor y col., (1978). La muestra utilizada fue preparada de la siguiente manera: 0,3 ml de la mezcla de incubación fueron homogeneizados con 0,1 ml de solución Krebs-Henseleit (mM: NaCl, 118; KCl, 4,8; KH_2PO_4 , 0,96 mM; MgSO_4 , 1,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,5; NaHCO_3 , 23,8; pH 7,4) conteniendo glucosa 5 mM (muestra) o 0,1 ml de deoxicolato de sodio 2% (p/v). La actividad LDH fue determinada espectrofotométricamente a 340 nm y a 30°C en un medio de reacción que contenía 2,5 ml de piruvato de sodio 1,09 mM en solución Krebs-Henseleit conteniendo albúmina 2% (p/v), pH 7,4 y 50 μl de muestra. La reacción se inició con el agregado de 50 μl de NADH 10,4 mM. El 100% de actividad LDH (0% de viabilidad celular) fue determinado en la suspensión celular tratada con

deoxicolato de sodio 0,5% (p/v).

3.3.3. Incubación de hepatocitos en aerobiosis.

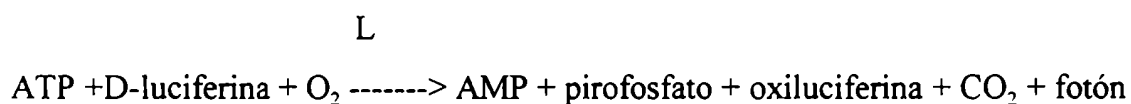
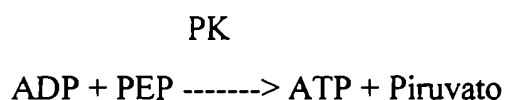
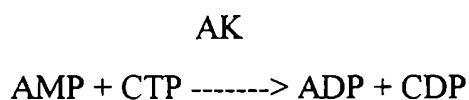
La suspensión de hepatocitos previamente obtenida fue diluida a una concentración de 3×10^6 cél/ml con medio Krebs-Henseleit suplementado con glucosa 5 mM (Högberg y col., 1975). Las muestras (por duplicado) se incubaron en Erlenmeyer de 25 ml y con los agregados que se indican en Resultados. Las incubaciones se realizaron en un incubador New Brunswick Girotory Water Bath Shaker modelo G 76, a 37°C, con agitación (90 ciclos/min) y bajo atmósfera de carbógeno ($O_2:CO_2$ 95:5). Las drogas, disueltas en DMFA fueron agregadas a tiempo cero. Las muestras control recibieron el mismo volumen de solvente, cuya concentración nunca superó el 1% (v/v). Luego, tal como se indica en Resultados se tomaron alícuotas de las mezclas de incubación a los tiempos indicados para la determinación de los parámetros bioquímicos celulares.

3.3.4. Determinación de los parámetros bioquímicos celulares.

3.3.4.1. Niveles de adenín nucleótidos, relación ATP/ADP y balance energético.

Los niveles de ATP, ADP y AMP en hepatocitos fueron monitoreados por el

método de luciferina-luciferasa (L) (Lundin y col., 1976 y 1986) en una misma determinación, ya que el ADP y el AMP son convertidos en ATP por las reacciones de la piruvato y adenilato kinasas (PK y AK, respectivamente) según las siguientes reacciones:



Los fotones emitidos fueron contados utilizando un luminómetro Packard modelo Pico Lite.

Después de la incubación aeróbica de hepatocitos a los tiempos indicados, las muestras (0,2 ml) se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5414. El sobrenadante se descartó y el sedimento resultante se congeló y descongeló 3 veces en nitrógeno líquido para lograr la ruptura total de las células. Éstas fueron luego resuspendidas en el medio de extracción (0,1 ml TCA 5% (p/v)) y centrifugadas nuevamente. El sobrenadante fue utilizado para la determinación de los

adenín nucleótidos. 0,01 ml del sobrenadante fueron agregados a 0,3 ml de solución Tris-acetato (Tris 0,1 M - EDTA 2 mM - Acetato de potasio 1 M, pH 7,75). Luego de 30 segundos a temperatura ambiente se cuentan los fotones emitidos durante 1 min. (blanco: lectura Bl).

Seguidamente, se continuó con las siguientes etapas:

1- agregado de 0,1 ml del reactivo de monitoreo de ATP (luciferina-luciferasa 20 mg/ml en solución Tris-acetato, se agitó y se midió la emisión de luz durante 1 min: nivel de ATP: lectura A;

2- agregado de 0,01 ml de reactivo PEP-PK [mezclar volúmenes iguales de fosfoenolpiruvato (PEP) 0,2 M, pH 6,0 y PK 100 U/ml en glicerol 50%], mezclar y medir la emisión de luz luego de 1 min: nivel de ATP + ADP: lectura B;

3- agregado de 0,01 ml de reactivo AK-CTP [9 volúmenes de AK 5 mg/ml en sulfato de amonio, centrifugada y dializada contra buffer Tris-acetato diluido 10 veces + 1 volumen citidina tri-fosfato (CTP) 250 mM]. Medir la emisión de luz luego de 5 min: niveles de ATP + ADP + AMP: lectura C;

4- agregado de 0,01 ml de ATP estándar (ATP 10 μ M en agua destilada), agitar y leer la emisión de luz luego de 1 min (lectura D).

$$\text{ATP (muestra)} = \frac{(A-BI) \times 0,1 \text{ nmol}}{D-C-BI}$$

$$\text{ATP + ADP (muestra)} = \frac{(B-BI) \times 0,1 \text{ nmol}}{D-C-BI}$$

$$\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP (muestra)} = \frac{(\text{C-BI}) \times 0,1 \text{ nmol}}{\text{D-C-BI}}$$

Para realizar los cálculos, se debe tener en cuenta el factor de dilución empleado.

Una vez hallados los niveles de adenosín nucleótidos se realizaron los siguientes cálculos:

- Relación ATP/ADP: es el cociente entre el contenido de ATP y el contenido de AMP de una muestra;
- Balance energético o carga energética de adenilatos (Atkinson, 1968): tiene una importante función regulatoria de actividades enzimáticas y del metabolismo celular. Revela cuánta energía posee la célula.

$$\text{Balance energético} = \frac{\text{ATP} + 0,5 \text{ ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}$$

3.3.4.2. Peroxidación de lípidos.

En hepatocitos aislados la peroxidación lipídica fue determinada midiendo la formación "*in vitro*" de las sustancias TBA-reactivas, esencialmente como fue descrito por Stacey y Kappus (1982). Los hepatocitos fueron incubados en solución Krebs-Henseleit (pH 7,4) suplementado con glucosa 5 mM o medio Hank's-Hepes (pH 7,4), suplementado con glucosa 1% (p/v) y albúmina 1,5% (p/v) y DMFA o droga según se

indica en Resultados. Las incubaciones se realizaron tal como se describió en el punto 3.3.3., a 37°C, con agitación y bajo atmósfera de carbógeno. A los tiempos indicados se tomaron muestras (1,0 ml) de la mezcla de incubación a las que se les agregó 0,67 ml de TCA 20% (p/v). Después de centrifugar a 3000 rpm durante 15 min y a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall RT 6000, se tomó 1,0 ml de sobrenadante, al que se le agregó 0,33 ml de TBA 0.67% (p/v) en NaOH 0,05 N. Las muestras fueron calentadas a 100°C durante 15 min y enfriadas en baño de hielo. La absorbancia de la mezcla fue medida a 532 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer 550S UV/VIS. La cantidad de sustancias TBA-reactivas fue calculada utilizando un coeficiente de extinción $\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

3.3.4.3. Consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno en hepatocitos se midió en un oxígrafo Gilson modelo 5/6 (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin, USA), utilizando un electrodo de Clark. Los ensayos se realizaron a 30°C y el medio de reacción contenía: hepatocitos (6×10^5 cél/ml) en solución Krebs-Henseleit suplementada con HEPES 12,5 mM, pH 7,4 (Rossi y col., 1986) y DMFA o droga (concentraciones en las leyendas de las tablas y figuras correspondientes).

3.3.5. Incubación de los hepatocitos en anaerobiosis.

Las incubaciones anaeróbicas de hepatocitos se realizaron en Erlenmeyers tapados, a 37°C y con agitación (90 ciclos/min) en un incubador New Brunswick Girotory Water Bath Shaker modelo G 76. La mezcla de reacción contenía: hepatocitos ($1 - 4 \times 10^6$ cél/ml) en solución Krebs-Henseleit suplementada con glucosa 5 mM, pH 7,4 y DMFA o droga en las concentraciones descritas en la leyenda de las figuras correspondientes. Para asegurar la anaerobiosis desde el comienzo de la reacción la suspensión a incubar fue gaseada con N₂ (libre de O₂) durante los 90 s previos al inicio de la incubación.

Se sacaron alícuotas a distintos tiempos, las cuales fueron inmediatamente procesadas para el análisis por HPLC o conservadas a -20°C (no más de una semana) hasta su posterior utilización.

3.3.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El tratamiento de la muestra previo al pasaje por columna de HPLC fue realizado según el método descrito por Reed y col. (1980) con las modificaciones que se mencionan a continuación. La muestra proveniente de la incubación de los hepatocitos con droga fue centrifugada durante 4 min a 7000 rpm y a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B rotor SS 34. El sedimento resultante se resuspendió con 2,0 ml

de NaCl 0,9% (p/v), se centrifugó en las condiciones descriptas (lavado) y se resuspendió nuevamente en 1,0 ml de NaCl 0,9% (p/v). Las proteínas fueron precipitadas con el agregado de 50 μ l de ácido perclórico 70% (v/v) y separadas por centrifugación a 7000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue neutralizado con NaHCO₃ (40 mg de polvo seco) y filtrado con filtros de nylon de 0,22 μ m (Micro Separations Inc., Flanders RD, Westboro, MA, USA). La muestra filtrada fue utilizada en el análisis por HPLC, para lo cual se empleó un cromatógrafo HPLC Pharmacia LKB VWM 2141 conectado a un detector espectrofotométrico y una columna Spherisorb 250 x 4 mm (5 μ m, Pharmacia, Suecia). La fase móvil fue metanol 70% (v/v) y la velocidad de flujo fue de 0,6 ml/min. La elución de la columna fue seguida espectrofotométricamente a las longitudes de onda indicadas en la leyenda de las figuras correspondientes.

3.4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

La concentración de proteínas se determinó en las preparaciones de mitocondrias y microsomas por el método de Biuret modificado por Gornall (Gornall y col., 1949) en presencia de deoxicolato de sodio 0,1% (v/v). Se utilizó como estándar una solución de albúmina sérica bovina.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cuando los valores presentados fueron el promedio de medidas realizadas por duplicado, los valores experimentales se desviaron de la media en menos del 5%. Cuando se realizaron más de 2 determinaciones, los valores presentados representan el promedio \pm error estándar de la media. Los análisis estadísticos se realizaron usando el test "t" de Student para muestras no apareadas. Se considera $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Salvo otra indicación el efecto de la droga fue calculado tomando como valor control el valor hallado en la muestra que contiene DMFA en iguales condiciones experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. METABOLISMO MICROSOMAL HEPÁTICO DE LOS NITROFURANOS.

El grupo nitro de un nitrocompuesto puede ser reducido por un electrón y formar el radical nitroanión (RNO_2^- , Figura 4.1), en presencia de NADPH como dador de equivalentes de reducción y en una reacción catalizada por la enzima microsomal NADPH-citocromo P-450 reductasa (Masana y col. 1984a y 1984b; Minchin y col. 1986; Wong y Agrawal, 1988).

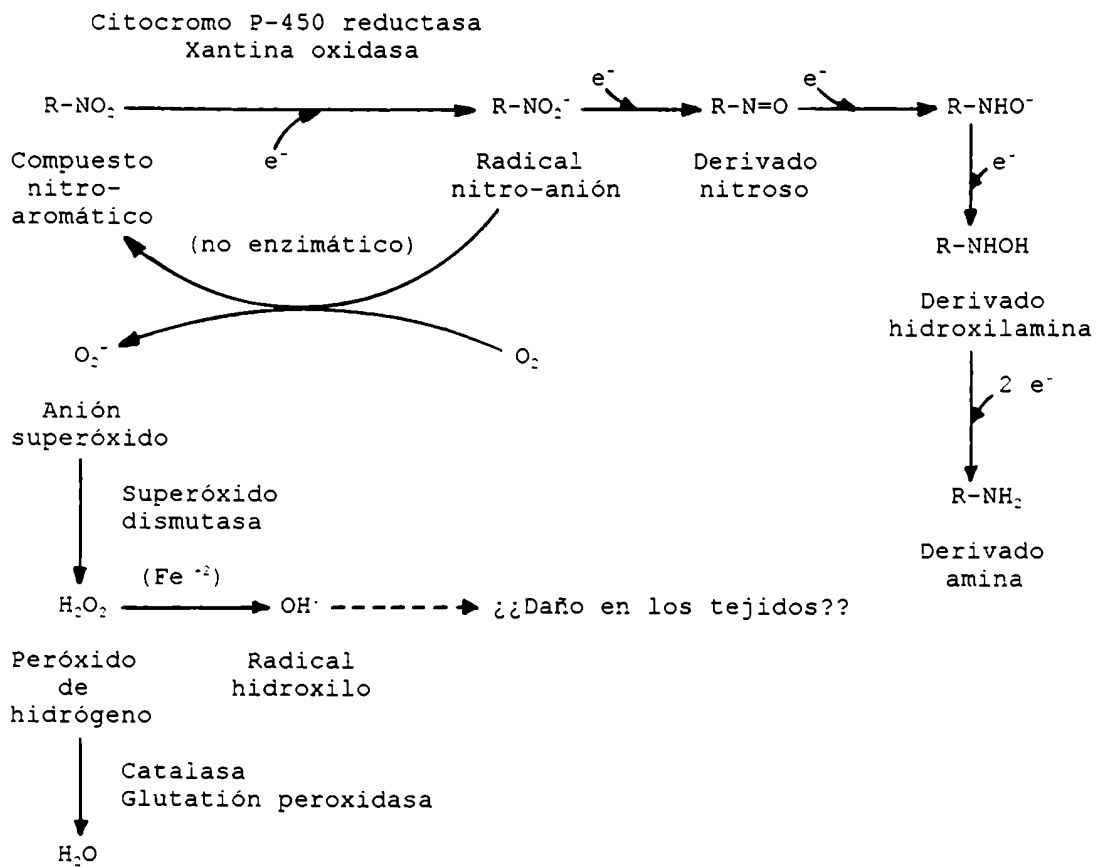


FIGURA 4.1. Metabolismo propuesto para la reducción de los nitrocompuestos aromáticos (Minchin y col., 1986).

En presencia de oxígeno, el radical nitroanión puede reoxidarse y regenerar el nitrocompuesto original R-NO₂ (Figura 4.1). Es por ello que la formación del radical nitroanión sólo es detectable en anaerobiosis por espectrometría de resonancia paramagnética electrónica (Figura 4.2)(Docampo y col., 1981a; Fernández Villamil y col., 1990a). En estas condiciones, dicho radical nitroanión puede dar origen a formas más reducidas y muy tóxicas como los derivados nitroso e hidroxilamina (Figura 4.1).

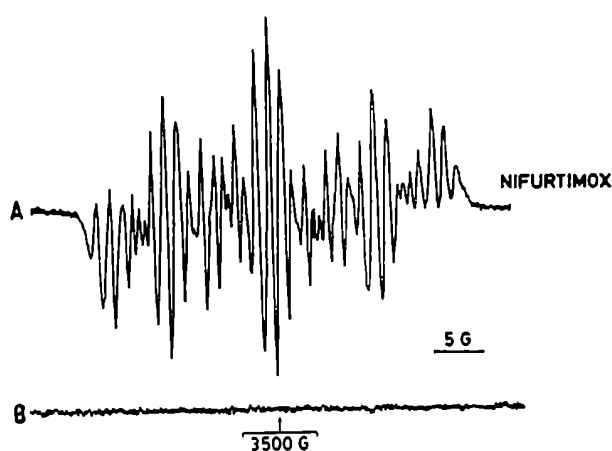


FIGURA 4.2. Espectro de resonancia paramagnética electrónica del radical nitroanión correspondiente al Nifurtimox. A: Nifurtimox; B: muestra Control (tomado de Fernández Villamil y col., 1990a).

Con el objeto de dilucidar si el citocromo P-450 y/o la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa participan en la reducción del radical nitroanión a otras formas más reducidas, se estudió, en microsomas de hígado de rata, el efecto de inhibidores *"in vivo"*

e "*in vitro*" de dicho citocromo P-450 y/o de la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa sobre el metabolismo reductivo del nitrofurano antichagásico nifurtimox (NFX).

Para ello, se utilizaron:

a) los siguientes inhibidores "*in vivo*":

- del citocromo P-450: Cobalto-protoporfirina IX (Co-proto) (Muhoberac y col., 1989) y CoCl_2 (Tephly y Hibbeln, 1971);

- de la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa: Co-proto y Metimazol (Muhoberac y col., 1989; Ram y Waxman, 1992);

b) los siguientes inhibidores "*in vitro*":

- del citocromo P-450: monóxido de carbono y clotrimazol (Omura y Sato, 1964; Rogerson y col., 1977; Lemaire y Livingstone, 1994);

- de la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa: aminopiridina adenina dinucleótido fosfato (AADP) (Ebel, 1981; Lemaire y Livingstone, 1994).

4.1. Contenido de citocromos y actividades enzimáticas microsomales.

Para estudiar la participación del citocromo P-450 hepático en el metabolismo reductivo de los nitrofuranos, se emplearon microsomas de hígado de ratas tratadas previamente con Co-proto, CoCl_2 o Metimazol. La administración de estas drogas a los

animales produce disminución en el contenido microsomal de citocromo P-450 (Co-proto y CoCl_2) y/o en la actividad enzimática NADPH-citocromo P-450 reductasa (Co-proto y Metimazol) de los microsomas hepáticos (Muhoberac y col., 1989; Tephly y Hibbeln, 1971; Ram y Waxman, 1992).

La Tabla 4.1 muestra el efecto de los distintos tratamientos sobre el contenido de citocromos P-450 y b_5 y/o sobre las actividades enzimáticas NADPH-citocromo P-450 y NADH-citocromo b_5 reductasa, en microsomas hepáticos.

El contenido de citocromo P-450 disminuyó aproximadamente un 65% (microsomas Co-proto; $p < 0,001$) y 47% (microsomas CoCl_2 ; $p < 0,001$), respecto del valor obtenido con microsomas de animales que sólo recibieron el vehículo de cada droga utilizada (microsomas Control; Tabla 4.1). En cambio, en los microsomas Metimazol se encontró un incremento del 25% ($p < 0,025$) en el contenido de citocromo P-450, respecto de los microsomas Control (Tabla 4.1).

En los microsomas aislados de ratas previamente tratadas con Co-proto y CoCl_2 , el contenido de citocromo b_5 cayó un 33% ($p < 0,001$) y un 18% ($p < 0,05$) (respectivamente) del valor hallado con microsomas Control (Tabla 4.1). El porcentaje de disminución obtenido en el contenido de citocromo b_5 fue menor que el porcentaje de disminución hallado en el contenido de citocromo P-450. Estos resultados concordaron con lo descrito por Tephly y Hibbeln (1971) y Drummond y Kappas (1982). Sin embargo, en el caso de los microsomas Metimazol se obtuvo un estímulo del 75%

($p < 0,001$) en el contenido microsomal de citocromo b_5 (Tabla 4.1).

TABLA 4.1. Efecto del tratamiento previo de los animales sobre el contenido de citocromos y actividades enzimáticas en microsomas de hígado de rata.

Microsomas	Contenido de citocromos		Actividades enzimáticas	
	citocromo P-450 (nmol x mg prot ⁻¹)	citocromo b_5	NADPH cit P-450 reductasa $\left(\frac{\text{nmol cit } c}{\text{min x mg prot}}\right)$	NADH cit b_5 reductasa $\left(\frac{\text{umol FeCNK}}{\text{min x mg prot}}\right)$
Control	0,95 ± 0,04	0,45 ± 0,02	90,67 ± 6,81	4,53 ± 0,46
Co-proto	0,34 ± 0,04 ^e	0,30 ± 0,02 ^d	51,66 ± 3,19 ^d	3,32 ± 0,40
CoCl ₂	0,50 ± 0,05 ^e	0,37 ± 0,02 ^a	89,65 ± 9,54	3,64 ± 0,30
Metimazol	1,19 ± 0,08 ^a	0,79 ± 0,05 ^e	59,06 ± 2,34 ^d	6,82 ± 0,79 ^a

Los datos son valores promedio ± E.S.M. de, por lo menos, cuatro determinaciones independientes. Las condiciones experimentales se describen en Métodos.

*: $p < 0,05$; ^b: $p < 0,025$; ^d: $p < 0,005$; ^e: $p < 0,001$ respecto del valor obtenido en ausencia de tratamiento previo del animal.

En la Tabla 4.1 se puede ver también que la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa se encontró reducida a un 57% (microsomas Co-proto, $p < 0,005$) y a un 65% (microsomas Metimazol, $p < 0,05$) del valor obtenido con microsomas Control, mientras

que el tratamiento previo de los animales con CoCl_2 no produjo modificaciones significativas en esta actividad enzimática.

La actividad NADH-citocromo b_5 reductasa no sufrió alteraciones significativas ni por el tratamiento previo de los animales con Co-proto ni por el tratamiento previo con CoCl_2 (Tabla 4.1). En cambio, los microsomas Metimazol mostraron un incremento de 1,5 veces ($p < 0,05$) en dicha actividad enzimática, respecto de la actividad obtenida con microsomas Control (Tabla 4.1).

4.2. Consumo de oxígeno y generación de anión superóxido.

Teniendo en cuenta que los nitrofuranos, al ser metabolizados en el hígado, riñón, miocardio, cerebro y testículo (Docampo y col., 1981a y 1981b; Moreno y col., 1980 y 1982; Vroomen y col., 1987c; Hoogenboom y col., 1992 y 1994) pueden dar origen a un ciclo redox donde se consume O_2 y se genera anión superóxido (O_2^-) (Figura 4.1), se analizó el efecto de distintos nitrofuranos (NFX, NFA y NFZ) sobre el consumo de O_2 y la producción de O_2^- utilizando las distintas preparaciones microsomales estudiadas (Tablas 4.2 y 4.3).

La Tabla 4.2 muestra el efecto de los nitrofuranos de importante aplicación clínica NFX, NFA y NFZ sobre el consumo microsomal de O_2 en las cuatro

preparaciones experimentales utilizadas: Co-proto, CoCl_2 , Metimazol y Control.

TABLA 4.2. Efecto de los nitrofuranos sobre el consumo de oxígeno microsomal.

Muestra	Consumo de oxígeno (nmol O_2 x min^{-1} x mg proteína $^{-1}$)			
	Microsomas Control	Microsomas Co-proto	Microsomas CoCl_2	Microsomas Metimazol
Testigo	12,66±1,78	6,42±1,29 ^a	9,28±2,15	4,43±1,35 ^b
NFX	16,59±1,72 (31)	10,23±2,14 ^a (59)	11,36±1,89 (22)	6,81±0,54 ^d (54)
NFA	21,87±2,30¶(73)	11,37±2,57 ^b (77)	14,74±1,94 (59)	11,48±3,50 ^a (159)
NFZ	22,33±2,19§ (76)	12,50±2,20‡ ^b (95)	17,05±1,21* (84)	12,72±1,69 ^b (187)

El consumo de oxígeno se midió durante 4 a 5 min. Los nitrofuranos (100 μM) se agregaron disueltos en DMFA; todas las muestras recibieron igual volumen de solvente, cuya concentración final nunca excedió el 1% (p/v). Testigo: muestra que contenía DMFA. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos. Los valores representan la media \pm E.S.M. de, por lo menos, cuatro determinaciones independientes. Entre paréntesis, % de estímulo del consumo de O_2 respecto de la muestra testigo en la misma preparación microsomal. †: $p < 0,05$; ‡: $p < 0,025$; §: $p < 0,005$ respecto de la preparación de microsomas Control; *: $p < 0,05$; ¶: $p < 0,01$; §: $p < 0,005$; ‡: $p < 0,001$ respecto de la muestra testigo en la misma preparación microsomal.

Cuando se comparó el consumo de oxígeno obtenido con los microsomas provenientes de ratas que recibieron los distintos tratamientos respecto del hallado con los microsomas Control se observó que:

- en las muestras testigo (muestras que contenían DMFA, solvente de los nitrofuranos), correspondientes a los microsomas Co-proto, CoCl_2 y Metimazol, el consumo de O_2 fue igual al 51% ($p < 0,05$), 73% y 35% ($p < 0,025$), respectivamente, del O_2 consumido por los microsomas Control en las mismas condiciones experimentales (Tabla 4.2).
- en presencia de los nitrofuranos estudiados (NFX, NFA o NFZ), el oxígeno consumido por los microsomas Co-proto o Metimazol fue significativamente menor que el consumido por los microsomas Control en las mismas condiciones experimentales ($p < 0,05$; Tabla 4.2);
- no se encontraron diferencias significativas al comparar el consumo de oxígeno de la muestra testigo correspondiente a los microsomas CoCl_2 y el oxígeno consumido por los microsomas Control en iguales condiciones experimentales (Tabla 4.2);
- tampoco se hallaron diferencias significativas en la cantidad de oxígeno consumido por los microsomas CoCl_2 en presencia de NFX o de NFA y el oxígeno consumido por los microsomas Control en iguales condiciones experimentales (Tabla 4.2);
- en presencia de NFZ, el consumo de oxígeno producido por los microsomas CoCl_2 fue significativamente menor que el obtenido empleando microsomas Control ($p < 0,05$; Tabla 4.2).

La determinación del consumo de O_2 en presencia de nitrofuranos reveló que, tanto el nifurtimox (NFX) como la nitrofurantoína (NFA) y la nitrofurazona (NFZ) produjeron un estímulo significativo del consumo de oxígeno en cada una de las cuatro

preparaciones microsomales estudiadas, respecto del O_2 consumido por la muestra testigo correspondiente a la misma preparación microsomal (Tabla 4.2). La Figura 4.3 muestra el efecto de la concentración de NFX sobre el consumo microsomal de O_2 . Se observa que existe correlación ($r=0,99$) entre la concentración de NFX presente en el medio y el consumo microsomal de O_2 . Los otros nitrofuranos estudiados dieron resultados similares (datos no presentados).

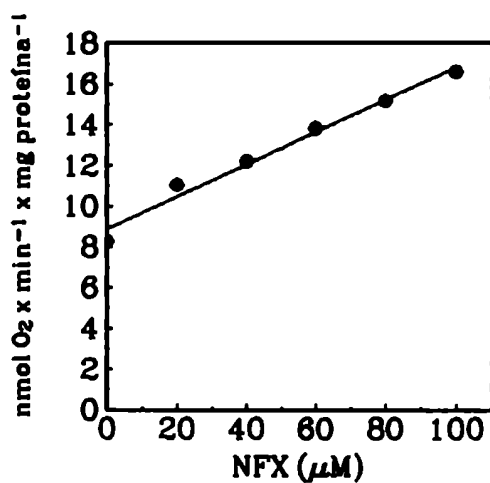


FIGURA 4.3. Consumo de oxígeno microsomal en función de la concentración de NFX. Se midió el consumo de oxígeno polarográficamente en un sistema de reacción que contenía microsomas (1,1 mg de proteína/ml), sistema generador de NADPH y distintas concentraciones de NFX en solución Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 23 mM - KCl 130 mM, pH 7.4. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos.

La Tabla 4.3 muestra el efecto de NFX, NFA y NFZ sobre la generación de O_2^- en las cuatro preparaciones microsomales estudiadas: Co-proto, $CoCl_2$, Metimazol y Control.

En ausencia de nitrofurano (muestras testigo), el O_2^- generado por los microsomas de animales pre-tratados con Co-proto, $CoCl_2$ o Metimazol fue significativamente menor que el O_2^- producido por los microsomas Control (Tabla 4.3).

En cada una de las preparaciones microsomales estudiadas, el agregado de nitrofurano (NFX, NFA o NFZ) al medio de reacción estimuló significativamente la producción de O_2^- , respecto de la muestra testigo correspondiente (Tabla 4.3). El estímulo (número de veces) de la generación de O_2^- producido por cada nitrofurano, respecto de la muestra testigo se muestra, entre paréntesis, en la Tabla 4.3. La cantidad de O_2^- producido por los microsomas Co-proto o Metimazol fue significativamente menor ($p < 0,05$) que la obtenida con los microsomas Control, en las mismas condiciones experimentales (Tabla 4.3). En cambio, no se encontraron diferencias significativas al comparar, para cada uno de los nitrofuranos estudiados, la generación de O_2^- obtenida con microsomas $CoCl_2$ y la producida por los microsomas Control (Tabla 4.3).

TABLA 4.3. Efecto de los nitrofuranos sobre la producción microsomal hepática de anión superóxido.

Muestra	Generación de O_2^- (nmol O_2^- x min ⁻¹ x mg proteína ⁻¹)			
	Microsomas Control	Microsomas Co-proto	Microsomas CoCl ₂	Microsomas Metimazol
Testigo	2,23±0,08	0,59±0,18 ^e	0,33±0,13 ^e	0,94±0,07 ^e
NFX	11,56±2,46‡ (5)	3,89±0,53§ ^a (7)	9,47±1,54‡ (29)	4,96±1,45* (5)
NFA	16,28±2,53‡ (7)	6,80±1,41§ ^a (11)	13,51±1,26‡ (41)	7,53±2,00* ^a (8)
NFZ	17,11±2,75‡ (8)	5,73±0,53‡ ^b (10)	15,29±2,00‡ (46)	8,45±2,44* ^a (9)

El O_2^- fue determinado por el método del adrenocromo según se detalla en Métodos. Los valores fueron obtenidos luego de restar a cada uno el valor hallado en las mismas condiciones experimentales pero en presencia de 6 U/ml de SOD y corresponden al primer minuto de incubación. Muestra testigo: control de droga que contenía DMFA. Concentración de nitrofurano: 100 μ M. Los valores representan la media \pm E.S.M. de, por lo menos, cuatro determinaciones independientes. Entre paréntesis, estímulo (número de veces) respecto de la muestra testigo correspondiente a la misma preparación microsomal. *: $p < 0,05$; ^b: $p < 0,025$; ^c: $p < 0,001$ respecto de los microsomas Control; ^a: $p < 0,05$; §: $p < 0,005$; ‡: $p < 0,001$ respecto de la muestra testigo correspondiente a la misma preparación microsomal.

La omisión de NADPH o de microsomas a la mezcla de reacción o el agregado de SOD previno la formación del adrenocromo, confirmando de esta forma la generación de O_2^- .

Los resultados correspondientes a la generación de O_2^- se correlacionaron con los obtenidos previamente en el consumo de O_2 utilizando las mismas preparaciones

experimentales (Tablas 4.2 y 4.3).

4.3. Producción de peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno es una especie no radical resultante de la adición de un segundo electrón al anión superóxido (Figura 4.1; Reacción 4, pág. 15) (Halliwell y Gutteridge, 1984; Brunori y Rotilio, 1984). Debido a que el O_2^- se forma como consecuencia del ciclo redox de los nitrofuranos, nos pareció interesante estudiar el efecto de los mismos sobre la producción de peróxido de hidrógeno. La Tabla 4.4 muestra la producción de H_2O_2 obtenida con cada una de las preparaciones microsomales estudiadas y en presencia de los diferentes nitrofuranos.

La producción microsomal hepática de peróxido de hidrógeno disminuyó significativamente en los microsomas Co-proto, $CoCl_2$ y Metimazol (Tabla 4.4), comparada con la obtenida con microsomas Control. En las muestras testigo, los nmoles H_2O_2 producidos por mg de proteína microsomal cayeron un 71% (microsomas Co-proto), 67% (microsomas $CoCl_2$) y 55% (microsomas Metimazol). El agregado de nitrofurano (100 μM) al medio de incubación produjo un incremento significativo de la formación de H_2O_2 , respecto de la muestra testigo correspondiente. Dicho aumento, expresado en número de veces, fue, en los microsomas Control, de 1,3 (NFX); 2,2

(NFA) y 2,6 (NFZ); en los microsomas Co-proto, de 2,8 (NFX); 4,3 (NFA) y 4,9 (NFZ); en los microsomas CoCl₂, de 3,6 (NFX); 5,5 (NFA) y 6,0 (NFZ) y, en los microsomas Metimazol, de 2,4 (NFX); 3,6 (NFA) y 4,1 (NFZ). Estos resultados se correlacionaron con los obtenidos al medir el consumo de oxígeno y la generación de anión superóxido (Tablas 4.2 y 4.3).

TABLA 4.4. Efecto de los nitrofuranos sobre la producción microsomal hepática de peróxido de hidrógeno.

Muestra	Producción de H ₂ O ₂ (nmol H ₂ O ₂ x mg proteína ⁻¹)			
	Microsomas Control	Microsomas Co-proto	Microsomas CoCl ₂	Microsomas Metimazol
Testigo	242,83±18,17	71,48±13,17 ^e	79,68±29,26 ^b	109,67±4,02 ^e
NFX	562,53±72,94†	274,34±46,38§ ^a	364,49±34,62†	260,95±16,84‡ ^c
NFA	765,15±39,22‡	377,02±47,88‡ ^d	516,70±75,52* ^a	394,91±20,66‡ ^e
NFZ	873,86±98,73§	420,77±14,23‡ ^b	560,90±54,20†	445,76±24,74‡ ^d

El H₂O₂ fue medido por el método del ferritocianato tal como se describe en Métodos. Muestra testigo: control de droga que contenía DMFA. Concentración de nitrofurano: 100 µM. Los valores representan el promedio ± E.S.M. de, por lo menos, tres determinaciones independientes realizadas por duplicado.

*: p<0,05; ^b: p<0,025; ^c: p<0,001 respecto de los microsomas Control; †: p<0,05; §: p<0,005; ‡: p<0,001 respecto de la muestra testigo correspondiente a la misma preparación microsomal.

4.4. Peroxidación de lípidos inducida por NADPH-Fe.

La exposición de las membranas biológicas al estrés oxidativo resulta en una degeneración progresiva de su estructura y en la pérdida de su actividad (Dubin y col., 1990b; Halliwell y col., 1992). Por ello, se decidió analizar el efecto de los nitrofuranos productores de estrés oxidativo sobre la peroxidación de lípidos utilizando las distintas preparaciones microsomales estudiadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.5.

En ausencia de nitrofurano (muestras testigo), los microsomas Co-proto o Metimazol e incubados en presencia de sistema generador de NADPH y complejo ADP-Fe³⁺, produjeron el 62% (microsomas Co-proto; p<0,001) y el 68% (microsomas Metimazol; p<0,01) de las sustancias reactivas al TBA producidas por los microsomas Control (Tabla 4.5). En las mismas condiciones experimentales, los microsomas CoCl₂ produjeron el 83% de las sustancias que reaccionan con el TBA, no habiéndose encontrado diferencia significativa respecto del valor hallado con los microsomas Control (Tabla 4.5).

En todas las preparaciones microsomales estudiadas, el agregado de los nitrofuranos NFX, NFA y NFZ a la mezcla de reacción inhibió significativamente la peroxidación lipídica microsomal, respecto de la muestra testigo correspondiente (Tabla 4.5).

TABLA 4.5. Efecto de los nitrofuranos sobre la peroxidación de lípidos en microsomas hepáticos incubados con sistema generador de NADPH y complejo ADP-Fe³⁺.

Muestra	Sustancias TBA-reactivas (nmoles MDA/mg proteína)			
	Microsomas Control	Microsomas Co-proto	Microsomas CoCl ₂	Microsomas Metimazol
Testigo	37,86±2,39	23,29±1,36 ^e	31,48±1,64	25,67±3,18 ^c
NFX	28,55±2,75†(25)	16,68±1,42§ ^d (28)	20,30±0,79‡ ^b (36)	14,33±2,27† ^d (44)
NFA	22,11±2,79‡(42)	10,91±1,08‡ ^d (53)	8,31±1,05‡ ^d (74)	8,29±1,94‡ ^d (68)
NFZ	24,56±2,87§(35)	9,19±1,27‡ ^d (61)	11,59±1,39‡ ^e (63)	10,04±2,14§ ^d (61)

La peroxidación lipídica se midió tal como se describe en Métodos. Muestra testigo: control de droga que contenía DMFA. Concentración de nitrofurano: 100 µM. Los valores representan el promedio ± E.S.M. de, por lo menos, seis determinaciones independientes realizadas por duplicado. Entre paréntesis, % de inhibición de la peroxidación de lípidos respecto del valor de la muestra testigo correspondiente a la misma preparación microsomal. ^b: p<0,025; ^c: p<0,01; ^d: p<0,005; ^e: p<0,001 respecto de los microsomas Control; †: p<0,025; §: p<0,005; ‡: p<0,001 respecto de la muestra testigo correspondiente a la misma preparación microsomal.

4.5. Reducción del nifurtimox por microsomas hepáticos.

Estudios previos realizados por Docampo y col., (1981a) y Fernández Villamil (1990) revelaron que los microsomas de hígado de rata son capaces de reducir al grupo nitro del NFX. Para estudiar el metabolismo reductivo de dicho nitrofurano, se analizó

la actividad nitro-reductasa microsomal hepática en función de:

- la concentración de NFX (sustrato) presente en el medio de reacción;
- la concentración de proteínas microsomales presente en el sistema.

También se analizó el efecto de:

- el dador de los equivalentes de reducción (NADH o NADPH);
- la administración de inhibidores "*in vivo*" del citocromo P-450 y/o de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa;
- el agregado al medio de reacción de distintos inhibidores "*in vitro*" de la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa o del citocromo P-450 sobre la velocidad de reducción del NFX.

La actividad nitro-reductasa microsomal hepática, medida a través de la velocidad de reducción del NFX, se determinó registrando la desaparición de la absorbancia del nifurtimox a $\lambda = 406$ nm (máximo de absorción del NFX; Figura 4.4) en función del tiempo de incubación y en un sistema de reacción que contenía microsomas, NFX y NADPH como dador de equivalentes de reducción.

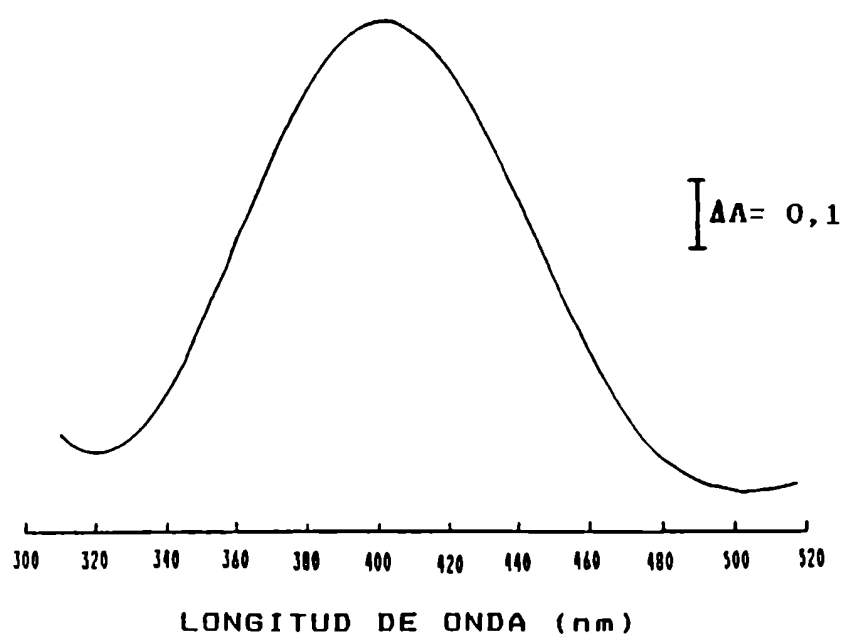


FIGURA 4.4. Espectro de absorción del NFX. Se realizó el espectro de una solución de NFX 100 μ M en Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos.

4.5.1. Efecto de la concentración de NFX.

Teniendo en cuenta que los nitrofuranos son metabolizados por el sistema microsomal hepático se realizaron los siguientes experimentos para establecer la relación existente entre la velocidad de reducción microsomal del NFX y la concentración del mismo en el medio de reacción. La Figura 4.5 muestra las gráficas de la velocidad de reducción del NFX en función de la concentración de sustrato (NFX), para cada una de

las preparaciones microsomales estudiadas (Control, Co-proto, CoCl_2 y Metimazol).

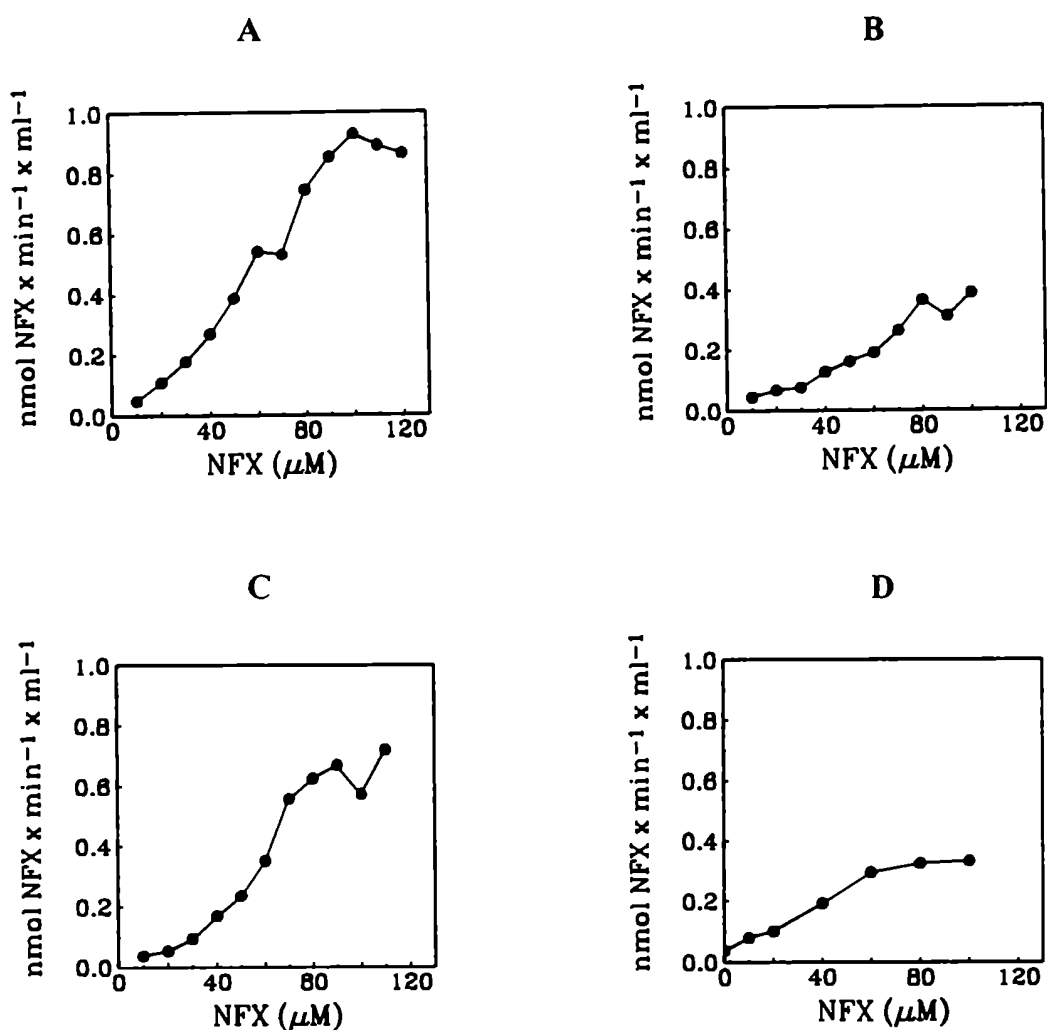


FIGURA 4.5. Reducción microsomal del NFX en función de la concentración de ese nitrofurano presente en el medio de reacción. Se midió espectrofotométricamente la variación de absorbancia a 406 nm. La mezcla de reacción contenía: microsomas (0,67 mg de proteína/ml) y concentraciones variables de NFX en solución Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 23 mM - KCl 130 mM. pH 7,4. La reacción se inició con el agregado de NADPH 600 μM . A: microsomas Control; B: microsomas Co-proto; C: microsomas CoCl_2 ; D: microsomas Metimazol. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos.

En todos los casos, las curvas obtenidas fueron de tipo sigmoide, indicando que la o las proteínas involucradas en la catálisis se desvían del comportamiento predicho por el modelo cinético de Michaelis-Menten (Figura 4.5). Es necesario notar que la curva correspondiente a microsomas Control mostró una región plana (NFX 70-80 μM) que separa dos zonas: una, de comportamiento aparentemente sigmoide (zona 1; NFX < 70 μM) y la otra, con un comportamiento similar al michaeliano (zona 2; NFX > 80 μM ; Figura 4.5 A), lo cual fue confirmado calculando los parámetros cinéticos. Se encontró, además, que todos los sistemas enzimáticos estudiados fueron saturados por el sustrato NFX a concentraciones de nitrofurano entre 80-90 μM . Concentraciones de NFX superiores a 100 μM produjeron la inhibición de la reacción. Estos resultados concordaron con los obtenidos por Holtzman y col. (1981) e İřcan (1993) al estudiar el metabolismo reductivo de la NFA, donde la inhibición de la reducción de este nitrofurano se produjo a concentraciones de NFA superiores a 100 μM .

La Tabla 4.6 muestra los parámetros cinéticos K_M , $V_{\text{máx}}$, $S_{0,5}$ y n , calculados a partir de las gráficas de Lineweaver-Burk o de las gráficas de Hill, para cada una de las preparaciones microsomales estudiadas. En los microsomas Co-proto, CoCl_2 y Metimazol se observó la disminución de la $V_{\text{máx}}$ y de $S_{0,5}$, acompañada por un aumento en el coeficiente de Hill (n), respecto de los valores obtenidos con microsomas Control.

TABLA 4.6. Parámetros cinéticos de la actividad nitro-reductasa microsomal hepática en presencia de NFX como sustrato.

Microsomos	Parámetros cinéticos		
	$V_{\text{máx}}$	$S_{0,5}$	n
Control (zona 1)	16,70	0,630	1,27
Control (zona 2)	16,70	1,67*	1,17
CoCl ₂	1,30	0,083	2,60
Co-proto	0,50	0,076	2,72
Metimazol	0,34	0,040	2,07

La actividad nitro-reductasa se determinó en la forma descrita en Métodos.; $V_{\text{máx}}$: velocidad máxima; $S_{0,5}$: concentración de sustrato que corresponde a $V_{\text{máx}}/2$; n: coeficiente de Hill.*: K_M (constante de Michaelis-Menten). Los valores se expresan en: mM (K_M y $S_{0,5}$); nmol x min⁻¹ x ml⁻¹ ($V_{\text{máx}}$). K_M y $V_{\text{máx}}$ fueron calculados a partir de las gráficas de Lineweaver-Burk; $S_{0,5}$ y n fueron calculados a partir de las gráficas de Hill resultantes de las curvas de velocidad en función de la concentración de sustrato (NFX) (Figura 4.5).

4.5.2. Efecto de la concentración de proteína microsomal.

Cuando se estudió la velocidad de reducción del NFX en presencia de distintas

concentraciones de proteína microsomal se encontró que, dentro del rango de concentraciones de proteína utilizada (entre 0 y 1,2 mg de proteína/ml):

- la raíz cuadrada de la velocidad de reducción del NFX fue directamente proporcional a la concentración de proteína presente en el medio (Figura 4.6), sugiriendo que la reacción es de segundo orden en concentración de NFX. Estos resultados concordaron con los obtenidos por Holtzman y col. (1981) e İşcan (1993) al estudiar el metabolismo reductivo de la NFA;

- al comparar las pendientes de las rectas de regresión obtenidas para cada una de las preparaciones microsomales, no se encontraron diferencias significativas entre la pendiente de la recta obtenida con microsomas CoCl_2 y la correspondiente a los microsomas Control (Figura 4.6). En cambio, las pendientes de las rectas de regresión de los microsomas Co-proto y Metimazol difirieron significativamente de la pendiente obtenida con microsomas Control (Figura 4.6). Las pendientes de las rectas de regresión obtenidas para cada una de las preparaciones microsomales fueron: 1,71 (microsomas Control), 1,06 (microsomas Co-proto), 1,72 (microsomas CoCl_2) y 0,53 (microsomas Metimazol). Estos resultados se correlacionaron con los resultados de velocidad de reducción del NFX obtenidos en función de la concentración de nitrofurano (Figura 4.5).

La actividad hallada en ausencia de proteína microsomal (151 ± 45 pmol NFX \times min^{-1}) podría deberse a la reducción no-enzimática del NFX producida por el NADPH o a la presencia de algún contaminante de la mezcla de reacción que sea capaz de reducir

al NFX en ausencia de proteínas microsomales.

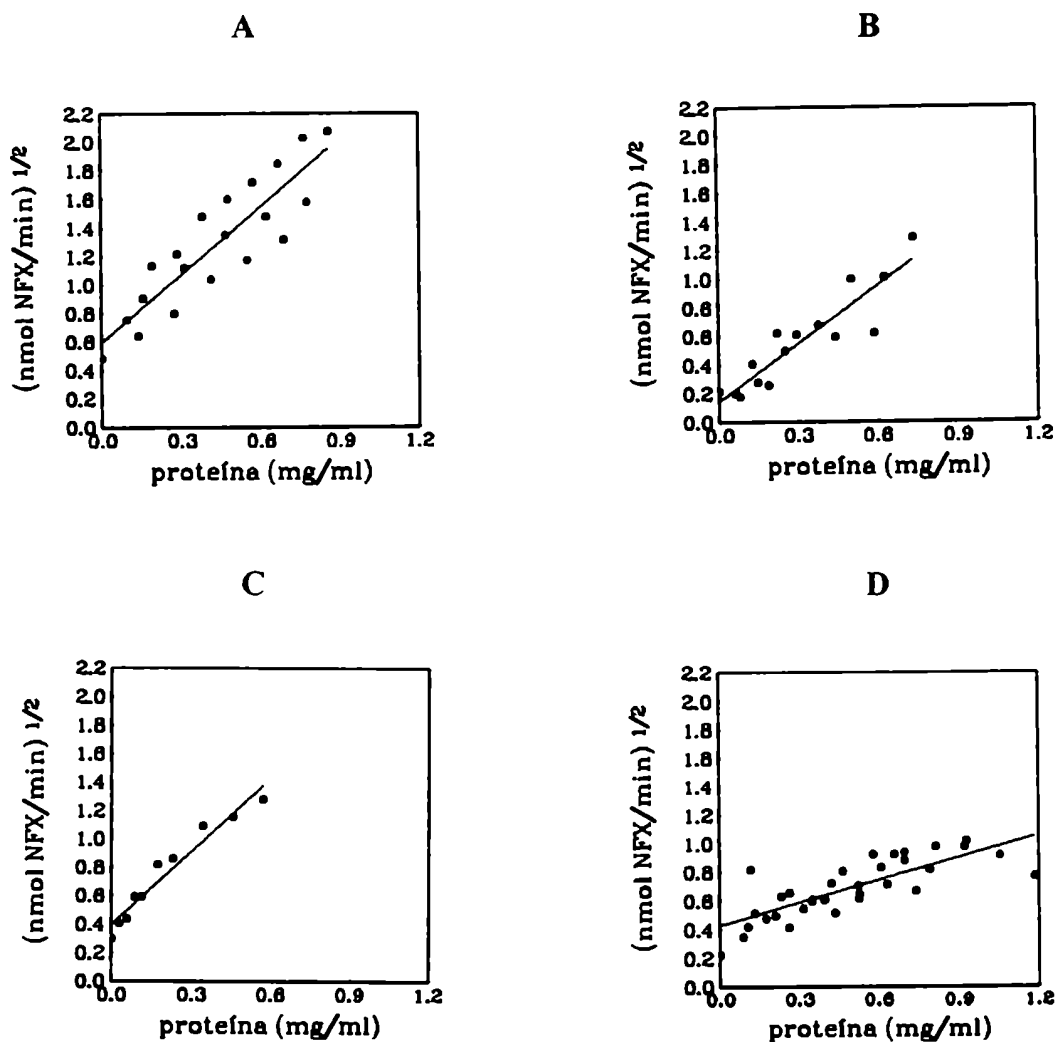


FIGURA 4.6. Reducción microsomal del NFX en función de la concentración de proteína microsomal en el medio de reacción. Se midió espectrofotométricamente la variación de absorbancia a $\lambda=406$ nm. La mezcla de reacción contenía: NFX 100 μ M y distintas concentraciones de proteína microsomal en solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7.4. La reacción se inició con el agregado de NADPH 600 μ M. A: microsomas Control; B: microsomas Co-proto; C: microsomas CoCl_2 ; D: microsomas Metimazol. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos.

4.5.3. Requerimiento de cofactor enzimático.

Con el propósito de determinar la especificidad de la reacción de reducción del NFX para los dadores de equivalentes de reducción, se analizó el efecto del agregado de NADH o NADPH sobre la velocidad de reducción del NFX.

La Figura 4.7 muestra el efecto del dador de equivalentes de reducción (NADH o NADPH) sobre la actividad nitro-reductasa microsomal hepática.

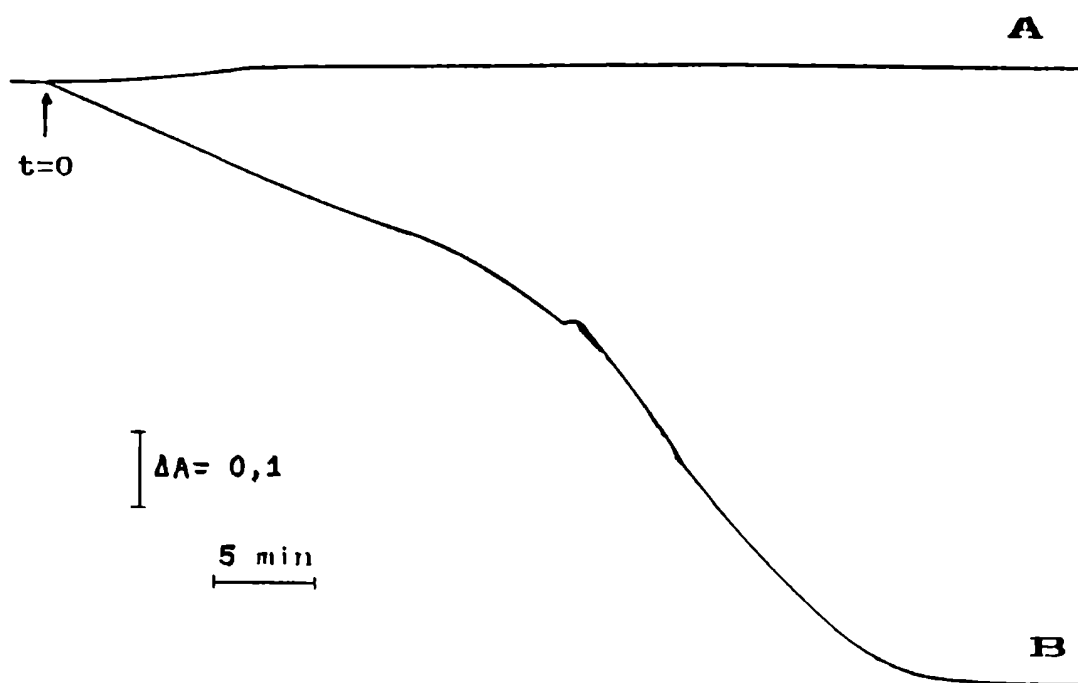


FIGURA 4.7. Efecto del NADH o NADPH sobre la reducción microsomal del NFX 100 μM . Se determinó espectrofotométricamente la disminución de absorbancia a 406 nm en un sistema de reacción que contenía: microsomas (1.5 mg proteína/ml) y NFX 100 μM en solución Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 23 mM - KCl 130 mM, pH 7.4. La flecha indica el inicio de la reacción por el agregado de NADH o NADPH 600 μM . A: Reacción obtenida en presencia de NADH; B: Reacción obtenida en presencia de NADPH. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos.

La reacción fue específica para NADPH (Figura 4.7) ya que, el agregado de igual concentración de NADH al sistema de reacción no produjo la disminución de la absorbancia de la mezcla (a 406 nm), indicando que la reacción no se produce en esas condiciones experimentales. Estos resultados sugieren la especificidad por el NADPH como dador de equivalentes de reducción en el metabolismo reductivo del NFX.

4.5.4. Efecto de inhibidores "in vivo".

Con el objetivo de investigar la participación del citocromo P-450 y/o de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa microsomal en el metabolismo reductivo del NFX, se analizó el efecto del tratamiento previo de las ratas con conocidos inhibidores del citocromo y de la enzima mencionados sobre la velocidad de reducción del NFX, medida como actividad nitro-reductasa microsomal. En forma simultánea, se determinó la concentración de oxígeno presente en el medio por polarografía. Los inhibidores utilizados fueron Co-proto, CoCl_2 o Metimazol. Co-proto y CoCl_2 disminuyeron el contenido microsomal de citocromo P-450 (Tabla 4.1). Co-proto y Metimazol disminuyó la actividad enzimática NADPH-citocromo P-450 reductasa microsomal (Tabla 4.1).

La Figura 4.8 muestra la cinética de reducción microsomal del NFX incubado en presencia de NADPH como dador de electrones. La reacción tuvo dos etapas: la primera,

más lenta, hasta que se produjo el agotamiento del oxígeno del medio (fase aeróbica) y la segunda, más rápida, cuando la solución se hizo anaeróbica (Figura 4.8 A). En esta última etapa la velocidad de reducción del NFX fue $2,42 \pm 0,15$ nmoles NFX \times min^{-1} \times mg proteína $^{-1}$, mientras que en la primera fue $0,67 \pm 0,06$ nmoles NFX \times min^{-1} \times mg proteína $^{-1}$ ($n \geq 4$).

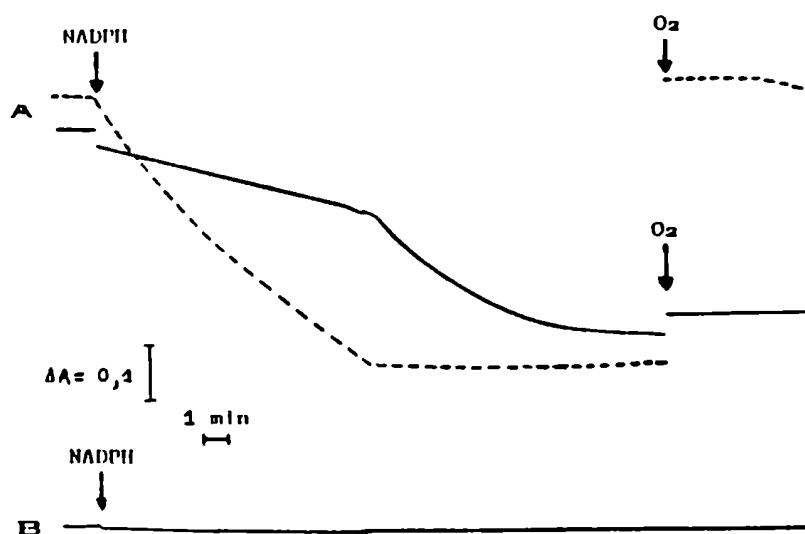


FIGURA 4.8. Actividad nitro-reductasa microsomal hepática. La mezcla de reacción contenía microsomas (1.5 mg proteína/ml) y NFX 100 μM en solución Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 23 mM - KCl 130 mM, pH 7.4. NADPH. agregado de NADPH 600 μM a tiempo 0 min. O_2 : burbujeo de la mezcla con O_2 durante 5 min. A: A^{406} del sistema (---); (—): nivel de O_2 en la cubeta. B: A^{406} del sistema en iguales condiciones experimentales pero en presencia de DMFA. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos.

Estos resultados permiten sugerir que, en medio anaeróbico, la reducción del NFX conduciría a la formación de un metabolito estable, no habiéndose observado reoxidación del mismo por disolución de O₂ en la celda (Figura 4.8 A). En iguales condiciones experimentales, la DMFA presente en el medio de reacción no produjo variación en la absorbancia de la mezcla a 406 nm, descartando posibles interferencias causadas por la DMFA, solvente del NFX (Figura 4.8 B).

Todas las preparaciones microsomales estudiadas (Control, Co-proto, CoCl₂ y Metimazol) mostraron cinéticas bifásicas de reducción del NFX y, posiblemente, la formación de un metabolito no reoxidable (Figura 4.9), lo que sugeriría la irreversibilidad de la reacción, con los distintos modelos experimentales utilizados.

La comparación entre las actividades nitro-reductasa de las cuatro preparaciones microsomales estudiadas (Control, Co-proto, CoCl₂ y Metimazol) podría ser utilizada como indicadora de la participación del citocromo P-450 en dicha actividad. La Figura 4.10 muestra la reducción aeróbica del NFX utilizando las cuatro preparaciones microsomales estudiadas.

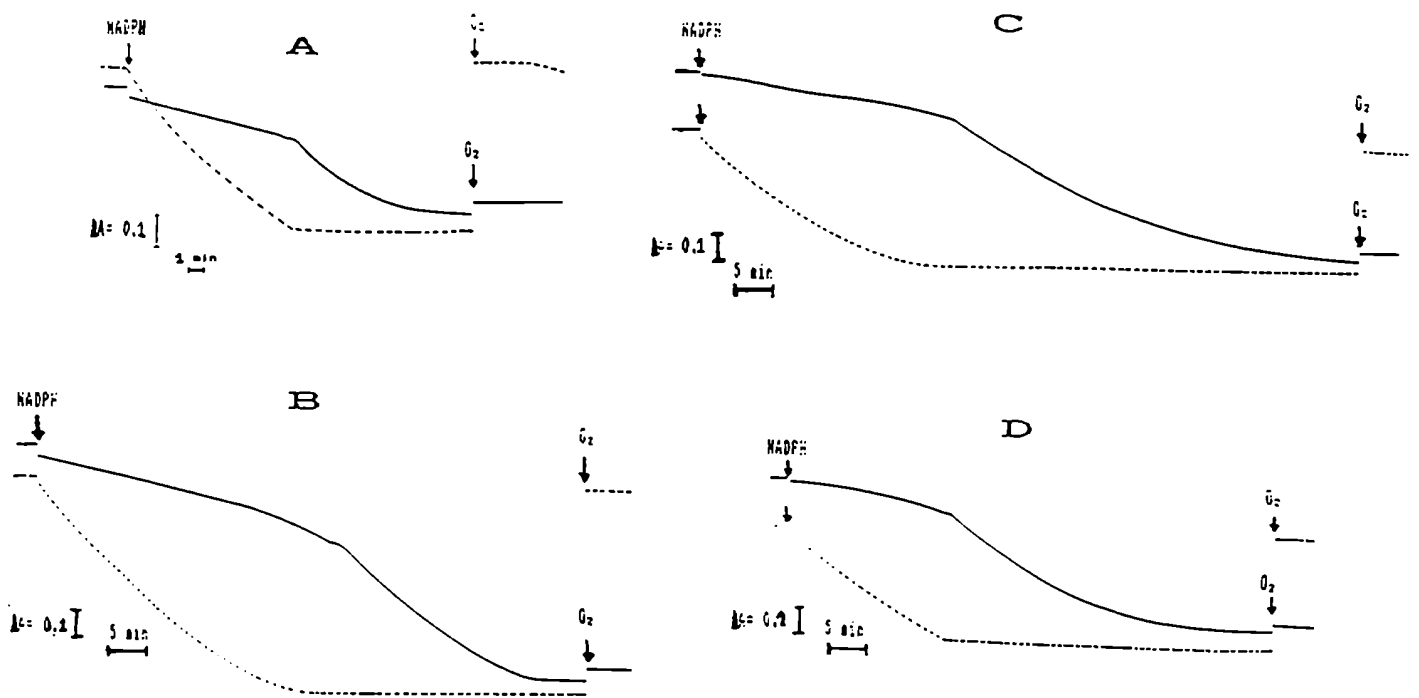


FIGURA 4.9. Reducción del NFX 100 μ M por las distintas preparaciones microsomales. Las condiciones experimentales se describen en la leyenda de la figura 4.7 y en Métodos. NADPH: agregado de NADPH 600 μ M a tiempo 0 min. O_2 : burbujeo de la mezcla con O_2 durante 5 min. (—): A^{406} del sistema; (---): nivel de O_2 en la cubeta. Las letras indican el tratamiento previo del animal: A: ninguno (Control); B: $CoCl_2$; C: Co-proto; D: Metimazol.

Tal como se muestra en la Figura 4.10, la actividad nitro-reductasa de los microsomas Co-proto y Metimazol fue menor a la actividad obtenida con microsomas

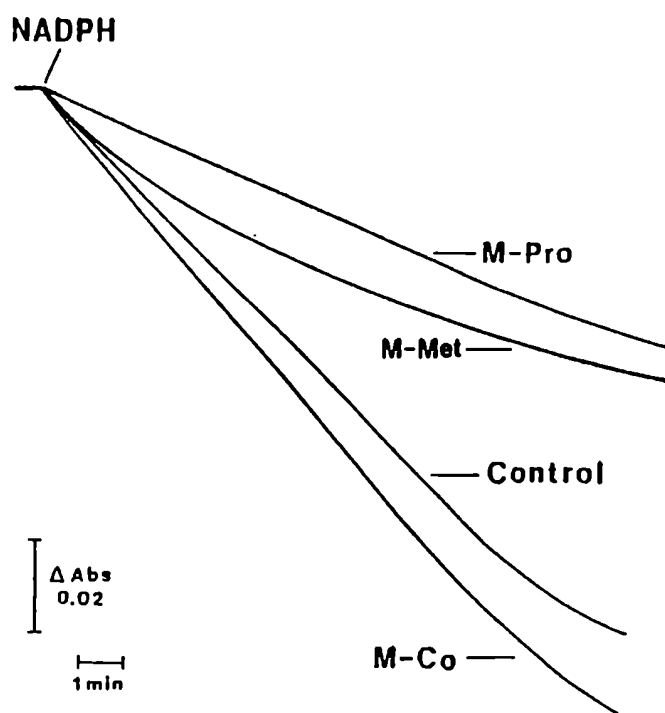


FIGURA 4.10. Reducción aeróbica del nifurtimox por microsomas hepáticos. Se midió espectrofotométricamente la variación de absorbancia a 406 nm en función del tiempo de incubación. La mezcla de reacción contenía las partículas microsomales indicadas en la figura (1.5 mg proteína/ml) y NFX 100 μ M en solución Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 23 mM KCl 130 mM, pH 7,4. La flecha indica: NADPH, agregado de NADPH (600 μ M) a tiempo 0. Tratamientos: M-Pro: Co-proto; M-Co: CoCl_2 ; M-Met: Metimazol.

Tal como se muestra en la Figura 4.10, la actividad nitro-reductasa de los microsomas Co-proto o Metimazol fue menor a la actividad obtenida con microsomas Control (nmoles NFX \times min^{-1} \times mg proteína $^{-1}$: Co-proto: 0,57; Metimazol: 0,78; Control: 1,2; n=2). En cambio, la actividad nitro-reductasa de los microsomas CoCl_2 fue similar

a la actividad hallada con los microsomas Control (nmoles NFX x min⁻¹ x mg proteína⁻¹: CoCl₂: 1,37; Control: 1,2; n=2).

4.5.5. Efecto del monóxido de carbono (CO).

Uno de los criterios experimentales utilizados para determinar si una droga puede ser metabolizada por el citocromo P-450 establece que, "*in vitro*", el metabolismo de dicha droga debe ser inhibido por el monóxido de carbono (Burke, 1981). Para determinar si el citocromo P-450 interviene en la metabolización del NFX, se determinó el efecto del CO sobre la actividad nitro-reductasa de los microsomas Control. Previo al inicio de la reacción, el sistema fue gaseado con CO, conocido inhibidor del citocromo P-450 (Omura y Sato, 1964). Se utilizaron como controles de este experimento los microsomas previamente gaseados con argón o nitrógeno (libres de O₂). Los resultados están graficados en la Figura 4.11, donde se pueden observar las diferentes velocidades de reducción aeróbica (microsomas en presencia de aire) y anaeróbica (microsomas previamente gaseados).

La velocidad de reducción obtenida con los microsomas gaseados con CO fue similar a la observada empleando los microsomas gaseados con argón o nitrógeno (velocidades iniciales, en nmoles NFX x min⁻¹ x mg proteína⁻¹: CO: 2,21; Argón: 2,08;

aire: 1,05; n=2). Este resultado descartaría algún efecto inhibitorio del CO sobre la actividad nitro-reductasa.

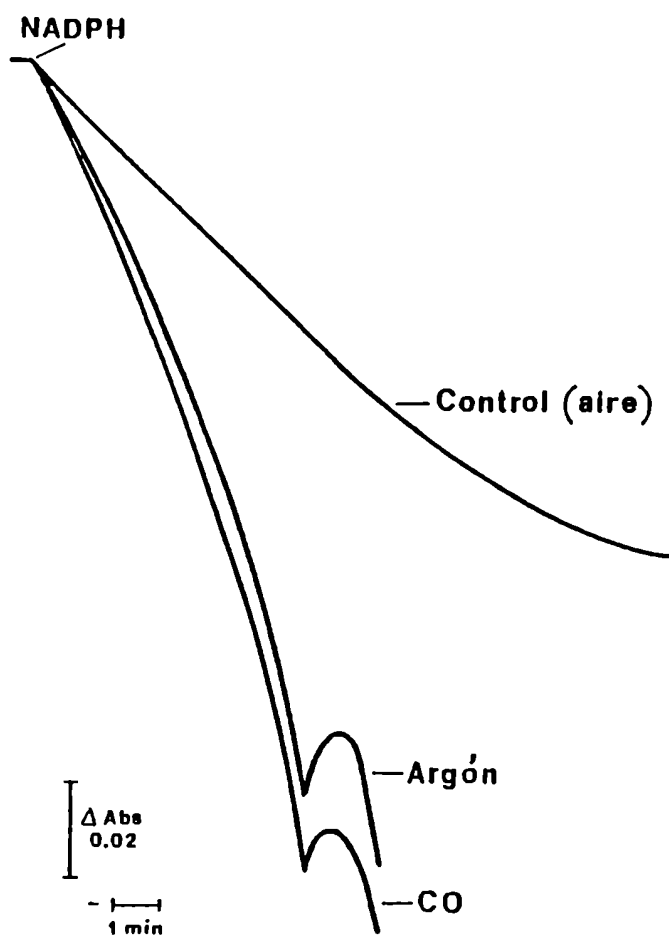


FIGURA 4.11. Efecto del CO sobre la reducción del nifurtimox por microsomas hepáticos. Se midió espectrofotométricamente la variación de absorbancia a $\lambda = 406$ nm en función del tiempo de incubación. La mezcla de reacción contenía microsomas (1,5 mg proteína/ml) y NFX $100 \mu\text{M}$ en solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4. NADPH: agregado de NADPH $600 \mu\text{M}$ a tiempo 0. Las curvas indicadas como Argón y CO fueron gaseadas previamente durante 5 min. con Argón o CO (libres de O_2), respectivamente. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos.

4.5.6. Efecto de inhibidores *"in vitro"*.

Con el objeto de obtener información acerca de la participación de la flavoproteína NADPH-citocromo P-450 reductasa y/o del citocromo P-450 en el metabolismo reductivo del NFX, se estudió el efecto de varios inhibidores del citocromo P-450 o de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa microsomales de mamíferos sobre la actividad nitro-reductasa microsomal (reducción del NFX). Los inhibidores utilizados fueron:

- clotrimazol (inhibidor del citocromo P-450; Rogerson y col., 1977);
- AADP (inhibidor competitivo de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa; Ebel, 1981).

4.5.6.1. Clotrimazol.

El clotrimazol, un imidazol sustituido, es un conocido inhibidor del citocromo P-450 (Rogerson y col., 1977). Para determinar si el citocromo P-450 participa en la reducción microsomal del NFX, se estudió el efecto del clotrimazol sobre el metabolismo reductivo del NFX en microsomas hepáticos. Cuando los microsomas se incubaron durante 5 min. en presencia de clotrimazol 100 μ M, el contenido de citocromo P-450 se inhibió en un 47% (Figura 4.12).

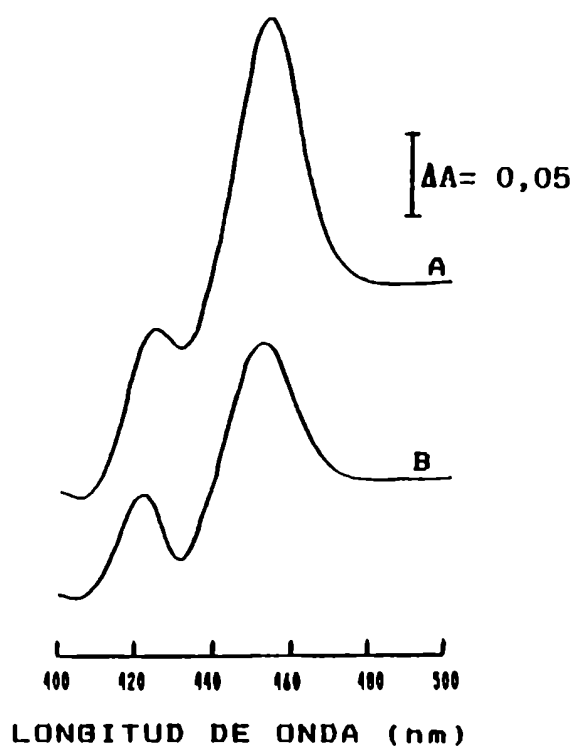


FIGURA 4.12. Inactivación del citocromo P-450 microsomal producida por clotrimazol. El contenido microsomal de citocromo P-450 se midió en la forma descrita en Métodos. La mezcla de reacción contenía microsomas (0,6 mg proteína/ml) en solución Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4 y fue incubada con distintas concentraciones de clotrimazol durante los 5 min. previos al ensayo. Concentración de clotrimazol (μM) en los trazados: A: 0 μM ; B: 100 μM .

Sorprendentemente, en iguales condiciones experimentales, el agregado de clotrimazol 100 μM al sistema no modificó la velocidad de reducción del NFX (Tabla 4.7), sugiriendo que el citocromo P-450 no participaría en el metabolismo reductivo del nitrofurano.

TABLA 4.7. Efecto del clotrimazol sobre la actividad nitro-reductasa de los microsomas hepáticos.

Tiempo de incubación (min)	Clotrimazol		Actividad nitro-reductasa	
	(μM)	($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)	($\Delta\text{A}^{406} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prote\u00edna}^{-1}$)	Inhibición (%)
5	0	0	$0,0030 \pm 0,0002$	---
	100	0,05	$0,0031 \pm 0,0003$	0

La actividad nitro-reductasa se determinó a través de la disminución de absorbancia a 406 nm. La mezcla de reacción contenía microsomas incubados con clotrimazol (concentraciones en la Tabla) y NFX 100 μM en solución Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 23 mM, KCl 130 mM, pH 7,4 (volumen final: 3,0 ml). La reacción fue iniciada con el agregado de NADPH 600 μM . Otras condiciones experimentales se describen en Métodos. Los valores representan el promedio \pm E.S.M. de 3 determinaciones independientes realizadas por duplicado.

4.5.6.2. Aminopiridina adenina dinucleótido fosfato (AADP).

Ebel (1981) demostró que el AADP, compuesto análogo del NADP, es un inhibidor competitivo de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa. Es por ello que se estudió el efecto del AADP sobre la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa (Tabla 4.8) y sobre la velocidad de reducción microsomal del NFX 100 μM (Tabla 4.9).

TABLA 4.8. Efecto del AADP sobre la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa microsomal hepática.

Tiempo de incubación (min)	AADP (μM)	AADP ($\mu\text{mol/mg prot}$)	Actividad NADPH-cit P-450 reductasa ($\text{nmol P-450} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$)	Inhibición (%)
0	0	0	69,18	---
	120	0,79	50,74	26,54
10	0	0	84,47	---
	120	1,59	61,77	26,87
	240	3,18	53,58	36,57

La actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa fue determinada en la forma descrita en Métodos. La mezcla de reacción contenía: microsomas y AADP (concentraciones en la Tabla) y NFX 100 μM en solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4 (volumen final = 3,0 ml). La reacción se inició por el agregado de NADPH 600 μM . Los valores representan el promedio de 2 determinaciones independientes realizadas por duplicado.

Tal como se muestra en la Tabla 4.8, en presencia de AADP 240 μM , la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa se inhibió en un 37%, de acuerdo con los resultados obtenidos por Ebel (1981).

El agregado de AADP 240 μM a la incubación de microsomas, NFX 100 μM y NADPH 600 μM provocó la inhibición del 60% en la velocidad de reducción del NFX (Tabla 4.9), sugiriendo que la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa sería

la responsable del metabolismo microsomal hepático del NFX.

TABLA 4.9. Efecto del AADP sobre la actividad nitro-reductasa de los microsomas hepáticos.

Tiempo de incubación (min)	AADP		Actividad nitro-reductasa	
	(μM)	($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)	($\Delta\text{A}^{406} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$)	Inhibición (%)
10	0	0	0,0030	----
	240	0,397	0,0012	60

La actividad nitro-reductasa se determinó a través de la disminución de absorbancia a 406 nm. La mezcla de reacción contenía microsomas incubados con AADP y NFX 100 μM en un volumen final de 3,0 ml. La reacción fue iniciada con el agregado de NADPH 600 μM . Otras condiciones experimentales se describen en Métodos. Los valores representan el promedio \pm E.S.M. de 3 determinaciones independientes realizadas por duplicado.

4.6. Ensayos para el aislamiento y caracterización de los productos del metabolismo hepático del NFX.

Con el objeto de intentar aislar el/los metabolitos resultantes de metabolismo hepático del nifurtimox se utilizaron los siguientes métodos:

- Espectroscopía de absorción de luz visible y ultravioleta;
- Cromatografía en capa delgada;

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC);
- Detección espectrofotométrica de aminas aromáticas primarias.
- Espectrometría de masa y espectrometría ultravioleta.

4.6.1. Espectros de absorción de luz

4.6.1.1. Luz visible:

Debido a que cada sustancia tiene un espectro de absorción de luz característico, una primera aproximación al problema fue analizar las modificaciones espectrales producidas en función del tiempo. Es por ello que se registró el espectro de absorción de luz visible (λ entre 350-650 nm) de la mezcla de reacción que contenía microsomas, NFX y NADPH, a distintos tiempos de reacción. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.13. La máxima reducción del NFX (registrada a través de la disminución de absorbancia a 406 nm) se produjo a las 2 hs 30 min posteriores al inicio de la misma, coincidiendo con la máxima decoloración del sistema. Durante ese período, no se observaron corrimientos o modificaciones en el espectro de luz visible que pudieran sugerir la aparición de algún metabolito diferente de los presentes en el inicio de la reacción (Figura 4.13). En estas condiciones experimentales, no se pudo analizar la zona

del espectro correspondiente a $\lambda < 370$ nm debido a la interferencia provocada por la adición de NADPH (Figura 4.13). El NADPH tiene un máximo de absorción de luz a $\lambda = 340$ nm.

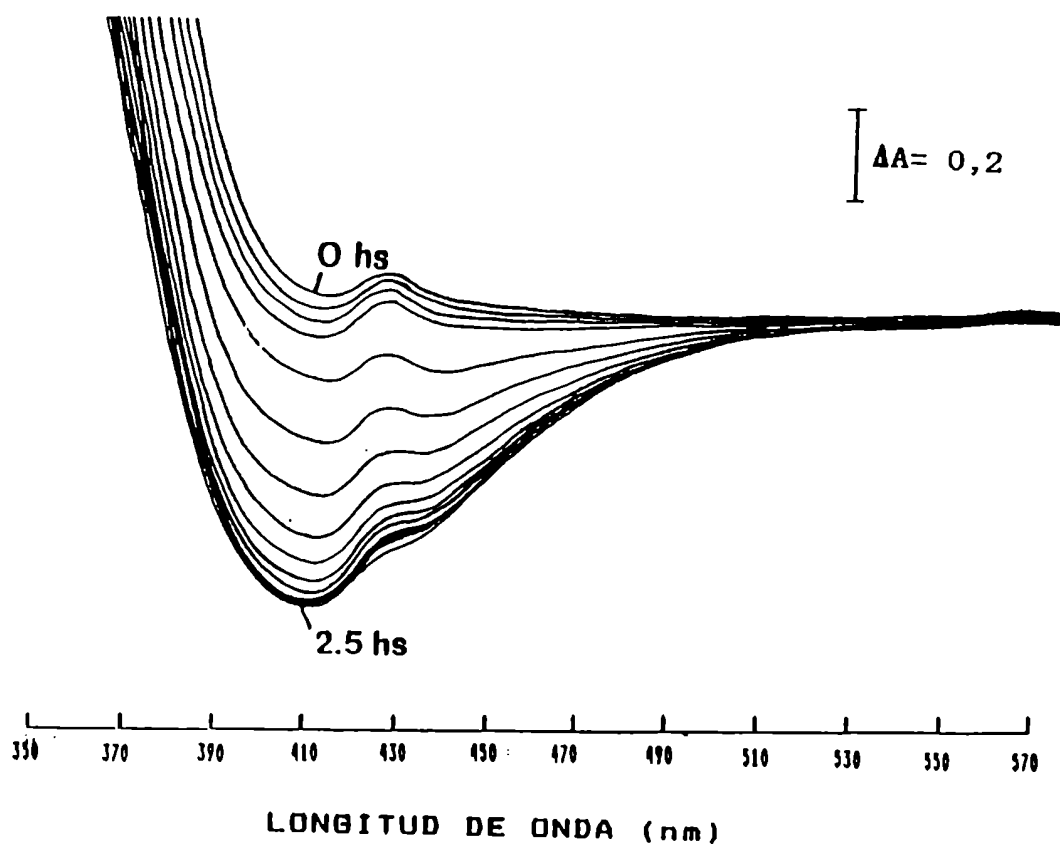


FIGURA 4.13. Espectros de absorción de luz entre 350 y 500 nm de la reducción microsomal hepática del NFX. La mezcla de reacción contenía microsomas (1,5 mg proteína/ml) y NFX 50 μ M en solución Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 23 mM - KCl 130 mM, pH 7,4. La reacción se inició por el agregado de NADPH 600 μ M. Otras condiciones experimentales se detallan en Métodos. Las flechas indican el tiempo de reacción transcurrido.

4.6.1.2. Luz ultravioleta y visible. Extracción con solvente orgánico de la mezcla de reacción.

Continuando con el estudio de los productos de la reducción microsomal del NFX y para evitar la posible interferencia del NADPH en la determinación, se realizó el espectro de absorción entre 270 y 410 nm del extracto orgánico de la mezcla de reacción obtenido con acetato de etilo. La solución de NFX se incubó en presencia de microsomas y NADPH hasta la decoloración total de la misma (2 hs a 37°C). Luego, la muestra se procesó en la forma descripta en Métodos. Se realizó el espectro entre 270-410 nm de dicho extracto orgánico, de una solución de NFX 50 μ M y de una de DMFA (solvente del NFX) en las mismas condiciones experimentales. La Figura 4.14 muestra los espectros obtenidos.

Se observa un pico con un máximo de absorción a $\lambda = 310$ nm (Figura 4.14 A, trazado 1 y Figura 4.14 B). Dicho pico no fue detectado ni en el espectro del NFX (Figura 4.14 A, trazado 2) ni en el espectro de la DMFA (Figura 4.14 A, trazado 3). La aparición de un pico con un máximo de absorción de luz de $\lambda = 310$ nm coincidió con los resultados obtenidos en este laboratorio por Sreider (1994) al reducir químicamente al NFX con dihidrolipoamida o ditioeritritol.

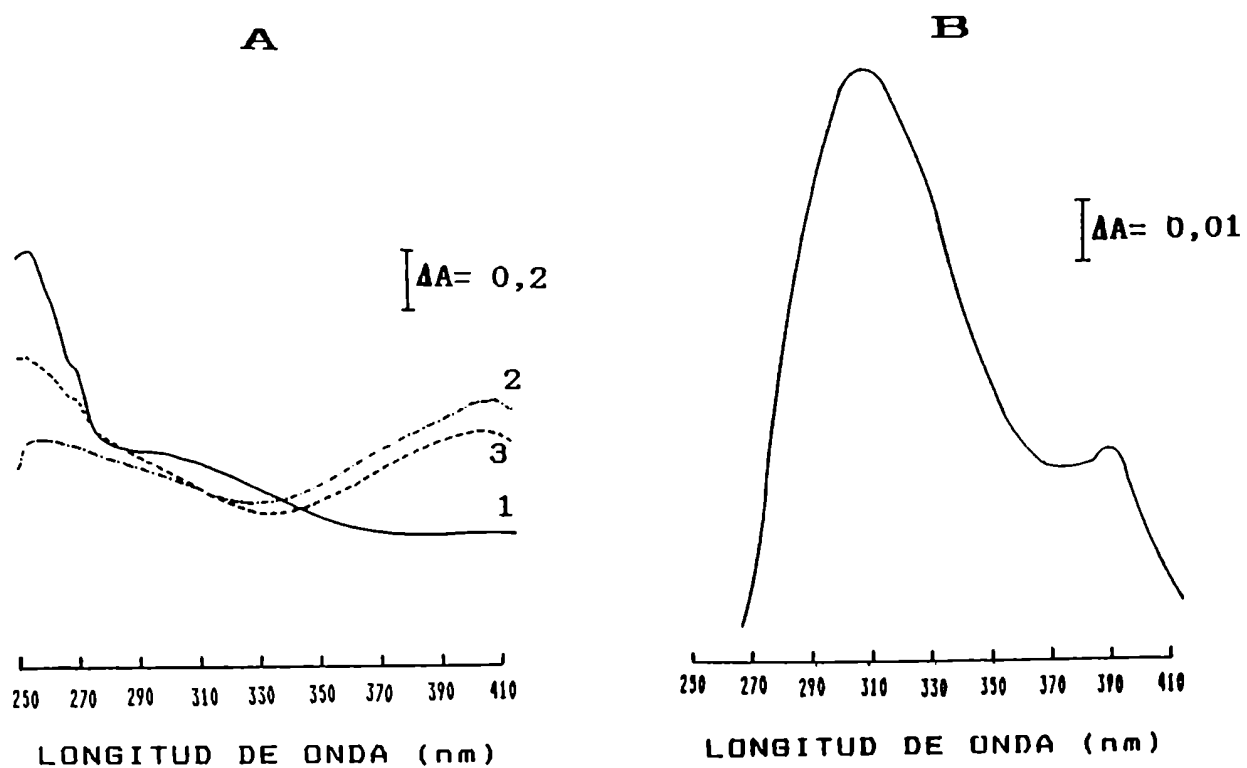


FIGURA 4.14. Espectro de absorción de luz UV-VIS de los productos de la reducción microsomal hepática del NFX 50 μM extraídos con acetato de etilo. A: se realizó el espectro de dicho extracto orgánico (trazado 1), NFX 50 μM (trazado 2) y DMFA (trazado 3) tratados igual que la muestra. B: igual al trazado 1, pero amplificando la escala. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos.

4.6.2. Cromatografía en capa delgada

El NFX se redujo en presencia de microsomas y NADPH. Los productos de la reducción así obtenidos fueron analizados por cromatografía de adsorción en placa delgada, según se detalla en Métodos. La Figura 4.15 muestra las fotografías de las placas de cromatografía en placa delgada obtenidas e iluminadas con luz UV.

Como se puede observar en la Figura 4.15, el NFX desapareció luego de 1 hora de incubación, manteniéndose sin cambios a partir de ese momento, lo que indica que la reducción del NFX se produce rápidamente. Sin embargo, no fue posible hallar metabolito alguno, ni en el caso del sobrenadante de 1000 rpm (Figura 4.15 A) ni con el extracto clorofórmico (Figura 4.15 B), a los tiempos de reacción estudiados (0, 1, 2, 3 y 24 hs).

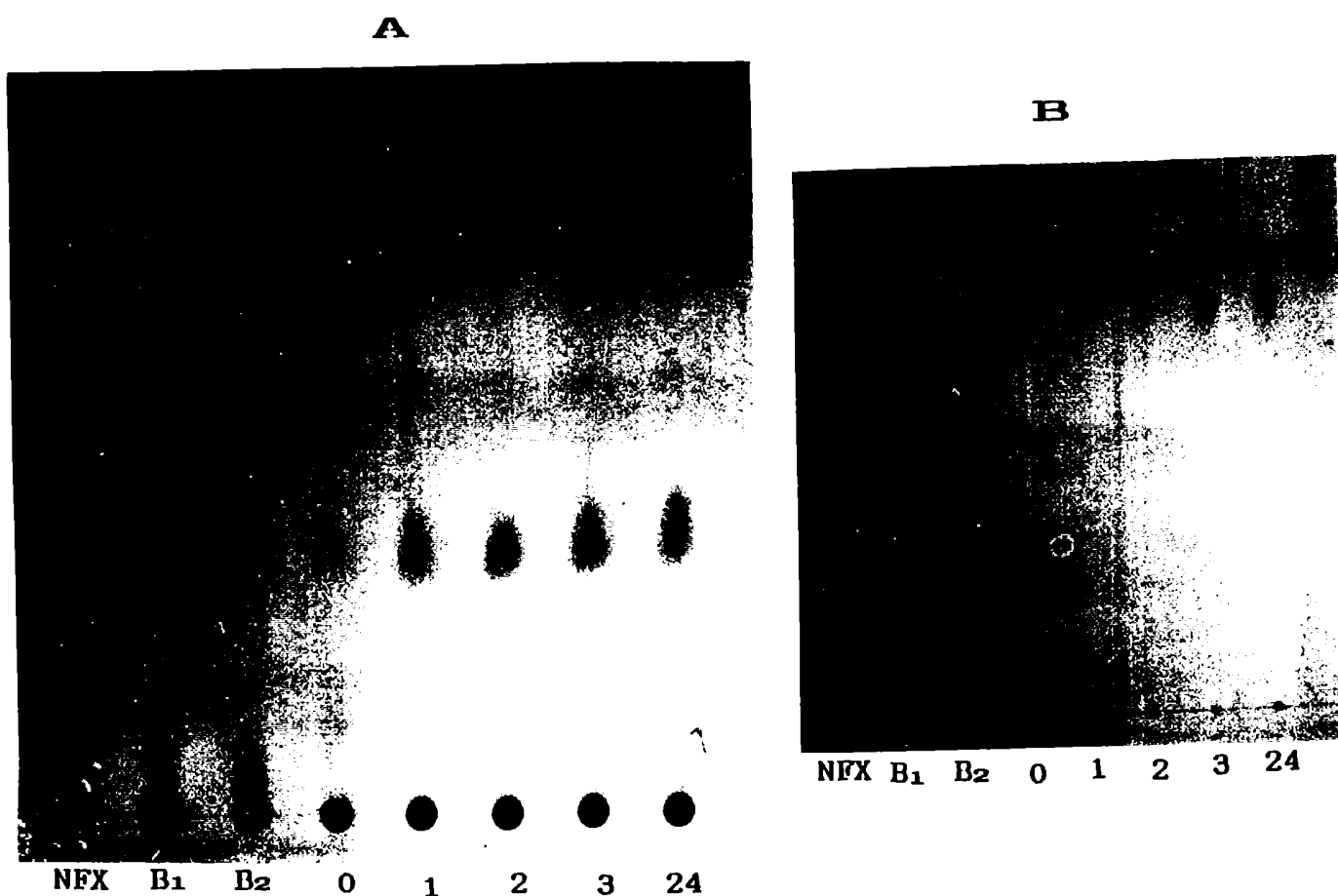


FIGURA 4.15. Cromatografía en capa delgada de los productos de reducción del NFX. Las condiciones experimentales se describen en Métodos. A: sobrenadante 1000 rpm de la mezcla de reacción; B: Extracto clorofórmico de la mezcla de reacción; NFX: nifurtimox 15 mM; B₁: mezcla sin microsomas; B₂: mezcla sin NFX; 0, 1, 2, 3, 24: tiempo de incubación (horas) a 34°C.

4.6.3. Cromatografía en fase reversa (filtración por HPLC).

4.6.3.1. Metabolismo microsomal hepático del NFX.

Una de las técnicas utilizadas para separar los componentes de una mezcla es la filtración por cromatografía líquida de alta resolución. La Figura 4.16 muestra el cromatograma, obtenido por HPLC, del sobrenadante de 105000 g de la mezcla de incubación de microsomas en presencia de NFX 50 μ M. A tiempo cero de reacción apareció un solo pico con un tiempo de retención (RT) de 4,52 min, coincidiendo con el RT del NFX (Figura 4.16 A). En cambio, a la hora de reacción (Figura 4.16 B) se detectó un pico que absorbió luz de $\lambda = 310$ nm, con un RT de 3,97 min, distinto al del NFX. Este pico se mantuvo a las 2 hs de incubación aunque con menor área. La Figura 4.16 C muestra la gráfica del área del pico con RT=3,97 min en función de la longitud de onda de detección. Se observa que este pico presenta su área máxima cuando su elución fue registrada a $\lambda = 200$ nm.

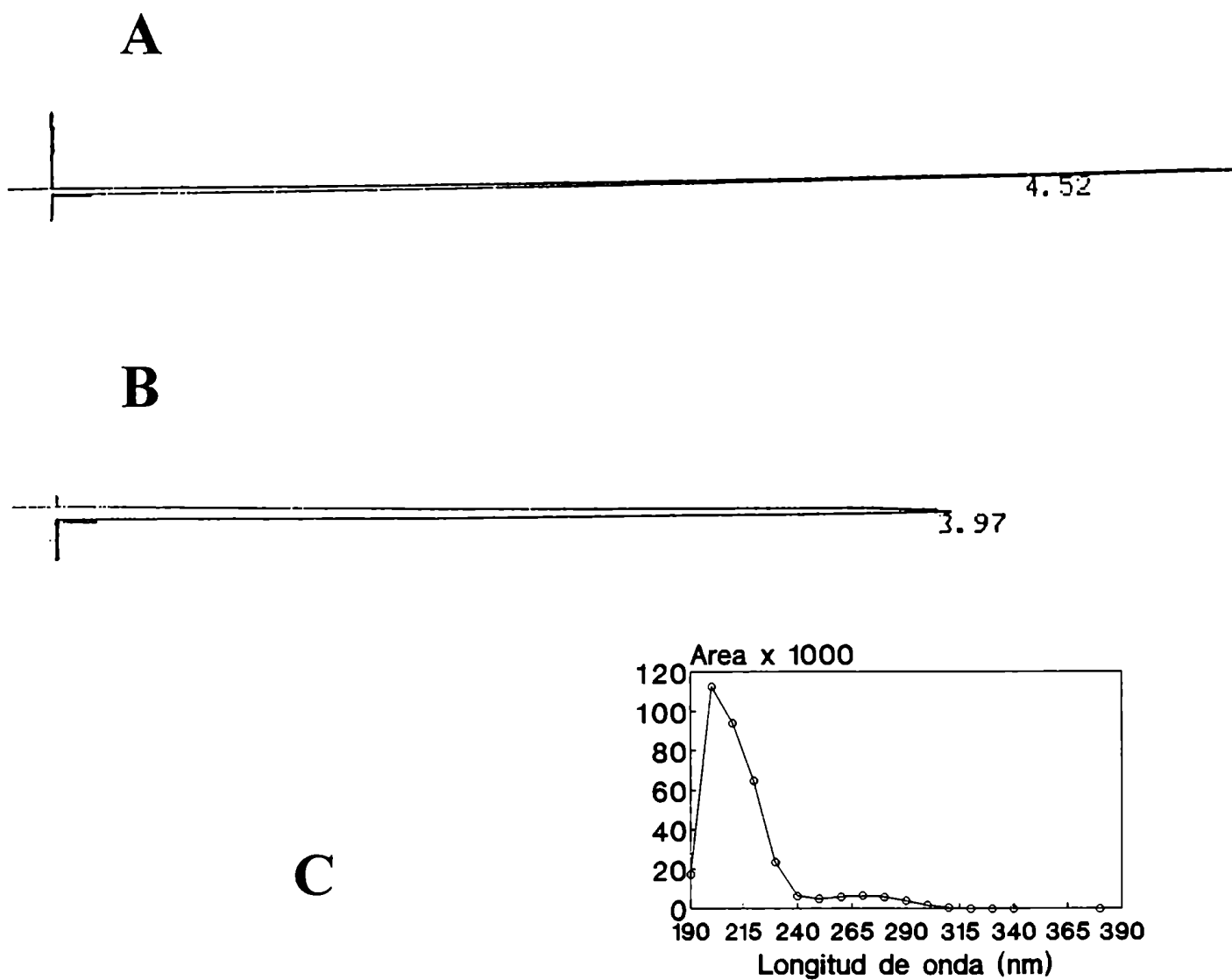


FIGURA 4.16. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del producto de la reducción del NFX 50 μ M por microsomas hepáticos. A: mezcla de incubación conteniendo microsomas y NFX tratada tal como se describe en Métodos; B: NFX 50 μ M tratado como la muestra A; C: gráfico del área del pico con RT = 3.97 min en función de la longitud de onda de detección. El valor que figura al lado de cada cromatograma representa el RT (min) correspondiente al pico detectado.

4.6.3.2. Metabolismo del NFX en hepatocito aislado.

Se estudió el metabolismo del NFX utilizando hepatocitos aislados de rata. Los hepatocitos fueron incubados en presencia de NFX 50 μ M y luego procesados para el análisis por HPLC, en la forma descrita en Métodos. El cromatograma obtenido al analizar la mezcla de incubación de hepatocitos y NFX se muestra en la Figura 4.17. La muestra correspondiente a las células incubadas con NFX 50 μ M (tiempo 0) eluyó de la columna con un RT de 4,52 min (Figura 4.17 A), coincidiendo con el RT de una solución estándar de NFX 50 μ M tratada de la misma manera que la muestra que contenía células (Figura 4.17 B). La incubación de hepatocitos en presencia de NFX mostró la desaparición de este nitrofurano entre las 2 y 4 hs de incubación. Por otra parte, entre las 2 y 6 hs de incubación, aparecieron 3 picos detectados a $\lambda=310$ nm con RT de 3,51; 3,74 y 3,96 min, respectivamente (Figura 4.17 B). Este último pico (RT=3,96 min) coincidió con el pico detectado al reducir al NFX en presencia de microsomas hepáticos (RT=3,97 min)(Figuras 4.16 B y 4.17 B). La detección de los picos que corresponderían a los intermediarios y/o productos de la reducción del NFX a distintas longitudes de onda reveló que dichos picos son detectados con área máxima a $\lambda=200$ nm (Figura 4.17 C).

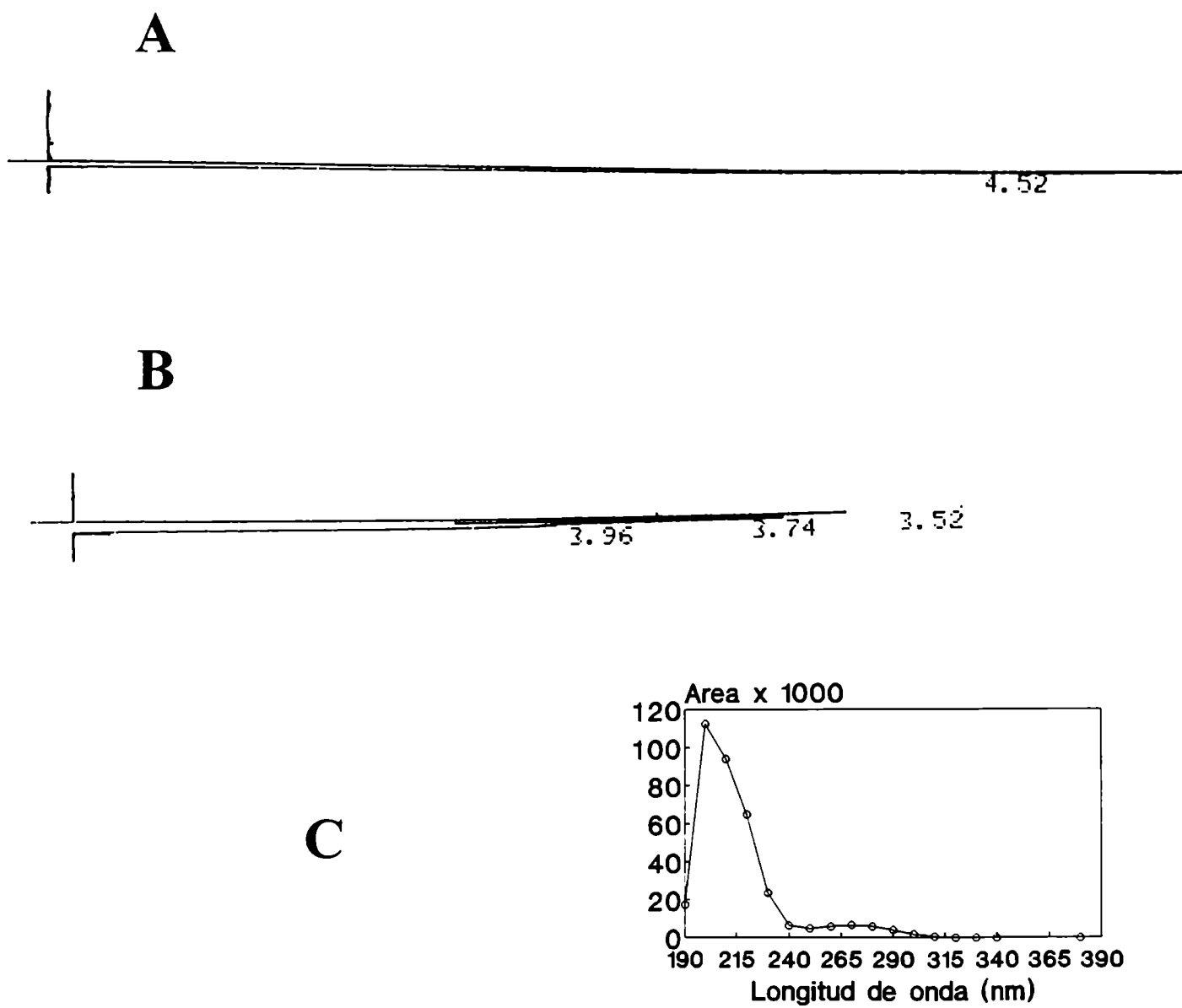


FIGURA 4.17. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los productos de la reducción del NFX 50 μ M por los hepatocitos. A: NFX 50 μ M tratado como la muestra B; B: mezcla de incubación de hepatocitos y NFX 50 μ M tratada tal como se describe en Métodos; C: gráfico del área de los picos con RT-3.96 min en función de la longitud de onda de detección. El valor que figura al lado de cada cromatograma representa el RT (min) correspondiente al pico detectado.

4.6.4. Detección de aminas aromáticas primarias.

Se ha postulado que el metabolismo de los nitrofuranos involucra la reducción del grupo nitro, con la formación de la amina correspondiente como producto final de la reacción (Figura 4.1, pág. 82; Minchin y col., 1986). Para determinar si los microsomas hepáticos son capaces de reducir al grupo nitro del NFX produciendo su amino-derivado, los microsomas fueron incubados en presencia de NFX en la forma descrita en Métodos.

No se observó formación del complejo rojo-púrpura característico de la reacción, no pudiéndose detectar el amino-derivado correspondiente al NFX.

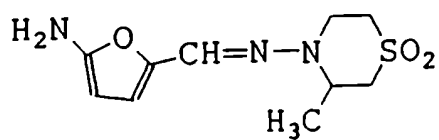
4.6.5. Espectrometría de masa y espectrometría ultravioleta.

Se efectuó la espectrometría de masa y espectrometría ultravioleta para identificar los metabolitos resultantes de la reducción del NFX. Se analizó una mezcla de reacción que contenía NFX 100 μ M y ditionito de sodio en exceso para garantizar la reducción del nitrofurano. Como control de este experimento se empleó una mezcla que contenía DMFA y ditionito de sodio en agua. Ambas soluciones fueron llevadas a sequedad por liofilización. El residuo de la solución que contenía los productos de la reducción del NFX, sólido blanco amarillento que pesaba 48 mg, fue analizado por espectrometría de

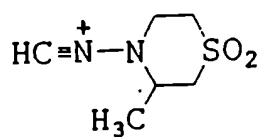
masa por introducción directa. Los resultados no fueron satisfactorios, fundamentalmente porque se trataba de una mezcla de productos junto con las sales inorgánicas presentes. El residuo se disolvió en 1,0 ml de agua, se le agregó 1,0 ml de cloroformo (grado HPLC), se agitó con un vórtex, se centrifugó y se separaron las fases: **FASE ORGÁNICA 1** con débil color amarillo. La fase acuosa remanente fue llevada a pH 8,0 con NaOH 5% (p/v) y se extrajo con cloroformo (1,0 ml); siguiendo idéntico procedimiento se obtuvo la **FASE ORGÁNICA 2**, que era casi incolora. Quedó una **FASE ACUOSA** alcalina y fuertemente amarilla. Las tres fracciones se llevaron a sequedad y se analizaron por espectrometría de masa y espectrometría ultravioleta.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- a) El espectro de masa directo de la **Fase orgánica 1** provino de un fragmento de NFX con PM 175 (Figura 4.18). El espectro UV en metanol presentó absorción casi continua entre 212 y 335 nm.
- b) El espectro de masa de la **Fase orgánica 2** fue asimilable a la estructura de la amina proveniente del NFX de PM 257 (Figura 4.18). El espectro UV presentó máximos a 212 y 290 nm.
- c) La **Fase acuosa** contenía todas las sales inorgánicas. Los espectros de masa y UV demostraron que también existían productos orgánicos, pero sin poder ser identificados.



Fase orgánica 1



Fase orgánica 2

FIGURA 4.18. Estructura de los productos de la reducción del NFX con ditionito de sodio. obtenida por espectrometría de masa. Las condiciones experimentales se describen en el texto y en Métodos.

4.7. Discusión.

Estudios previos realizados correlacionando la estructura con la actividad de los nitrocompuestos indicaron que el grupo nitro sería el responsable de la actividad biológica de los mismos (Kedderis y Miwa, 1988). El efecto terapéutico y tóxico de estos compuestos implicaría la reducción de su grupo nitro y la producción de especies reactivas del oxígeno, como consecuencia de su metabolismo a través de un ciclo redox (Mason y Holtzman, 1975; Docampo y col., 1981a; Mason y Josephy, 1985; Minchin y col., 1986). Varias flavoproteínas intervienen en el metabolismo de algunos nitroderivados, entre las que se incluyen la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa y el citocromo P-450 (Gillette y col., 1968; Kato y col., 1969; Harada y Omura, 1980; Masana y col., 1984a y 1984b; Minchin y col., 1986; Wong y Agrawal, 1988).

En este trabajo intentamos responder al interrogante: **¿Tienen participación las enzimas NADPH-citocromo P-450 reductasa y el citocromo P-450 en el metabolismo reductivo del nitrofurano antichagásico nifurtimox?**

La administración de los siguientes inhibidores *"in vivo"*: Co-proto, CoCl₂ y Metimazol; e *"in vitro"*: clotrimazol y AADP confirmaron los efectos producidos sobre el contenido microsomal de citocromo P-450 (Tabla 4.1 y Figura 4.12) y la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa microsomal (Tablas 4.1 y 4.8), de acuerdo con lo observado por Muhoberac y col. (1989), Tephly y Hibbeln (1971), Ram y Waxman

(1992), Rogerson y col. (1987) y Ebel (1981).

Los microsomas Co-proto, CoCl_2 y Metimazol consumieron menos O_2 (Tabla 4.2), generaron menos anión superóxido (O_2^- ; Tabla 4.3) y formaron menos peróxido de hidrógeno (H_2O_2 ; Tabla 4.4) que los microsomas Control. Este fenómeno podría explicarse teniendo en cuenta que los microsomas Co-proto o CoCl_2 mostraron poseer menos contenido de citocromo P-450 (Tabla 4.1), integrante del sistema microsomal de transporte de electrones que tiene al O_2 como aceptor final. En cambio, los microsomas Co-proto o Metimazol presentaron menor actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa (Tabla 4.1) y no serían capaces de regenerar eficazmente al citocromo P-450 que intervendría en la cadena microsomal de transporte de electrones.

En cada una de las preparaciones microsomales estudiadas, los nitrofuranos NFX, NFA y NFZ estimularon el consumo de O_2 (Tabla 4.2), la generación de O_2^- (Tabla 4.3) y la formación de H_2O_2 (Tabla 4.4). El aumento del consumo de O_2 podría deberse a:

1- que el radical aniónico derivado del nitrofurano (RNO_2^-) le transferiría electrones al oxígeno, llevando a la formación de O_2^- y la regeneración del nitrofurano original (ciclo redox de los nitrofuranos; Figura 4.1) (Mason y Holtzman, 1975; Docampo y col., 1981a; Mason y Josephy, 1985; Minchin y col., 1986).

2- la incorporación de O_2 a la molécula del nitrofurano dando como resultado la formación de epóxidos e hidroxilación, entre otros (Coon y Vaz, 1987; Kedderis y Miwa, 1988; Goldstein y Faletto, 1993).

El porcentaje del O_2 consumido que fue capaz de generar O_2^- dependió de la preparación de microsomas estudiada. En el caso de los microsomas $CoCl_2$ o Metimazol, el 88% y el 68% del oxígeno consumido en presencia de los nitrofuranos fue capaz de generar anión superóxido, de acuerdo con el mecanismo 1. Estos resultados fueron comparables a los obtenidos con microsomas Control, donde el 73% del oxígeno consumido fue utilizado en la producción de O_2^- . En cambio, sólo el 48% del oxígeno consumido por los microsomas Co-proto generó O_2^- . Este fenómeno podría interpretarse como si la mayor parte del O_2 consumido por los microsomas Co-proto (Tabla 4.2) se debiera a una incorporación de oxígeno a la molécula del nitrofurano (mecanismo 2); a diferencia de los microsomas $CoCl_2$ o Metimazol, en los cuales la mayor parte del oxígeno consumido participaría en el ciclo redox de los nitrofuranos (mecanismo 1) (Tablas 4.2 y 4.3; Figura 4.1).

La comparación de los parámetros mencionados en las distintas preparaciones reveló que las diferencias encontradas en los microsomas Co-proto, respecto de las otras preparaciones, se podrían deber a la disminución de la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa, más que a la del citocromo P-450, ya que una disminución equivalente en el contenido de citocromo P-450 (microsomas $CoCl_2$) no produjo los mismos resultados. Otra posibilidad sería que Co-proto y $CoCl_2$ ejercieran su efecto sobre distintas isoenzimas del citocromo P-450 con funciones distintas sobre los mismos sustratos (nitrofuranos en este caso). Por otra parte, encontramos que los microsomas Metimazol

se comportan de manera similar a los microsomas Co-proto, lo cual sugeriría que las diferencias halladas serían atribuibles a la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa y no al citocromo P-450.

Los estudios realizados sobre la peroxidación lipídica microsomal mostraron que:

- esta reacción fue inhibida en todas las preparaciones microsomales estudiadas: Co-proto, CoCl_2 y Metimazol (Tabla 4.5). Dicha inhibición podría ser debida a la inhibición de la etapa de iniciación y/o de propagación de la peroxidación lipídica. Teniendo en cuenta que la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa interviene en la etapa de iniciación de este proceso y que el citocromo P-450 participa en la etapa de propagación (Svingen y col., 1979), la inhibición de la peroxidación lipídica ocurriría, predominantemente, a nivel de la etapa de iniciación, ya que el mayor efecto inhibitorio fue hallado con microsomas que presentaban menor actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa (microsomas Co-proto y Metimazol; Tabla 4.5). La inhibición de la peroxidación de lípidos microsomal hallada en presencia de nitrofuranos confirmó los resultados obtenidos por Dubin y col., 1987 y Fernández Villamil, 1990;

- en todas las preparaciones microsomales estudiadas, el efecto inhibitorio observado fue aún mayor en presencia de los nitrofuranos ensayados (Tabla 4.5). Se han propuesto dos explicaciones posibles:

a) según Orrenius y col. (1964), el nitrofurano captaría los electrones provenientes de la oxidación del NADPH, reacción catalizada por la enzima NADPH-citocromo P-450

reductasa, interfiriendo en la iniciación de la peroxidación lipídica (Pederson y Aust, 1974; Dubin y col., 1987; Fernández Villamil, 1990);

b) la "acción antioxidante" de algunos xenobióticos bloquearía la etapa de propagación, dando término a la peroxidación lipídica (Miles y col., 1980). Buchko y Weinfeld (1993) sugirieron que el misonidazol, un nitroimidazol sustituido, protegería al ADN desnudo del daño producido por irradiación, a través del secuestro de radicales HO \cdot .

Gillette (1971), Gram y Gillette (1971) y Hewick (1982) demostraron la presencia de actividad nitro-reductasa del NFX en microsomas hepáticos. Los resultados obtenidos al estudiar el metabolismo microsomal hepático del NFX (actividad nitro-reductasa) utilizando las distintas preparaciones microsomales mostraron que, para cada una de dichas preparaciones:

- la reducción del NFX (medida a través de la disminución de absorbancia a 406 nm) fue inhibida a concentraciones de nitrofurano mayores o iguales a 0,1 mM (Figura 4.5), coincidiendo con los estudios realizados por Holtzman y col. (1981) sobre el metabolismo de la NFA;

- las gráficas de velocidad en función de la concentración de sustrato (NFX) mostraron curvas sigmoideas, indicando que la enzima involucrada en el proceso no presentaría un comportamiento michaeliano (Figura 4.5). Estos resultados concordaron con los obtenidos por Montilva y col. (1988), quienes postularon que la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa no responde al modelo cinético de Michaelis-Menten;

- empleando microsomas Control, la curva obtenida al graficar velocidad en función de la concentración de sustrato presentó un modelo cinético complejo, dependiente de la concentración de sustrato (NFX) presente en el sistema. En la zona correspondiente a bajas concentraciones de sustrato (Figura 4.5 A, zona 1) se obtuvo una curva de tipo sigmoide, seguida de una zona plana (NFX 70-80 μM), para luego continuar con una zona de comportamiento michaeliano (Figura 4.5 A, zona 2). Estos resultados sugieren la presencia de cooperatividad positiva (zona 1) y negativa (zona plana), tal como fue descrito para la enzima málica II de *T. cruzi* (Cannata y col., 1979);

El cálculo de los parámetros cinéticos correspondientes a la actividad nitro-reductasa (NADPH-citocromo P-450 reductasa) de las cuatro preparaciones microsomales mostró que, en los microsomas CoCl_2 , Co-proto y Metimazol, se produjo la disminución de la velocidad máxima aparente ($V_{\text{máx app}}$) y de la concentración de sustrato que produce la mitad de la $V_{\text{máx app}}$ ($S_{0.5}$), acompañada por un aumento en el coeficiente n de Hill (Tabla 4.6). En los microsomas CoCl_2 , la disminución en $S_{0.5}$ podría ser debida a que el NFX (sustrato alternativo) competiría con el citocromo P-450 (sustrato fisiológico) por la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa. En las condiciones experimentales estudiadas, el citocromo P-450 ejercería una inhibición de tipo competitivo sobre la actividad nitro-reductasa. La administración de CoCl_2 a las ratas provoca la disminución en el contenido microsomal de citocromo P-450 (Tabla 4.1). En consecuencia, habría una menor competencia entre el citocromo P-450 (sustrato fisiológico) y el NFX (sustrato

alternativo) por la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa, lo cual explicaría el aumento de la afinidad aparente de la misma por el sustrato alternativo NFX. Bajo las mismas condiciones experimentales, se observó la disminución en la $V_{\text{máx app}}$ de la actividad nitro-reductasa (microsomas CoCl_2 ; Tabla 4.6). Este efecto puede ser debido a que el citocromo P-450 (sustrato fisiológico de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa) ejerza un efecto inhibitorio de tipo mixto sobre la actividad nitro-reductasa.

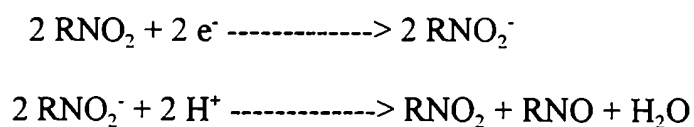
La disminución en la $V_{\text{máx app}}$ hallada en los microsomas Metimazol (Tabla 4.6) se debería a que esta droga disminuye la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa, sin afectar el contenido microsomal de citocromo P-450 (Tabla 4.1). En consecuencia, la disminución de la cantidad de enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa sería la responsable del efecto observado sobre la $V_{\text{máx app}}$ en los microsomas Metimazol. Los resultados presentados sugieren que la disminución en la $V_{\text{máx app}}$ se debería a que el Metimazol produciría una alteración conformacional en la enzima de tal manera que aumenta la afinidad aparente de la enzima por el sustrato alternativo NFX, modificando el sitio catalítico y el sitio de unión del sustrato a la enzima.

Al igual que en los casos anteriores, la actividad nitro-reductasa de los microsomas Co-proto presentó menor $V_{\text{máx app}}$ y menor $S_{0,5}$, comparada con los obtenidos con microsomas Control. Teniendo en cuenta que la administración de Co-proto causa la disminución no sólo en la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa (enzima), sino también en el contenido microsomal de citocromo P-450 (sustrato fisiológico) (Tabla 4.1),

los efectos hallados sobre la actividad nitro-reductasa del NFX podrían explicarse por la disminución en la cantidad de enzima, lo cual provocaría la disminución en la $V_{\text{máx app}}$ y la falta de competencia entre el citocromo P-450 y el NFX por la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa, implicando el aumento de la afinidad aparente de la enzima por el sustrato alternativo NFX, visualizado a través de la disminución en $S_{0,5}$ (Tabla 4.6).

Por otra parte, se encontró que la raíz cuadrada de la velocidad de reducción del NFX fue proporcional a la concentración de proteína microsomal presente en el sistema (Figura 4.6).

La proporcionalidad entre las variables mencionadas sugeriría que la reducción del nitrofurano es un proceso de segundo orden y ocurriría a través de dos etapas de reducción por un electrón más que una sola etapa donde se transfieren dos electrones, implicando la formación del radical nitroanión y, posteriormente, del nitrosoderivado (Holtzman y col., 1981), según las reacciones:



Docampo y col. (1981a), Rao y col. (1988) y Fernández Villamil y col. (1990a) detectaron la formación del radical nitroanión derivado del NFX por espectrometría de resonancia paramagnética electrónica, tanto en microsomas hepáticos como en

hepatocitos, confirmando la vía metabólica descrita.

La ausencia de reducción del NFX en presencia de NADH (Figura 4.7) sugiere que las enzimas que requieren NADH como dador de equivalentes de reducción no estarían involucradas en este metabolismo.

Las observaciones realizadas acerca del efecto de inhibidores "*in vivo*" e "*in vitro*" sobre la velocidad de reducción del NFX se pueden resumir en lo siguiente:

- los microsomas con menor contenido de citocromo P-450 (microsomas CoCl_2) reducen al NFX con velocidades similares a las producidas por los microsomas Control (Figuras 4.8 y 4.9). En cambio, los microsomas con menor actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa (microsomas Co-proto y Metimazol) reducen al NFX con menor velocidad que los microsomas Control (Figuras 4.8 y 4.9);

- al gasear con CO la mezcla de reacción utilizada para medir la reducción del NFX no se obtuvo inhibición de la reducción del nitrofurano (Figura 4.11). Estos datos sugerirían descartar la participación del citocromo P-450 en la actividad testada, teniendo en cuenta que, si el citocromo P-450 fuera responsable de la reducción del NFX, la inactivación del citocromo P-450 por CO debería haber provocado la inhibición de esa reducción. En estas condiciones experimentales, parecería que el efecto producido por el CO fue eliminar el O_2 de la mezcla de reacción, al igual que el argón o nitrógeno (Figura 4.11). La anaerobiosis así generada favoreció la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa, la cual reduciría al NFX y sería la principal responsable del metabolismo microsomal de los

nitrofuranos. Los resultados hallados al estudiar el efecto de inhibidores *"in vitro"* sobre la velocidad de reducción microsomal del NFX concuerdan con lo expuesto anteriormente ya que sólo se encontró inhibición de la reducción microsomal del NFX en presencia de AADP, un inhibidor competitivo de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa (Tabla 4.9; Ebel, 1981) y no hubo inhibición de la reducción del NFX cuando los microsomas fueron incubados con clotrimazol, un inhibidor del citocromo P-450 (Tabla 4.7; Rogerson y col., 1977).

En conjunto, los resultados descriptos (Figuras 4.9, 4.10 y 4.11 y Tablas 4.7 y 4.9) permitirían descartar la participación del citocromo P-450 en la reducción aeróbica del nitrofurano antichagásico nifurtimox, confirmando los obtenidos por Minchin y col. (1986) y Wong y Agrawal (1988), quienes postularon que la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa puede catalizar la reducción, por un electrón, del grupo nitro de un nitrocompuesto (NFA), con la consecuente formación del radical nitroanión (Figura 4.1). Por otro lado, Feller y col. (1971a y 1971b) han informado que, en hígado de rata, el niridazol y otros nitrocompuestos análogos del NFX, son reducidos predominantemente por la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa y que esta reducción no es catalizada por el citocromo P-450. Minchin y col. (1986) han demostrado que ni el citocromo P-450 ni la ciclo-oxigenasa de las prostaglandinas contribuyen a la biotransformación de la NFA. Las características de la reducción microsomal del NFX obtenida en este estudio son similares a las actividades NADPH-citocromo P-450 reductasa demostradas para el

metabolismo de varios nitrofuranos (Swamintathan y Lower, 1978; Zenzer y col., 1981) como *N*-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil]acetamida (Wang y col., 1974; Mattamal y col., 1985), furazolidona (Vroomen y col., 1987b), nitrofurantoína (Boyd y col., 1979) y otros compuestos como el nitróxido Tempol (Iannonne y col., 1989), el 2-nitroimidazol (Joseph y col., 1994) y la tirapazamina, una benzotriazina (Fitzsimmons y col., 1994). Sin embargo, Masana y col. (1984b) informaron que parte de la actividad nitro-reductasa del NFX (28%) fue sensible al CO, lo que sugeriría que el citocromo P-450 podría participar en dicho proceso, ya que el CO se une con alta afinidad al citocromo P-450 reducido, formando un complejo citocromo P-450-CO (Gram y Gillette, 1971). Los resultados obtenidos en este estudio no apoyan esta posibilidad, ya que no hemos encontrado evidencias acerca de la participación del citocromo P-450 en el metabolismo microsomal hepático del NFX (Figuras 4.9, 4.10 y 4.11 y Tablas 4.7 y 4.9). Las diferencias encontradas entre la actividad nitro-reductasa del NFX obtenida por Masana y col. (1984b) y la hallada en este laboratorio podrían atribuirse a:

- diferencias en la metodología empleada;
- la elevada concentración de NFX (0,2 mM) utilizada por Masana y col., (1984b), muy alejada de las concentraciones consideradas farmacológicas, teniendo en cuenta que la máxima concentración de NFX hallada en la sangre de los pacientes tratados con la droga es menor o igual a 50 μ M. En consecuencia, no se puede descartar la aparición de efectos secundarios y/o tóxicos a concentraciones más elevadas de nitrofurano.

Se realizaron varios experimentos para aislar y caracterizar el/los productos de la reducción microsomal del NFX. No se obtuvieron modificaciones en el espectro de absorción de luz visible obtenido con la mezcla de reacción (microsomos, NFX y NADPH) que pudieran revelar la aparición de algún metabolito (Figura 4.13). Esto podría deberse a que el/los productos:

- se encuentren en concentraciones no detectables por el método utilizado;
- tengan un bajo coeficiente de extinción, lo cual hace que pequeñas cantidades de producto formado puedan no ser detectadas;
- tengan máximos de absorción de luz en la zona del espectro que queda enmascarado por la absorción de luz producida por el NADPH (en este caso, $\lambda < 390$ nm).

El extracto orgánico del sobrenadante de 3000 rpm de la mezcla de reacción mostró un pico de absorbancia a 310 nm (Figura 4.14), coincidiendo con los resultados obtenidos por Sreider (1994) al reducir químicamente al NFX con dihidrolipoamida o ditioeritritol. Estos estudios sugieren que la reducción biológica coincidiría con la reducción química.

Se analizó por cromatografía en placa delgada la mezcla desproteinizada de la reducción biológica del NFX y su extracto clorofórmico (Figura 4.15). En ninguno de los dos casos se pudo encontrar algún metabolito producido por la reducción microsomal del NFX. Este fenómeno podría deberse a que el/los metabolitos resultantes se mantuvieran unidos a la (o las) proteína(s) encargadas de su metabolización o a otras moléculas distintas debido, presumiblemente, a su alta reactividad. Swaminathan y Lower (1978) han

postulado que la reducción del grupo nitro puede resultar en la formación de intermediarios reactivos, los cuales pueden unirse covalentemente a las macromoléculas biológicas como proteínas y ADN. Por otra parte, Hoogenboom y col. (1992) han informado que después de la administración oral de furazolidona a cerdos, la droga es metabolizada resultando en la formación de un ciano-metabolito y metabolitos derivados de la misma que no pueden ser extraídos de las macromoléculas de los tejidos (Vroomen y col. 1986 y 1987a). Ambos tipos de moléculas fueron detectados después de incubar microsomas hepáticos de rata o de cerdo en presencia de furazolidona (Vroomen y col., 1987b y 1987c). Sin embargo, la cantidad de estos metabolitos fue reducida en presencia de concentraciones fisiológicas de glutatión reducido, debido a la formación de conjugados glutatión-metabolito (Vroomen y col., 1988). La porción de estos conjugados que deriva de la furazolidona puede ser liberada y unirse nuevamente a otros compuestos con grupos tiol, incluyendo proteínas y, presumiblemente, ADN. Se ha sugerido que estos conjugados con grupos tiol reactivos serían los responsables de la formación de metabolitos no extraíbles en tejidos de ratas alimentadas con carne porcina previamente tratada con el nitrofurano (Vroomen y col., 1990).

La incubación de microsomas, NFX y NADPH provocó la formación de un metabolito distinto del NFX que fue detectado por HPLC luego de una hora de iniciada la reacción (Figura 4.16). Dicho metabolito se mantuvo hasta después de 2 horas de incubación aunque con menor área, lo cual indicaría que este metabolito sería un

intermediario inestable en la vía metabólica, que continuaría reduciéndose o sería degradado por el sistema microsomal. Otra posibilidad sería que ese metabolito fuera uno de los productos finales de la reducción, capaz de formar conjugados con glutatión o de reaccionar con las proteínas microsomales (Vroomen y col., 1986, 1987a, 1987b, 1987c, 1988 y 1990; Hoogenboom y col., 1992). Es probable que esta última hipótesis sea correcta, ya que:

- la máxima cantidad de metabolito formado se produjo a la hora de iniciada la reacción;
- dos horas después del inicio de la misma el área del pico correspondiente al metabolito fue menor a la hallada a la primera hora de incubación;
- la muestra utilizada para el análisis por HPLC estaba desproteínizada.

Cuando se utilizaron hepatocitos aislados como modelo experimental, se detectaron tres metabolitos provenientes de la reducción del NFX, por HPLC. Uno de ellos coincidió con el obtenido en la reducción del NFX por microsomas hepáticos (RT = 3,97 min, Figura 4.16 y RT = 3,96 min, Figura 4.17). Los otros dos podrían ser formados por otros sistemas enzimáticos presentes en la célula y no en las membranas microsomales. Se ha descrito que varias enzimas pueden participar en la reducción de los nitrofuranos. Ellas son: las enzimas microsomales NADPH-citocromo P-450 reductasa (Gillette y col., 1968; Feller y col., 1971a y 1971b; Wang y col., 1974; Swaminathan y Lower, 1978; Boyd y col., 1979; Zenzer y col., 1981; Masana y col., 1984b; Mattamal y col., 1985; Minchin y col., 1986; Vroomen y col., 1987b; Wong y Agrawal, 1988) y NADPH-citocromo c

reductasa (Feller y col., 1971a) y las enzimas citosólicas DT-diaforasa (Kato y col., 1970; Tatsumi y col., 1979), xantina oxidasa (Wang y col., 1974; Tatsumi y col., 1979; Clarke y col., 1980 y 1982), aldehído oxidasa (Wolpert y col., 1973) y lipoamida deshidrogenasa (Beuding y Jolliffe, 1946; Tatsumi y col., 1979; Sreider y col., 1992). Estos sistemas enzimáticos podrían catalizar la formación de los otros dos metabolitos (no identificados) hallados al reducir al NFX en presencia de hepatocitos.

En este trabajo se encontró que los metabolitos derivados del NFX no dieron la reacción colorimétrica empleada para la determinación de aminas aromáticas primarias, no pudiendo descartarse la posibilidad de que el derivado amina se produzca, no detectándose por este método. Otras explicaciones posibles sugerirían que:

- el grupo nitro no sería reducido a su derivado amina correspondiente;
- el derivado amina producido sería capaz de unirse covalentemente a las macromoléculas, impidiendo la formación de la sal de diazonio utilizada para su identificación y cuantificación (punto 4.3.4);
- el anillo aromático del nitrofurano podría degradarse durante la reacción, generando una amina alifática no detectable por el método empleado.

En 1987, Tsai propuso que, en presencia de lipoamida deshidrogenasa reducida, la 4-nitropiridina se reduce a su derivado 4-hidroxiaminopiridina, sin llegar a formar la amina aromática primaria detectable por este método.

Se ha postulado que, en general, la reducción del grupo nitro es el camino

metabólico de los nitrofuranos, resultando en la formación de los derivados nitroso e hidroxilamina, intermediarios reactivos responsables de la interacción con las macromoléculas biológicas (Figuras 1.5 y 4.1; Biaglow y col., 1986). También se ha informado la producción de un ciano-derivado como producto final y estable del metabolismo reductivo de estos nitrocompuestos (Swaminathan y Lower, 1978). Estudiando el metabolismo de la furazolidona, Vroomen y col. (1987c) y Hoogenboom y col. (1992) identificaron el ciano-derivado de dicho nitrofurano. Los resultados presentados en este trabajo concuerdan con esta vía metabólica ya que, el análisis por espectrometría de masa y espectrometría ultravioleta de los productos de la reducción del NFX con ditionito de sodio reveló que se forman dos compuestos: un ciano-derivado de menor peso molecular que el NFX y la amina proveniente del nitrofurano (Figura 4.18).

Por otra parte, Kriek y Westra (1979) establecieron que la reducción de los compuestos nitroaromáticos a aril-aminas ocurriría a través de los mismos intermediarios reactivos, tanto "*in vivo*" como "*in vitro*". Sobre esta base, se podría sugerir que los productos de la reducción microsomal del NFX serían un ciano-metabolito y la amina correspondiente al nitrofurano (Figura 4.18).

La falta de posibilidades de obtener [¹⁴C]-NFX frustró los estudios sobre las posibles interacciones entre los metabolitos reactivos del NFX surgidos durante la nitro-reducción del mismo con los componentes tisulares tanto "*in vivo*" como "*in vitro*". Un estudio más detallado de los productos de reducción del nifurtimox sería de gran utilidad

para aclarar los mecanismos de toxicidad de esta droga en mamíferos.

En conclusión, los resultados presentados sugieren que el citocromo P-450 microsomal hepático no participaría en el metabolismo reductivo del NFX. La enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa sería la enzima principalmente responsable de dicho metabolismo.

5. METABOLISMO HEPÁTICO DEL 5'-NITROINDOL.

Los nitroarenos heterocíclicos son ampliamente utilizados como agentes quimioterapéuticos. Dentro de los nitroarenos testeados por su actividad mutagénica en *Salmonella*, el 5'-nitroindol (NI) resultó ser uno de los más efectivos (Chiu y col., 1978; Vance y Levin, 1984; Vance y col., 1986; Klopman y Rosenkranz, 1991). Debido a que no se halla información disponible sobre la acción de este compuesto en células eucarióticas, fue interesante estudiar la acción del NI en hepatocitos de rata, con el objeto de dilucidar el mecanismo de acción de este nitroderivado. La acción metabólica del NI fue investigada usando varios parámetros bioquímicos:

- a) niveles de ATP, ADP y AMP en hepatocitos (Redegeld y col., 1992);
- b) carga energética de adenilatos (Atkinson, 1968);
- c) transporte de electrones;
- d) peroxidación de lípidos (Högberg y col., 1975; Biasi y col., 1991; Carini y col., 1992);
- e) liberación de la actividad LDH (Wroblevski y LaDue, 1955).

Además, se investigaron los siguientes parámetros en mitocondrias de hígado de rata:

- f) transporte de electrones y fosforilación oxidativa acoplada;
- g) incorporación de Ca^{2+} y K^{+} ;
- h) actividad F_1F_0 -ATP sintasa ATPasa.

La carga energética de adenilatos definida por la ecuación

$$\text{Carga energética} = \frac{\text{ATP} + 0,5 \text{ ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}} \quad (\text{Atkinson, 1968})$$

$$\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}$$

depende esencialmente del nivel intracelular de ATP, un factor limitante de la viabilidad celular (Redegeld y col., 1992). La peroxidación de lípidos es uno de los mecanismos básicos de daño celular (Högberg y col., 1975; Biasi y col., 1991; Carini y col., 1992). En consecuencia, la alteración de la permeabilidad mitocondrial producida por los productos de la peroxidación de lípidos puede causar la depleción de ATP (Carini y col., 1992). Finalmente, el daño irreversible hace que la membrana plasmática sea incapaz de prevenir la liberación de moléculas citosólicas, particularmente moléculas proteicas, contribuyendo de esta forma a la muerte celular (Moldéus y col., 1978; Redegeld y col., 1992).

Los estudios realizados sobre la relación estructura-actividad indican que el grupo nitro puede ser el responsable de la actividad biológica de estos nitrocompuestos (Mason y Holtzman, 1975; Ames y col., 1986; Marr y Docampo, 1986; Kedderis y Miwa, 1988). Las reacciones del ciclo redox de estos compuestos pueden producir radicales del oxígeno, los cuales son responsables de su toxicidad (Marr y Docampo, 1986; Fernández Villamil y col., 1990b; Dubin y col., 1991). Es así que los efectos del NI fueron comparados con los producidos por los nitrofuranos, compuestos caracterizados por su capacidad de producir oxi-radicales, como el compuesto antichagásico nifurtimox (Marr y Docampo, 1986; Fernández Villamil y col., 1990a y 1990b; Dubin y col., 1991).

5.1. Carga energética de adenilatos.

La incubación de hepatocitos en presencia de NI produjo la depleción del ATP intracelular en una forma dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de droga (Figura 5.1).

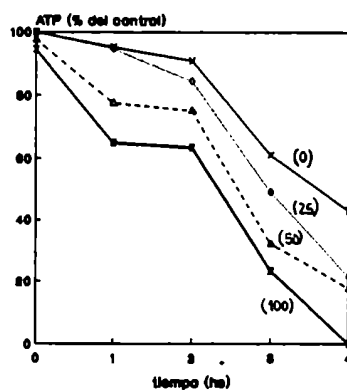


FIGURA 5.1. Niveles de ATP en hepatocitos incubados en presencia de NI. Entre paréntesis, concentración de NI (μM). Otras condiciones experimentales se describen en Métodos; n=8.

Bajo estas condiciones experimentales, la cinética de la depleción de ATP fue bifásica. Después de las primeras dos horas de incubación (primer período), la caída en

el nivel de ATP fue de un 7% ($p<0,025$), 17% y 30% ($p<0,005$) en presencia de NI 25, 50 y 100 μM , comparado con la muestra que contiene DMFA al mismo tiempo de incubación. Durante las últimas dos horas de incubación (segundo período), la velocidad de la depleción de ATP se incrementó en todas las muestras. Después de cuatro horas de incubación con NI 25, 50 y 100 μM , la caída en el contenido de ATP fue 50 ($p<0,005$), 59 ($p<0,01$) y 100% ($p<0,005$), respecto de la muestra control (DMFA). La variación de ATP podría implicar una variación contraria en ADP y/o en AMP. En consecuencia, se midieron los niveles de los tres nucleótidos (Tabla 5.1).

Los resultados de la Tabla 5.1 pueden ser descriptos de la siguiente forma:

- a) en hepatocitos control (NI 0 μM), los niveles de nucleótidos no variaron significativamente durante el primer período de incubación (0-2 horas), pero el ATP decreció y el AMP aumentó en el segundo período (2-4 horas);
- b) NI 25, 50 y 100 μM causaron la disminución en el contenido de ATP y el aumento del AMP durante ambos períodos de incubación (0-4 horas);
- c) bajo las mismas condiciones experimentales, el nivel de ADP no se modificó significativamente;
- d) en hepatocitos control, la DMFA no afectó significativamente el contenido de ATP, ADP y AMP durante el primer período de incubación, pero disminuyó el nivel de ATP (28%) y aumentó el AMP (11%) en el segundo período, comparado con un sistema carente de DMFA (control de solvente).

TABLA 5.1. Efecto del NI sobre los niveles de ATP, ADP y AMP en hepatocitos.

NI (μ M)	AXP	Tiempo de incubación (hs)				
		0	1	2	3	4
0	ATP	20,50 \pm 0,50	19,50 \pm 0,77	18,63 \pm 0,48	12,46 \pm 0,43 ^b	8,78 \pm 0,41 ^d
	ADP	3,99 \pm 0,26	3,78 \pm 0,19	3,84 \pm 0,18	3,29 \pm 0,16	3,45 \pm 0,26
	AMP	0,98 \pm 0,05	0,93 \pm 0,06	0,90 \pm 0,08	1,83 \pm 0,06 ^b	3,16 \pm 0,42 ^d
25	ATP	21,36 \pm 0,79	19,39 \pm 1,07	17,33 \pm 0,56 ^b	10,03 \pm 0,28 ^c	4,35 \pm 0,31 ^d
	ADP	3,92 \pm 0,11	3,83 \pm 0,07	3,86 \pm 0,09	3,46 \pm 0,27	3,22 \pm 0,15
	AMP	1,01 \pm 0,03	1,12 \pm 0,02	1,06 \pm 0,02 ^a	3,08 \pm 0,11 ^d	4,31 \pm 0,44 ^b
50	ATP	20,01 \pm 0,30	15,88 \pm 0,24 ^c	15,40 \pm 0,37 ^d	6,56 \pm 0,54 ^b	3,63 \pm 0,36 ^c
	ADP	3,78 \pm 0,03	3,75 \pm 0,01	4,01 \pm 0,05	3,54 \pm 0,29	3,84 \pm 0,06
	AMP	1,00 \pm 0,07	1,39 \pm 0,06 ^a	1,85 \pm 0,12 ^b	3,61 \pm 0,15 ^b	4,80 \pm 0,24 ^d
100	ATP	19,38 \pm 0,86	13,30 \pm 0,91 ^d	13,00 \pm 0,58 ^d	4,73 \pm 0,39 ^d	0 ^d
	ADP	3,76 \pm 0,24	3,51 \pm 0,18	3,90 \pm 0,24	3,44 \pm 0,28	3,21 \pm 0,20
	AMP	0,93 \pm 0,06	1,60 \pm 0,05 ^b	2,08 \pm 0,08 ^c	4,02 \pm 0,13 ^d	5,11 \pm 0,12 ^d

Las condiciones experimentales se describen en Métodos. Los valores se expresan en nmol nucleótido/10⁶ hepatocitos y son el promedio \pm E.S.M. de, por lo menos, 8 determinaciones independientes por duplicado. AXP: nucleótido de adenina. ^a: p<0,05; ^b: p<0,025; ^c: p<0,01; ^d: p<0,005. Las diferencias significativas halladas para NI 0 μ M fueron calculadas respecto del valor obtenido a tiempo cero, para el mismo parámetro estudiado.

ATP, ADP y AMP constituyen el sistema celular de adenilatos, cuya carga energética tiene una importante función regulatoria de actividades enzimáticas y metabolismo celular (Atkinson, 1968). Los valores calculados a partir de la Tabla 5.1 se muestran en la Tabla 5.2. Se puede observar que:

- a) la carga energética de adenilatos de los hepatocitos Control no varió durante el primer período de incubación pero disminuyó ($p < 0,05$) durante el segundo período;
- b) en el caso de los hepatocitos tratados con NI, la carga energética de adenilatos disminuyó significativamente, particularmente en el segundo período con NI 25, 50 y 100 μM ($p < 0,025$);
- c) bajo condiciones experimentales similares, el derivado nitrofurano NFX no disminuyó en forma significativa la carga energética de adenilatos;
- d) la relación ATP/ADP, reflejo del potencial fosforilante, varió en forma correlacionada con la carga energética;
- e) el contenido total de adenilatos de los hepatocitos tratados con NI 25, 50 y 100 μM disminuyó significativamente durante ambos períodos de incubación. Se ha demostrado que la viabilidad celular depende, entre otras variables, del ATP intracelular (Redegeld y col., 1992). Es por eso que fue interesante establecer el efecto del NI sobre la liberación de la actividad LDH al medio extracelular, parámetro de viabilidad del hepatocito (Moldéus y col., 1978). Se determinó la salida de LDH de los hepatocitos control y tratados con NI. Los resultados correspondientes se muestran en la Tabla 5.3.

TABLA 5.2. Efecto del NI y del NFX sobre los parámetros del sistema de adenilatos.

Nitro-compuesto (μM)	Tiempo de incubación (hs)				
	0	1	2	3	4
Parámetro: Carga energética de adenilatos: $[(\text{ATP}) + 0,5 (\text{ADP})] / [(\text{ATP}) + (\text{ADP}) + (\text{AMP})]$					
NI (0)	0,88 \pm 0,03	0,88 \pm 0,04	0,88 \pm 0,03	0,80 \pm 0,03	0,67 \pm 0,04 ^a
NI (25)	0,89 \pm 0,04	0,88 \pm 0,06	0,87 \pm 0,03	0,71 \pm 0,02 ^b	0,50 \pm 0,04 ^c
NI (50)	0,88 \pm 0,02	0,84 \pm 0,02	0,82 \pm 0,02	0,61 \pm 0,05 ^c	0,45 \pm 0,03 ^d
NI (100)	0,88 \pm 0,05	0,82 \pm 0,08	0,75 \pm 0,04 ^b	0,53 \pm 0,04 ^c	0,19 \pm 0,01 ^d
NFX (0)	0,89 \pm 0,06	0,89 \pm 0,04	0,88 \pm 0,03	0,84 \pm 0,03	0,83 \pm 0,03
NFX (25)	0,91 \pm 0,04	0,83 \pm 0,02	0,83 \pm 0,03	0,83 \pm 0,03	0,81 \pm 0,03
NFX (50)	0,89 \pm 0,04	0,83 \pm 0,03	0,83 \pm 0,05	0,81 \pm 0,04	0,80 \pm 0,04
Parámetro: $(\text{ATP}) / (\text{ADP})$					
NI (0)	5,14 \pm 0,36	5,16 \pm 0,33	4,85 \pm 0,26	3,78 \pm 0,22 ^c	2,54 \pm 0,22 ^d
NI (25)	5,45 \pm 0,25	5,06 \pm 0,38	4,49 \pm 0,18	2,90 \pm 0,24 ^d	1,35 \pm 0,11 ^c
NI (50)	5,30 \pm 0,29	4,23 \pm 0,26	3,84 \pm 0,10 ^c	1,85 \pm 0,21 ^d	0,94 \pm 0,42 ^d
NI (100)	5,15 \pm 0,40	3,79 \pm 0,32 ^c	3,53 \pm 0,33 ^c	1,38 \pm 0,15 ^d	0 ^d
Parámetro: $(\text{ATP}) + (\text{ADP}) + (\text{AMP})$					
NI (0)	24,90 \pm 0,60	24,20 \pm 0,80	23,30 \pm 0,50	17,80 \pm 0,50 ^b	15,30 \pm 0,60 ^d
NI (25)	26,30 \pm 0,80	24,30 \pm 1,10	22,20 \pm 0,60 ^a	16,60 \pm 0,40 ^c	11,90 \pm 0,60 ^d
NI (50)	24,80 \pm 0,30	21,00 \pm 0,40 ^b	21,30 \pm 0,40 ^b	13,70 \pm 0,90 ^d	12,30 \pm 0,40 ^d
NI (100)	24,90 \pm 1,10	18,40 \pm 0,90 ^c	18,90 \pm 0,60 ^c	12,20 \pm 0,50 ^d	8,70 \pm 0,20 ^d

Los valores fueron calculados tomando los datos presentados en la Tabla 5.1. ^a: $p < 0,05$; ^b: $p < 0,025$; ^c: $p < 0,01$; ^d: $p < 0,005$.

TABLA 5.3. Efecto del NI sobre la pérdida de actividad LDH en hepatocitos de rata.

Tiempo de incubación (hs)	LDH (m-unidades/10 ⁶ células)		
	NI 0 μ M	NI 50 μ M	NI 100 μ M
0	0,91 \pm 0,09	0,85 \pm 0,09	1,16 \pm 0,12
1	1,01 \pm 0,10	0,96 \pm 0,06	1,03 \pm 0,01
2	1,13 \pm 0,16	1,15 \pm 0,10	1,46 \pm 0,14
3	1,69 \pm 0,09	1,58 \pm 0,03	1,76 \pm 0,47
4	1,91 \pm 0,25	2,62 \pm 0,24 ^d	3,49 \pm 0,09 ^d

Las condiciones experimentales se describen en Métodos. Los valores representan el promedio \pm E.S.M. de, por lo menos, tres determinaciones independientes.

^d: $pM < 0,005$, respecto del valor obtenido a tiempo cero en las mismas condiciones experimentales.

Se puede observar que, en los hepatocitos tratados con NI, la actividad LDH en el medio extracelular no se incrementó por encima del valor control, excepto después de cuatro horas de incubación con NI 50 o 100 μ M. En los hepatocitos control (incubados con DMFA) la presencia del solvente no afectó la salida de LDH al medio extracelular, comparada con un sistema carente de DMFA (control de solvente).

5.2. Transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa en hepatocito aislado.

La regulación del nivel de ATP en hepatocitos depende de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Jones y col., 1992; Brand y col., 1993) y, en consecuencia, se estudió el efecto del NI sobre la transferencia de electrones en mitocondrias. La Tabla 5.4 muestra el efecto del NI sobre la respiración sensible a antimicina y la respiración insensible a antimicina en hepatocitos. Esta última no fue afectada significativamente por el NI, pero la primera fue inhibida en un 20% y 69% en presencia de NI 100 y 200 μM , respectivamente (valores A-B; Tabla 5.4).

La Tabla 5.5 muestra el efecto del NI sobre la velocidad de respiración en mitocondrias acopladas, con MGM o succinato como sustratos. Se puede observar que:

- a) con MGM con sustrato y mitocondrias en estado metabólico "3" (respiración activa o descontrolada; Chance y Hollunger, 1963), el NI produjo inhibición significativa de la respiración (34%, 51% y 63% con NI 50, 100 y 200 μM , respectivamente);
- b) con la misma mezcla de sustratos y mitocondrias en el estado metabólico "4", el NI activó la respiración en grado significativo (1,5 veces, con NI 200 μM), induciendo así, el estado metabólico "3u" ("3u", Chance y Hollunger, 1963);
- c) como resultado de las variaciones opuestas de la respiración en el estado "3" y "3u", el índice de control respiratorio calculado como la relación Estado "3"/Estado "4" (o "3u") disminuyó significativamente;

d) con succinato como sustrato y mitocondrias en estado "3", el NI no afectó la velocidad de respiración, pero con mitocondrias en estado "4", el NI activó significativamente la oxidación del succinato (2,2 veces).

TABLA 5.4. Efecto del NI sobre la respiración en hepatocitos. Influencia de la antimicina.

NI (μM)	Velocidad de respiración [n átomos O x (min) ⁻¹ x (10 ⁶ células) ⁻¹]		
	A: antimicina 0 μM	B: antimicina 25 μM	A-B
0	25,9 ± 2,5	14,2 ± 0,5	11,7
25	24,1 ± 3,2	10,6 ± 2,0	13,5
50	22,6 ± 3,0	11,1 ± 2,1	11,5
100	21,4 ± 2,8	12,1 ± 2,0	9,3
200	16,8 ± 2,1 ^a	12,4 ± 1,5	4,4

La respiración en hepatocitos fue medida tal como se describe en Métodos. La mezcla de reacción contenía 6×10^5 células/ml suspendidas en solución Krebs-Henseleit, suplementada con HEPES 12,5 mM, pH 7,4 y saturada con oxígeno. Los valores representan la media ± desvío estándar de tres determinaciones independientes realizadas por duplicado.

^a: $p < 0,05$ respecto de NI 0 μM en las mismas condiciones experimentales.

TABLA 5.5. Efecto del NI sobre la oxidación de sustratos por mitocondrias de hígado de rata.

NI (μM)	Velocidad de oxidación [n átomos O x (min) ⁻¹ x (mg proteína) ⁻¹]		
	Estado "3" (A)	Estado "4" o "3u" (B)	A/B
Sustrato: L-malato 5,0 mM + L-glutamato 5,0 mM			
0	81,9 ± 2,7	19,3 ± 2,5	4,47 ± 0,57
25	71,3 ± 6,6	20,9 ± 2,8	3,68 ± 0,64
50	54,1 ± 4,5 ^d	22,4 ± 3,4 ^d	2,65 ± 0,47 ^a
100	39,9 ± 0,5 ^c	26,0 ± 5,4 ^c	1,71 ± 0,28 ^d
200	30,0 ± 4,3 ^c	31,1 ± 6,3 ^c	1,00 ± 0,08 ^c
Control	101,8 ± 2,0	20,2 ± 1,5	5,19 ± 0,48
Sustrato: succinato 10 mM			
0	156 ± 5,9	39,3 ± 2,7	4,05 ± 0,34
25	169 ± 3,8	47,0 ± 3,8	3,68 ± 0,32
50	166 ± 6,8	54,8 ± 4,2 ^b	3,10 ± 0,30
100	157 ± 9,9	67,8 ± 6,5 ^c	2,39 ± 0,25 ^c
200	141 ± 7,8	87,6 ± 6,4 ^c	1,67 ± 0,20 ^c
Control	160	41,1	4,31

Las condiciones experimentales se describen en Métodos. Los valores son el promedio ± E.S.M. de cuatro determinaciones independientes realizadas por duplicado. Control, muestra sin DMFA. ^a: p<0,05; ^b: p<0,025; ^c: p<0,01; ^d: p<0,005.

De acuerdo con el efecto del NI sobre la respiración mitocondrial en el estado

metabólico "4" (Tabla 5.5), el agregado de NI a un sistema conteniendo mitocondrias y succinato (en ausencia de ADP) cambio los niveles redox de los citocromos $c + c_1$ y b reducidos hacia su estado oxidado. Un experimento tipico se describe en la Figura 5.2. El efecto del NI sobre los citocromos $c + c_1$ fue dependiente de la concentracion, concordando con los resultados presentados en la Tabla 5.5.

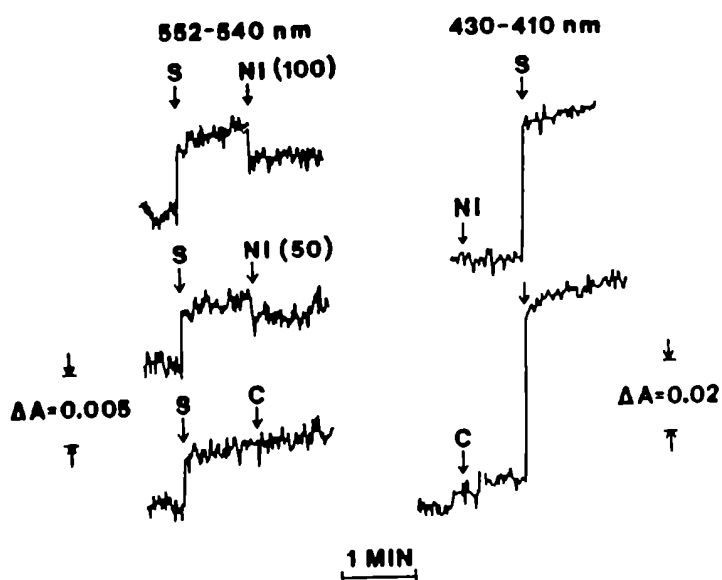


FIGURA 5.2. Efecto del NI sobre el estado redox de los citocromos ($c + c_1$) y b . La mezcla de reaccion se describe en la leyenda de la Tabla 5.5 y contenia rotenona 3 μ M y 0.5 mg de proteina mitocondrial/ml. Succinato 10 mM (S) y NI (100 μ M, salvo que se indique lo contrario) fueron agregados cuando se indica en la Figura. C (control) indica 40 μ l de DMFA, el mismo volumen que la solucion de NI. El par de longitudes de onda utilizado est\u00e1 indicado en la Figura. Las variaciones de los trazados hacia arriba o hacia abajo indican reduccion u oxidacion de los citocromos, respectivamente. Cuando se midi\u00f3 la reduccion del citocromo b , la variacion de absorbancia fue compensada despu\u00e9s del agregado de NI. Otras condiciones experimentales se describen en M\u00e9todos.

En otra serie de experimentos se estudi\u00f3 el efecto del NI sobre la transferencia de electrones en membranas mitocondriales rotas (mitocondrias desacopladas). Los

resultados presentados en la Tabla 5.6 muestran que, en ausencia de antimicina, el NI inhibió la oxidación del NADH en una forma dependiente de la concentración. En cambio, los derivados nitrofuranos NFZ y NFA, sólo lo hicieron en forma muy débil o no la inhibieron, respectivamente.

TABLA 5.6. Efecto de los nitro-compuestos sobre la actividad NADH-oxidasa mitocondrial.

Nitrocompuesto (μM)	Antimicina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	Consumo de oxígeno [n át O x (min) ⁻¹ x (mg proteína) ⁻¹]
Ninguno	0	47,1
NI (50)	0	41,4 (12)
NI (100)	0	29,1 (38)
NI (200)	0	23,0 (51)
NFA (220)	0	46,8 (0,4)
NFZ (200)	0	45,0 (4,4)
NF-pirazol (200)	0	66,2
NF-triazol (200)	0	63,8
Ninguno	1	7,3
NI (100)	1	23,1
NF-pirazol (100)	1	37,1

El consumo de oxígeno fue medido polarográficamente. Las condiciones experimentales se describen en Métodos. La mezcla de reacción contenía mitocondrias rotas (20 mg de proteína/ml), NADH 2,5 mM y nitro-compuesto como se indicó anteriormente. Los valores representan el promedio de, al menos, determinaciones por duplicado. Entre paréntesis, porcentaje de inhibición del consumo de oxígeno.

El NF-pirazol y el NF-triazol, dos derivados nitrofuranos que, en presencia de dadores de electrones y oxígeno, consumen oxígeno y producen radicales del oxígeno (Fernández Villamil y col., 1990b; Dubin y col., 1991), incrementaron el consumo de oxígeno catalizado por las membranas mitocondriales independientemente de la presencia de antimicina en el medio de reacción. Los resultados presentados en la Tabla 5.6 prueban que las membranas mitocondriales estudiadas podrían catalizar la reducción del grupo nitro a través de un ciclo redox. Esta catálisis no ocurrió con NI. Estas observaciones fueron confirmadas usando ascorbato como dador de electrones (Tabla 5.7).

TABLA 5.7. Efecto de los nitrocompuestos sobre la oxidación del ascorbato.

Nitro-compuesto (μM)	Consumo de oxígeno ($\mu\text{M O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$)
Ninguno	0
NFX (300)	32 \pm 2
NFA (200)	29 \pm 2
NFZ (200)	33 \pm 2
NI (220)	3 \pm 2

La mezcla de reacción contenía ascorbato de Na 5,0 mM, DETAPAC 1,0 mM, solución Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 y nitro-compuesto como se indica. El consumo de oxígeno fue medido polarográficamente. Otras condiciones experimentales se indican en Métodos. Los valores representan el promedio \pm E.S.M. de, por lo menos, tres determinaciones independientes realizadas por duplicado.

5.3. Actividad ATPasa latente.

En mitocondrias, la enzima F_1F_0 -ATP sintasa es un componente esencial del sistema transductor de energía. Tomando esto junto con los resultados descriptos en la Tabla 5.5, se examinó la acción del NI sobre la actividad latente de la enzima ATPasa. Los resultados presentados en la Tabla 5.8 muestran que, tanto el NI 100 μ M como NI 200 μ M, estimularon la hidrólisis de ATP, en contraste con los resultados obtenidos con las membranas mitocondriales rotas, en las cuales la actividad ATPasa latente no fue modificada en grado significativo por la presencia de NI.

TABLA 5.8. Efecto del NI sobre la hidrólisis de ATP en mitocondrias acopladas y desacopladas.

NI (μ M)	Actividad ATPasa (m-unidades/mg proteína)	
	Mitocondrias acopladas	Mitocondrias desacopladas
0	32 \pm 9	175 \pm 45
25	33 \pm 9	176 \pm 40
50	39 \pm 8	180 \pm 50
100	49 \pm 5 ^a	174 \pm 50
200	67 \pm 7 ^b	175 \pm 60

La actividad F_1F_0 -ATP sintasa ATPasa fue medida por la velocidad de hidrólisis de ATP. La mezcla de reacción contenía 0,32-0,68 mg de proteína mitocondrial/ml. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos. Los valores representan el promedio \pm E.S.M. de 4 medidas independientes. ^a: $p < 0,01$; ^b: $p < 0,001$ respecto de NI 0 μ M.

5.4. Aumento del volumen mitocondrial (swelling).

En presencia de aniones permeantes, el Ca^{2+} es acumulado rápidamente por la mitocondria en un proceso dependiente de energía que induce el aumento del volumen mitocondrial y la liberación de H^+ (Lehninger y col., 1967; Pietrobon y col., 1990). La Figura 5.3 muestra que:

a) con MGM como sustrato (trazados A y B), el NI inhibió el swelling mitocondrial en un 84%;

b) el swelling dirigido endógenamente fue estimulado por NI (trazados C y D);

c) el swelling dirigido por succinato fue inhibido un 25% por NI (trazados E y F). En todos los casos, el agregado de EGTA bloqueó el swelling mitocondrial, demostrando así el papel del Ca^{2+} en la variación del volumen mitocondrial. La contracción del volumen mitocondrial por EGTA y ATP (Figura 5.3, trazados E y F) fue inhibida un 27% en presencia de NI. La Tabla 5.9 resume el efecto de concentraciones crecientes de NI sobre el consumo de Ca^{2+} . Se puede observar que, con MGM como sustrato, el NI disminuyó la velocidad de swelling a las mismas concentraciones que inhibieron la oxidación del MGM (Tabla 5.5), mientras que con succinato, el NI sólo inhibió el consumo de Ca^{2+} a una concentración de 200 μM .

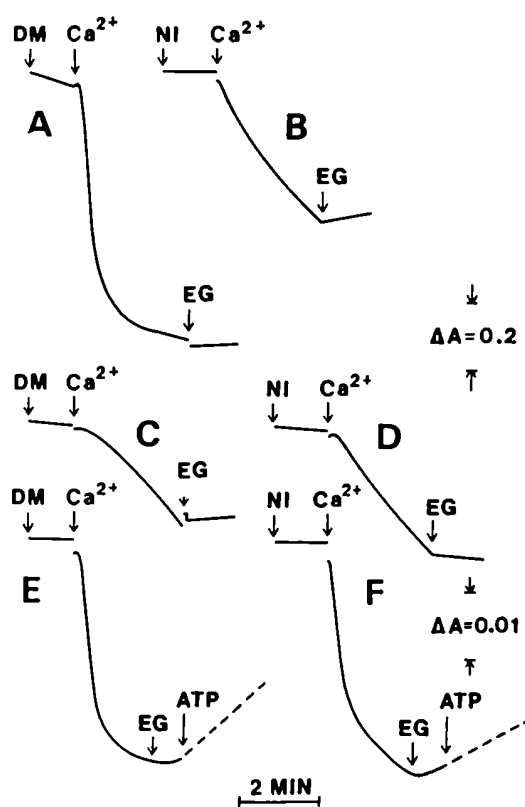


FIGURA 5.3. Efecto del NI sobre el swelling mitocondrial después del agregado de Ca²⁺. Medio de reacción: Sacarosa 0,1 M, KCl 50 mM, MOPS 20 mM, KH₂PO₄ 0,2 mM, pH 7,2, rotenona 0,8 μM (sólo en los experimentos E y F) y 0,4 mg de proteína mitocondrial/ml. Sustratos agregados: A y B. L-malato 1,7 mM, L-glutamato 1,7 mM, malonato 0,8 mM; C y D. sin sustrato exógeno; E y F, succinato 5 mM. NI 200 μM se agregó como se indica en la Figura y las muestras control recibieron el mismo volumen de DMFA (DM). CaCl₂ 120 μM (Ca²⁺), EGTA 0,1 mM (EG), y ATP 2,5 mM + MgCl₂ 5 mM (ATP) se agregaron como se indica en la Figura. Los trazados posteriores al agregado de ATP son leídos teniendo en cuenta la escala de ΔA ubicada más abajo.

TABLA 5.9. Efecto del NI sobre el swelling mitocondrial después del agregado de Ca^{2+} .

Sustrato	NI (μM)	Parámetros de swelling	
		Velocidad inicial ($\Delta\text{A} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$)	Swelling máximo ($\Delta\text{A} \times \text{mg prot}^{-1}$)
MGM	0	2,13	1,07
	50	1,74	1,11
	100	0,88 (59)	1,04
	200	0,34 (84)	0,65 (40)
Succinato	0	0,52	0,29
	100	0,49 (5)	0,29
	200	0,39 (25)	0,27

Las condiciones experimentales se describen en la leyenda de la Figura 5.3. Los valores representan el promedio de, al menos, dos determinaciones realizadas por duplicado. Entre paréntesis, porcentaje de inhibición del swelling mitocondrial.

El agregado de valinomicina a las mitocondrias en presencia de K^+ y fosfatos acelera la penetración de K^+ , la cual puede ser dirigida por la energía derivada de la oxidación de sustratos o de la hidrólisis de ATP (Pressman, 1969). La Figura 5.4 muestra los resultados de un experimento típico en el que se estudió el efecto del NI sobre el swelling inducido por valinomicina. NI 200 μM inhibió completamente el aumento del

volumen mitocondrial sustentado por la oxidación de sustratos endógenos. Por otra parte, NI inhibió el swelling dependiente de ATP en un grado mucho menor, pero no se pudo obtener la expresión cuantitativa de esta inhibición debido a que la velocidad del swelling inducido por ATP fue demasiado rápida como para ser medida. El efecto del NI sobre el swelling inducido por valinomicina coincide con resultados previos obtenidos con esteroides (Boveris y Stoppani, 1971).

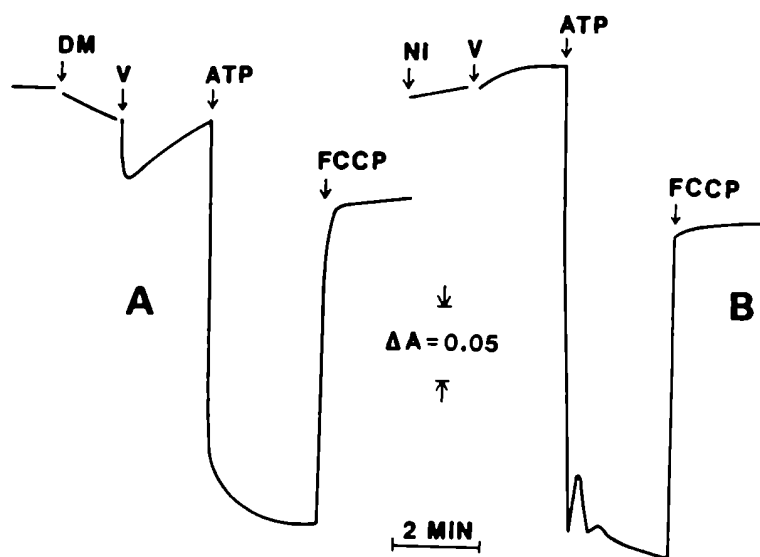


FIGURA 5.4. Efecto del NI sobre el swelling mitocondrial después del agregado de valinomicina. El medio de reacción fue descrito en la leyenda de la Figura 5.3. excepto que la rotenona fue omitida. Mitocondrias (0.75 mg de proteína/ml), NI 200 μ M, valinomicina 80 nM (V), ATP 2 mM. DMFA (DM 40 μ l) y FCCP 2 μ M se agregaron como se indica en la Figura. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos.

5.5. Peroxidación de lípidos.

El proceso de peroxidación lipídica es considerado importante en el daño hepático por agentes tóxicos (Högberg y col., 1975; Biasi y col., 1991; Carini y col., 1992). En consecuencia, se investigó el efecto del NI sobre la producción de MDA en hepatocitos.

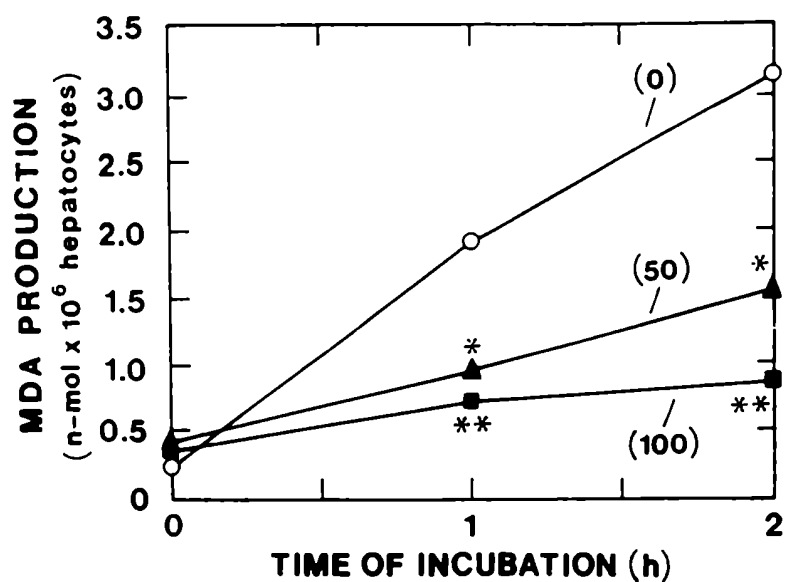


FIGURA 5.5. Efecto del NI sobre la producción de MDA en hepatocitos. Las concentraciones de NI se indican entre paréntesis sobre la Figura. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos. Los valores son el promedio de, al menos, tres determinaciones independientes realizadas por duplicado y fueron comparadas con la muestra conteniendo DMFA al mismo tiempo de incubación. *: $p < 0.01$; **: $p < 0.001$.

Los resultados presentados en la Figura 5.5 indican que:

- a) en hepatocitos control, la producción de MDA aumenta linealmente en función del

tiempo de incubación;

b) el NI inhibió la producción de MDA. Esta inhibición ocurrió a las mismas concentraciones de NI que afectaron la carga energética de adenilatos (50 y 100 μM).

La peroxidación de lípidos se produce tanto en microsomas como en mitocondrias. Por ello, se examinó el efecto del NI sobre la producción de MDA en esas organelas. Los resultados presentados en la Tabla 5.10 muestran que el NI inhibió la peroxidación lipídica microsomal, coincidiendo con el efecto observado en hepatocitos.

TABLA 5.10. Efecto del NI sobre la peroxidación de lípidos en microsomas y mitocondrias de hígado de rata.

NI (μM)	Sustancias TBA-reactivas (nmol MDA/mg proteína)			
	Microsomas		Mitocondrias	
	Sistema generador de NADPH	Sistema <i>t</i> -BuOOH	NADH	NADH+ EDTA-Fe(III)
0	31,1	9,83	3,03	18,8
50	1,75 (94)	7,32 (26)	2,20 (27)	18,3 (2,6)
100	1,56 (95)	5,63 (43)	2,00 (34)	17,5 (6,9)

Las condiciones experimentales se describen en Métodos. Tiempo de incubación, 60 min. (con sistema generador de NADPH o mitocondrias) y 15 min. (con sistema *t*-BuOOH). Los datos representan el promedio de determinaciones por duplicado. Entre paréntesis, porcentaje de inhibición de la producción de sustancias TBA-reactivas.

La peroxidación de lípidos microsomal iniciada por NADPH fue fuertemente inhibida por NI pero la peroxidación lipídica dependiente de *t*-BuOOH fue menos afectada. Bajo condiciones experimentales similares, la peroxidación de lípidos mitocondrial iniciada por NADPH fue inhibida en un 27% y en un 34% en presencia de NI 50 y 100 μM , respectivamente, mientras que la peroxidación de lípidos estimulada por EDTA-Fe fue inhibida en grado no significativo.

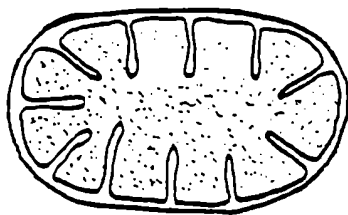
5.6. Conformación mitocondrial.

En las mitocondrias, la mayoría de los procesos metabólicos ocurren en la matriz mitocondrial. Es por ello que existe un flujo activo de metabolitos a través de las membranas mitocondriales externa e interna. La membrana externa es libremente permeable. En cambio, la membrana interna es bastante impermeable. En consecuencia, el pasaje de los iones y metabolitos a través de dicha membrana requiere transportadores específicos (para ATP o ADP, fosfato, succinato o malato, isocitrato, glutamato, aspartato, bicarbonato y Ca^{2+}) y genera alteraciones en el volumen mitocondrial, debidas a la entrada o salida de agua.

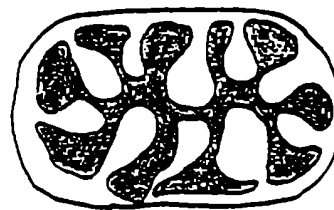
En las mitocondrias aisladas se han observado ciclos de contracción asociados con la fosforilación oxidativa. Se han descrito dos estados conformacionales de las

mitocondrias (Hackenbrock, 1967 y 1968; Harris y col., 1968; Knoll y Brdiczka, 1980; De Robertis y De Robertis, 1984):

- estado conformacional ortodoxo: es aquel en el que la matriz mitocondrial ocupa prácticamente todo el compartimiento interno mitocondrial y tiene un aspecto granular o reticular, la membrana interna presenta las características crestas, el espacio entre las membranas es mínimo (Figura 5.6). Este estado se observa a bajas concentraciones de ADP y cuando la mitocondria no fosforila;



Ortodoxo



Condensado

FIGURA 5.6. Esquema de los estados conformacionales de las mitocondrias.

- estado conformacional condensado: es aquel en el que la matriz mitocondrial se

condensa y aproximadamente el 50% del agua difunde hacia el espacio intermembrana (Figura 5.6). El plegamiento de la membrana interna se realiza al azar. Las crestas mitocondriales están dilatadas, como si formaran lagunas y la matriz mitocondrial, ahora más homogénea, representa sólo cerca del 50% del volumen mitocondrial. Además, es posible encontrar en ciertos puntos la existencia de uniones de contacto entre las membranas interna y externa de la mitocondria. Estando en este estado conformacional, las mitocondrias son capaces de fosforilar.

Se estudió el efecto del NI sobre la conformación mitocondrial. La Figura 5.7 muestra las fotografías, obtenidas por microscopía electrónica, de las mitocondrias incubadas en presencia de NI 200 μM . Como control de este experimento se utilizaron mitocondrias incubadas con DMFA (solvente del NI). La tinción de las mitocondrias con tetróxido de osmio (osmiofilia) mostró que la mayoría de las mitocondrias control se encontraba en el estado conformacional condensado (66,88%) y, el 33,11% restante, correspondía a las mitocondrias en estado conformacional ortodoxo (Figura 5.7 A y Tabla 5.11). El agregado de NI (concentración 200 μM) a la mezcla de incubación de las mitocondrias produjo el pasaje de las mismas, del estado conformacional condensado al ortodoxo. En estas condiciones experimentales (NI 200 μM), sólo el 38,26% de las mitocondrias se hallaban en estado condensado. En consecuencia, el 61,74% del total se encontraba en estado ortodoxo o no fosforilante (Figura 5.7 B y Tabla 5.11).

Por otra parte, se sabe que las sales de uranilo, especialmente el acetato de uranilo, son ampliamente usadas como "coloraciones electrónicas". Los iones uracilo forman complejos con una amplia variedad de sustancias y grupos funcionales como hidroxilos, carboxilos y fosfatos de las macromoléculas. En los especímenes biológicos, los grupos amino primarios participan en la fijación de los iones uranilo, al igual que el ATP, con quien estos iones reaccionan especialmente. La interacción de los iones uranilo con los grupos fosfato de los cinco fosfonucleótidos induce la formación de un producto de reacción altamente electrón denso. La reacción uran-afín es intensamente positiva en la matriz mitocondrial (Carlos Iraldi, en preparación para su publicación). La presencia de ATP en la matriz mitocondrial, como resultado de la actividad de la ATP sintasa localizada en la membrana interna de la mitocondria sugiere que la densidad electrónica determinada por la reacción uran-afín se deba a la presencia de nucleótidos de adenina en la mitocondria.

La Figura 5.8 muestra las fotomicrografías electrónicas de las mitocondrias teñidas con acetato de uranilo. La reacción uran-afín fue positiva en el 93,5% de las mitocondrias control, coincidiendo con el estado conformacional condensado en el que las mitocondrias fosforilan.

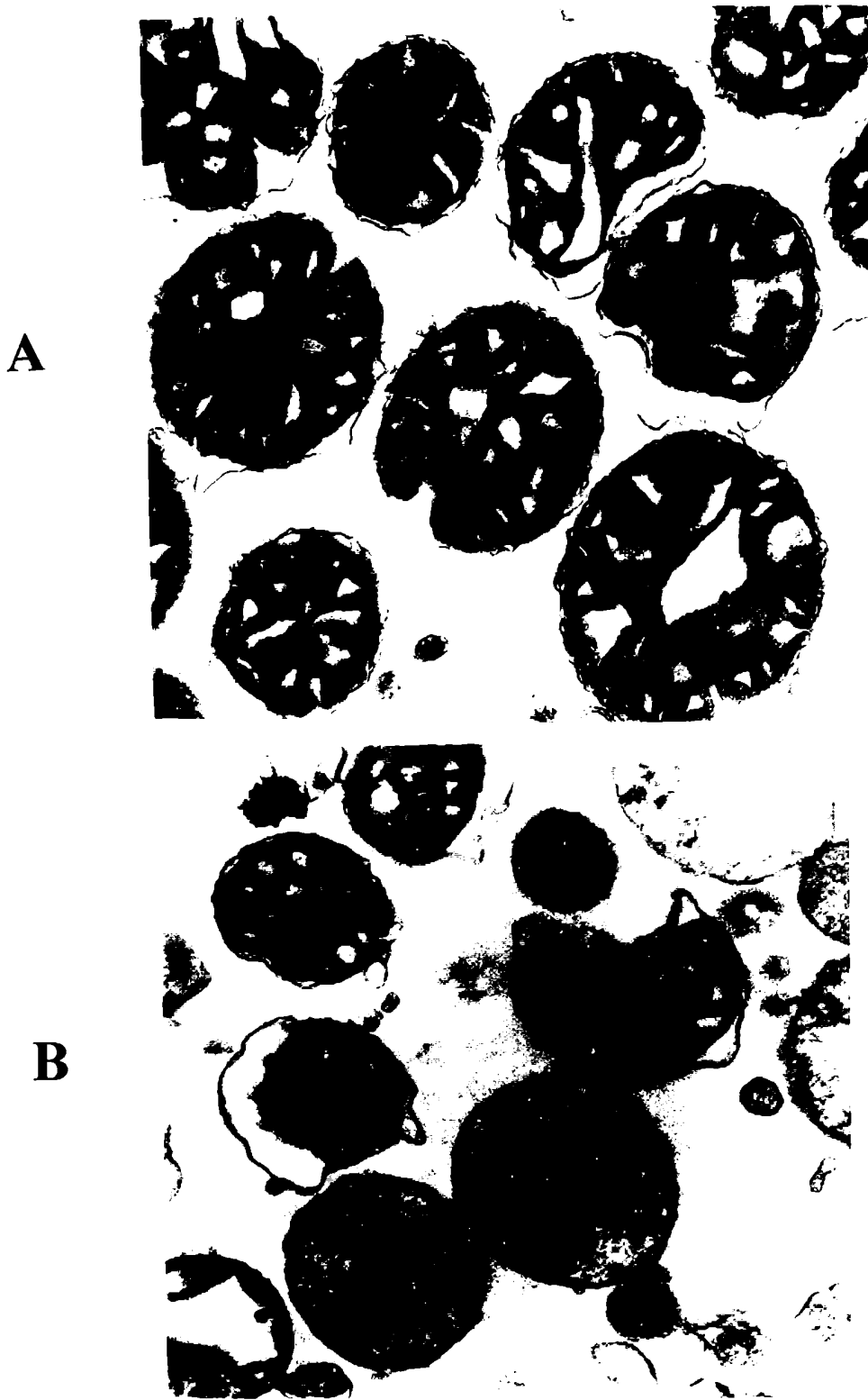
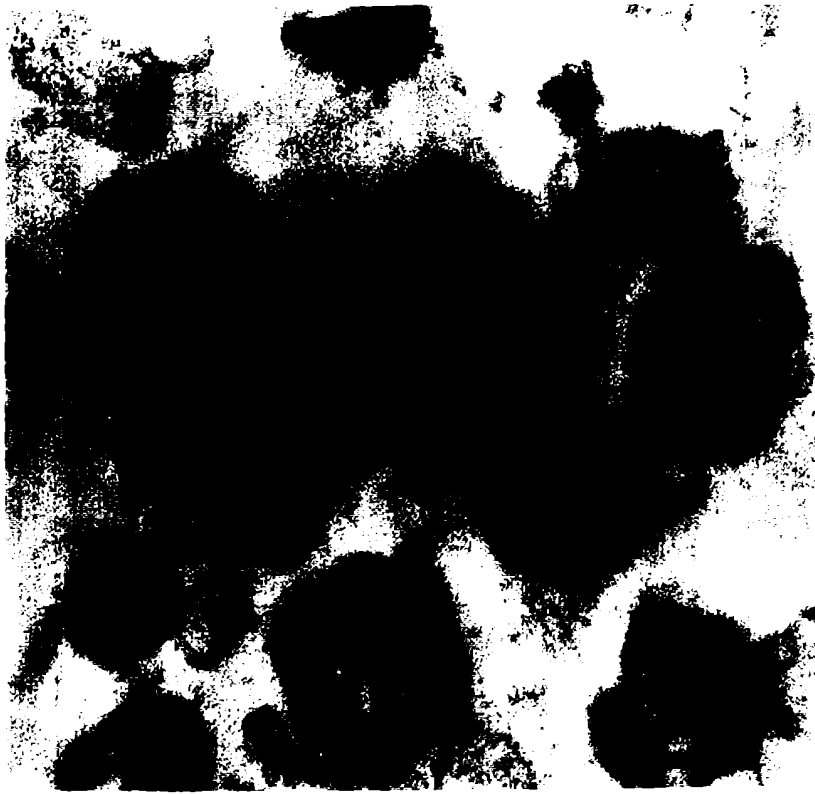


FIGURA 5.7. Efecto del NI sobre la conformación mitocondrial. Osmiofilia. Las mitocondrias fueron incubadas, fijadas con glutaraldehído y refijadas con O_4Os como se indica en Métodos. A: mitocondrias control (NI 0 μM); B: mitocondrias incubadas con NI 200 μM . Aumento: 66300 X.

A



B

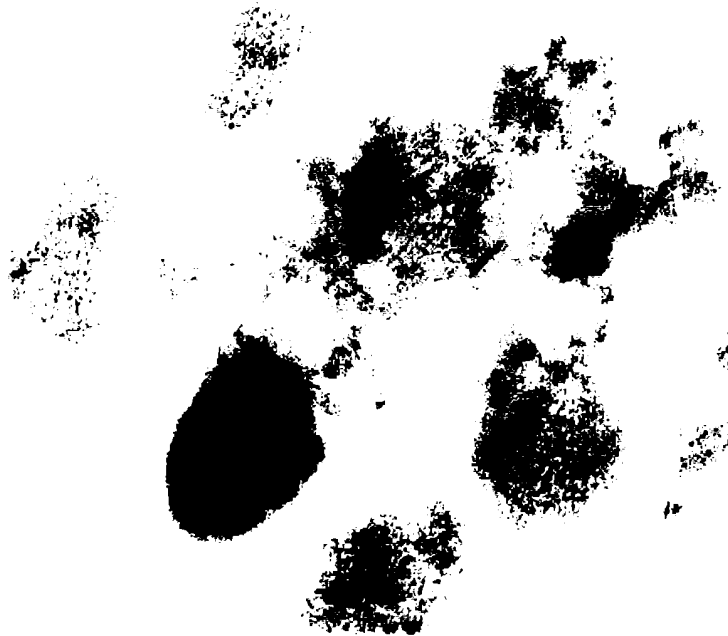


FIGURA 5.8. Efecto del NI sobre la conformación mitocondrial. Reacción uran-afin. Las mitocondrias fueron incubadas, fijadas con glutaraldehído y coloreadas con acetato de uranilo como se indica en Métodos. A: mitocondrias control (NI 0 μ M); B: mitocondrias incubadas con NI 200 μ M. Aumento: 66300 X.

TABLA 5.11. Efecto del NI sobre el estado conformacional de las mitocondrias.

Tratamiento	NI (μM)	Recuento mitocondrial (%)	
		Estado condensado	Estado ortodoxo
Osmiofilia	0	66,88	33,11
	200	38,26	61,74
Reacción uran-afín	0	93,50	6,50
	200	2,47	97,53

La suspensión mitocondrial (2,28 mg de proteína mitocondrial/ml) fue incubada a 37°C durante 60 min y luego procesada tal como se describe en Métodos. Los valores de recuento mitocondrial corresponden al porcentaje de mitocondrias en un determinado estado conformacional respecto del total de mitocondrias presente en el campo del microscopio. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos.

5.7. Discusión.

Las observaciones descritas en el presente estudio indican que, además de su acción mutagénica (Chiu y col., 1978; Vance y Levin, 1984; Vance y col., 1986; Klopman y Rosenkranz, 1991), el NI puede producir alteraciones metabólicas en hepatocitos, especialmente en las mitocondrias, como fue ilustrado por la modificación de la carga energética de adenilatos (Tablas 5.1 y 5.2).

La carga energética de adenilatos tiene una función esencial en la homeostasis intracelular (Jones y col., 1992; Brand y col., 1993) y sus variaciones pueden ser analizadas empleando la relación de Atkinson (1968) o la relación ATP/ADP (Tabla 5.2). Se ha establecido que, para las reacciones que participan en secuencias que utilizan ATP, los gráficos de actividad enzimática en función de la carga energética tienen pendientes positivas que aumentan con la carga (Klungsoyr y col., 1968). Por otra parte, para las reacciones que participan en secuencias que regeneran ATP, dichos gráficos poseen pendientes negativas que aumentan en valor absoluto con la carga (Shen y col., 1968). Empleando enzimas de *Escherichia coli*, la variación de los valores de carga en el rango 0,7-1,0 produjeron la máxima variación de la actividad enzimática (Klungsoyr y col., 1968; Shen y col., 1968). Las variaciones de carga energética producidas por NI (Tabla 5.2) concuerdan con:

a) aquellas que afectan enzimas regulatorias (Klungsoyr y col., 1968; Shen y col.,

1968) y

b) aquellas producidas por inhibidores específicos de la glicólisis o de la fosforilación oxidativa (Redegeld y col., 1992; Jones y col., 1992; Brand y col., 1993). Es muy interesante que el nitrofurano antichagásico NFX haya sido un modificador de la carga energética de adenilatos mucho menos efectivo que el NI (Tabla 5.2), a pesar de su capacidad para generar un ciclo redox y producir oxi-radicales en preparaciones hepáticas (Docampo y col., 1981b).

La depleción de ATP, la peroxidación de lípidos y la pérdida de viabilidad son fenómenos fuertemente relacionados en hepatocitos (Thompson y Moldéus, 1988; Redegeld y col., 1992). En lo que respecta al ATP, es sabido que la depleción de ATP puede causar efectos deletéreos sobre algunas actividades celulares, como el mantenimiento del citoesqueleto (Thompson y Moldéus, 1988). El hecho de que el NI inhibió la peroxidación lipídica (Figura 5.4 y Tabla 5.10) indica que no se le podría asignar una función significativa a los productos de la peroxidación de lípidos como intermediarios de la acción del NI. La liberación de actividad LDH al medio extracelular de los hepatocitos tratados con NI, la cual indica la pérdida de viabilidad celular, se correlacionó con la caída de ATP citosólico (Thompson y Moldéus, 1988; Redegeld y col., 1992). El NI incrementó la salida de LDH al medio extracelular, especialmente con NI 50 y 100 μM después de cuatro horas de incubación (Tabla 5.3). La baja correlación hallada entre la disminución de la carga energética y la viabilidad

celular durante las dos primeras horas de incubación (Tablas 5.2 y 5.3) puede ser explicada asumiendo que el NI afectó la producción intramitocondrial de ATP. Este ATP mitocondrial sería menos efectivo que su contraparte citosólica en controlar la estabilidad de la membrana plasmática (Redegeld y col., 1992).

Los diferentes resultados obtenidos con NI y nifurtimox demuestran que la producción de radicales del oxígeno por el ciclo redox del nifurtimox no afectaría la fosforilación oxidativa en hepatocitos. En este sentido, se debe notar que el nifurtimox fue usado a una concentración mucho mayor que la existente en la sangre de pacientes tratados con nifurtimox. La relativa insensibilidad de los parámetros evaluados hacia este derivado nitrofurano puede ser explicada por la existencia, en hepatocitos, de mecanismos protectores contra los oxi-radicales (Dubin y col., 1983 y 1984).

La inhibición de la transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa puede contribuir a la acción tóxica del NI en hepatocitos. Esta inhibición no ha sido descrita anteriormente y, además, resulta interesante resumir sus características principales. Así:

- a) NI inhibió la transferencia de electrones al Sitio I, como se mostró por el efecto de los sustratos en la Tabla 5.5;
- b) la inhibición de la transferencia de electrones también ocurrió con membranas mitocondriales rotas (Tabla 5.6), lo que indicó una acción directa sobre el mecanismo del transporte de electrones, probablemente a nivel de la flavoproteína NADH-deshidrogenasa;

- c) a concentraciones equivalentes de NI, la inhibición del transporte de electrones en membranas mitocondriales rotas fue menor que con mitocondrias intactas (Tablas 5.5 y 5.6). Esto sugiere una menor contribución de la inhibición de la transferencia de electrones a la acción del NI sobre la mitocondria;
- d) la concentración de NI necesaria para inhibir el 50% de la actividad mitocondrial en mitocondrias intactas fue aproximadamente 100 μ M (Tabla 5.5). Esto significa que el NI fue un inhibidor mucho más débil que la rotenona, piercidina y esteroides (Boveris y Stoppani, 1970);
- e) a diferencia de los compuestos nitrofuranos, NI no estuvo involucrado en reacciones de ciclo redox a nivel del Sitio I, probablemente debido a diferencias en las estructuras moleculares (Tabla 5.7);
- f) la inhibición de la transferencia de electrones y energía al Sitio I previno la energización del consumo de Ca^{2+} por la mitocondria y, consecuentemente, el swelling (Figura 5.2 y Tabla 5.9);
- g) al igual que los típicos desacoplantes de la fosforilación oxidativa (Chance y Hollunger, 1963), el NI liberó la respiración controlada por sustratos, cambió el estado redox de los citocromos reducidos (Figura 5.1), liberó la actividad ATPasa latente (Tabla 5.8) y previno la entrada de K^+ dependiente de valinomicina (Figura 5.3) como otros inhibidores de la transferencia de electrones al Sitio I, por ejemplo, la androsterona (Boveris y Stoppani, 1971);

h) los estudios realizados sobre la morfología mitocondrial revelaron que el NI produjo el pasaje de las mitocondrias del estado conformacional condensado (fosforilante) al ortodoxo (no fosforilante) (Figuras 5.7 y 5.8), concordando con los resultados de los estudios bioquímicos mencionados anteriormente.

En conjunto, los efectos del NI consisten en una acción compleja sobre los mecanismos conservadores de energía en mitocondrias, incluyendo inhibición del transporte de electrones y desacople de la fosforilación oxidativa. Los efectos del NI sobre la mitocondria se correlacionan con la acción del NI en hepatocitos, especialmente sobre la carga energética.

Finalmente, la inhibición de Ca^{2+} por el NI requiere un comentario especial. El mantenimiento de una baja concentración de Ca^{2+} citosólico libre es un rasgo común a las células eucarióticas (Pietrobon y col., 1990). Existen varios mecanismos que aseguran la regulación de los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma y su acumulación dentro de las organelas. El transporte de Ca^{2+} mitocondrial tiene una función esencial en el metabolismo de dicha organela celular y, además, la prevención de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria causada por el NI podría contribuir a su toxicidad en hepatocitos.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo de Tesis se realizó el estudio de:

1) el metabolismo microsomal hepático del nitrofurano antichagásico nifurtimox (NFX);
2) el mecanismo de acción del 5'-nitroindol (NI), nitrocompuesto utilizado como modelo experimental, en microsomas, mitocondrias y hepatocitos de rata, con el objeto de contribuir al esclarecimiento de los procesos bioquímicos involucrados en el mecanismo de acción de los nitroderivados en hígado de rata.

1) Los estudios realizados acerca del metabolismo del NFX en microsomas de hígado de rata demuestran que:

- a) el NFX es reducido por los microsomas hepáticos;
- b) la velocidad de reacción es dependiente de la concentración de oxígeno en el medio;
- c) esta reacción es específica para NADPH como dador de equivalentes de reducción;
- d) como resultado de la reducción del NFX se forman productos no reoxidables;
- e) la velocidad de reducción del NFX fue proporcional a la actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa microsomal hallada en las distintas preparaciones microsomales estudiadas (Co-proto, CoCl_2 , Metimazol y Control), tanto en condiciones aeróbicas como en anaerobiosis;
- f) la cinética de la reducción del NFX sigue un modelo cinético complejo, sugiriendo la presencia de cooperatividad positiva y negativa, dependiendo de la concentración de sustrato presente en el medio de reacción;
- g) el monóxido de carbono no ejerce un efecto inhibitorio sobre la reducción del NFX;

h) el clotrimazol, conocido inhibidor del citocromo P-450, no modificó la velocidad de reducción del NFX;

i) el AADP, inhibidor competitivo de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa inhibió la actividad nitro-reductasa de los microsomas hepáticos, utilizando como sustrato al NFX.

Estos datos evidencian la participación de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa en el metabolismo microsomal hepático del NFX. El citocromo P-450 no estaría involucrado en este proceso.

El análisis espectrofotométrico y por cromatografía en placa delgada y HPLC de los productos de la reducción del NFX permitió evidenciar la formación de varios metabolitos derivados del nitrofurano, aún no identificados por los métodos utilizados, sugiriéndose la formación del derivado amina correspondiente al NFX.

2) Se estudió el mecanismo de acción del 5'-nitroindol (NI) en microsomas, mitocondrias y hepatocitos aislados de rata. Los resultados presentados en este estudio demuestran que este nitrocompuesto:

a) causó la muerte celular en una forma dependiente de la concentración de droga y del tiempo de incubación;

b) provocó la caída del contenido intracelular de ATP y el aumento de los niveles de AMP, sin variación en el ADP. Como consecuencia de estas variaciones, disminuyó la carga energética de adenilatos y la relación ATP/ADP;

- c) produjo el desacople de la fosforilación oxidativa mitocondrial;
- d) estimuló la actividad F_1F_0 -ATPasa mitocondrial;
- e) inhibió el transporte de Ca^{2+} y K^+ a la mitocondria;
- f) produjo el pasaje de las mitocondrias del estado conformacional condensado (fosforilante) al ortodoxo (no fosforilante) y la negativización de la reacción uran-afín, reflejo de la presencia de ATP;
- g) inhibió la peroxidación lipídica tanto en microsomas y mitocondrias como en hepatocito aislado;

Estos resultados sugieren que el NI ejerce su acción citotóxica sobre los mecanismos conservadores de energía en las mitocondrias, a través de la inhibición de la transferencia de electrones y el desacople de la fosforilación oxidativa.

Teniendo en cuenta que los nitrofuranos se utilizan en medicina humana como antimicrobianos, antiparasitarios y agentes radiosensibilizantes, la extensión de los resultados obtenidos en este trabajo podría contribuir a dilucidar los mecanismos de acción de los nitroderivados, para poder crear mejores fármacos, más efectivos en su acción y menos tóxicos para el huésped.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams GE y Stratford IJ (1986) *Biochem. Pharmacol.* **35**: 71-76.
- Alejandre-Duran E, Claramunt RN, Sanz D, Vilaplana MJ, Molina P y Pueyo C (1988) *Mutat. Res.* **206**: 193-198.
- Ames JR, Ryan MD y Kovacic P (1986) *Free Radical. Biol. Med.* **2**: 377-391.
- Atkinson DE (1968) *Biochemistry* **7**: 4030-4034.
- Aust SD y Svingen BA (1982) en: "*Free Radicals in Biology*", Vol. 5, (Pryor WA, ed.), Academic Press. Orlando, Florida, USA, págs. 1-28.
- Bernacchi AS, Castro CR de, Toranzo EGD de y Castro JA (1986) *Exp. Mol. Pathol.* **45**: 245.
- Beuding E y Jolliffe N (1946) *J. Pharmac. exp. Ther.* **88**: 300-310.
- Biaglow JE, Varnes ME, Roizen-Towle L, Clark EP, Epp ER, Astor MB y Hall EJ (1986) *Biochem. Pharmacol.* **35**: 77-90.
- Biasi F, Albano E, Chiarpotto E, Corongiu RP, Pronzato MA, Marinari UM, Parola M, Dianzani MU y Poli G (1991) *Cell Biochem. Funct.* **9**: 111-118.
- Black S, French J, Williams L y Coon M (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**: 1528-1535.
- Bock M, Gonnert R y Haberkorn A (1969) *Bol. Chil. Par.* **24**: 13-17.
- Bock M, Haberkorn A, Herlinger H, Mayer KH y Peterson S (1972) *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* **22**: 1564-1569.
- Bors W, Michel C y Saran M (1979) *Eur. J. Biochem.* **95**: 621-626.
- Boveris A y Stoppani AOM (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* **141**: 641-655.
- Boveris A y Stoppani AOM (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **142**: 150-156.
- Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JP y Stoppani AOM (1980) *Biochem. J.* **188**: 643-648.
- Boyd MR, Stiko AW y Sasame HA (1979) *Biochem. Pharmacol.* **28**: 601-606.
- Brand MD, Harper M-E y Taylor HC (1993) *Biochem. J.* **291**: 739-748.
- Brener Z (1975) *Adv. Pharmacol. Ther.* **13**: 1-7.
- Brener Z (1979) *Pharmac. Therap.* **7**: 71-90.
- Brunori M y Rotilio G (1984) *Methods Enzymol.* **105**: 22-35.
- Bucher JR, Tien M y Aust SD (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**: 777-784.
- Buege JA y Aust SD (1978) *Methods Enzymol.* **52**: 302-310.
- Burchko GW y Weinfeld M (1993) *Biochemistry* **32**: 2186-2193.

- Burke MD (1981) *Biochem. Pharmacol.* **30**: 181-187.
- Buzard JA y Kopko F (1963) *J. Biol. Chem.* **238**: 464-468.
- Cadenas E, Boveris A, Ian Ragan C y Stoppani AOM (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **180**: 248-257.
- Cadenas E (1985) en: "*Oxidative Stress*" (Sies H, ed.), Academic Press, New York, págs. 311-330.
- Cançado R y Brener Z (1979) en: "*Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*": *Terapêutica*, (Brener Z y Andrade Z, eds.), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Cannata JJB, Frasch AAC, Cataldi de Flombaum MA, Segura EL y Cazzulo JJ (1979) *Biochem. J.* **184**: 409-419.
- Carini R, Parola M, Dianzani MU y Albano E (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **297**: 110-118.
- Carlberg I y Mannervick B (1982) en: "*Flavins and Flavoproteins*" (Massey U, Williams CH Jr., eds.), Elsevier, North Holland, New York, págs. 53-56.
- Carnieri EGS, Moreno SNJ y Docampo R (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 79-86.
- Castro CR de, Toranzo EGD de, Bernacchi AS y Castro JA (1986) *Proceedings XI Congress of the Latin American Society of Pharmacology*, pág. 223.
- Castro JA y Díaz de Toranzo EG (1988) *Biomed. Environm. Sci.* **1**: 19-33.
- Chance B (1957) *Methods Enzymol.* **4**: 273-329.
- Chance B y Hollunger G (1963) *J. Biol. Chem.* **238**: 418-431.
- Chance B, Sies H y Boveris A (1979) *Physiol. Rev.* **59**: 527-605.
- Chetty KN, Drummond L, Suba Rao D y Desai D (1979) *Drug Chem. Toxicol.* **2**: 375-382.
- Chiu CW, Lee LH, Wang CY y Bryan GT (1978) *Mutat. Res.* **58**: 11-22.
- Christophersen BO (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **164**: 35-40.
- Clarke ED, Wardman P y Goulding KH (1980) *Biochem. Pharmacol.* **29**: 2684-2689.
- Clarke ED, Goulding KH y Wardman P (1982) *Biochem. Pharmacol.* **31**: 3237-3241.
- Coon MJ, Ballou DP, Haugen DA, Krezoski SO, Nordblom GD y White RE (1977) en: "*Microsomes and Drug Oxidations*", (Ullrich V, Hildebrandt A, Roots I, Estabrook RW y Cooney AH, eds.), Pergamon Press, New York, pág. 82.
- Coon MJ y Koop DR (1983) *Enzymes* **56**: 645-651.
- Coon MJ y Vaz ADN (1987) *J. Biosci. (India)* **11**: 35-39.
- Cooper DS, Kieffer JD, Saxe V, Mover H, Maloof F y Ridway EC (1984) *Endocrinology* **114**: 786-793.

- de Castro SL (1993) *Acta Tropica* **53**: 83-98.
- Del Maestro RF (1980) *Acta Physiol. Scand.* **492**: 153-168.
- De Robertis EDP y De Robertis EMF (1984) en: "*Biología Celular y Molecular*", 10° edición, Librería "El Ateneo" Editorial, Buenos Aires, págs. 257-259.
- Docampo R, Boiso JF, Boveris A y Stoppani AOM (1976) *Experientia* **32**: 972-975.
- Docampo R y Stoppani AOM (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **197**: 317-321.
- Docampo R y Stoppani AOM (1980) *Medicina (Buenos Aires)* **40**: 10-16.
- Docampo R, Mason RP, Mottley C y Muñiz RPA (1981a) *J. Biol. Chem.* **256**: 10930-10933.
- Docampo R, Moreno SNJ y Stoppani (1981b) *Arch. Biochem. Biophys.* **207**: 316-324.
- Docampo R, Moreno SNJ, Stoppani AOM, León W, Cruz FS, Villalta F y Muñiz RPA (1981c) *Biochem. Pharmacol.* **30**: 1947-1951.
- Docampo R, Dubin M, Martino EE, Moreno SNJ y Stoppani AOM (1983) *Medicina (Buenos Aires)* **43**: 33-40.
- Docampo R (1990) *Chem.-Biol. Interact.* **73**: 1-27.
- Drummond GS y Kappas A (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 2384-2388.
- Dubin M y Stoppani AOM (1982) *Medicina (Buenos Aires)* **42**: 643-649.
- Dubin M, Moreno SNJ, Martino EE, Docampo R y Stoppani AOM (1983) *Biochem. Pharmacol.* **32**: 483-487.
- Dubin M, Gojman SG y Stoppani (1984) *Biochem. Pharmacol.* **33**: 3419-3423.
- Dubin M, Grinblat L, Fernández Villamil SH y Stoppani AOM (1987) *FEBS Lett.* **220**: 197-200.
- Dubin M, Fernández Villamil SH y Stoppani AOM (1990a) *Biochem. Pharmacol.* **39**: 1151-1160.
- Dubin M, Grinblat L y Stoppani AOM (1990b) en: "*Enfermedades Digestivas*", (Villardell F y col., eds.), Jarpyo Editores S.A., Madrid, Barcelona, págs. 1763-1769.
- Dubin M, Fernández Villamil SH, Paulino de Blumenfeld M y Stoppani AOM (1991) *Free Rad. Res. Comms.* **14**: 419-431.
- Duhm B, Maul W, Medenwald H, Patzsche K y Wegner LA (1972) *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* **22**: 1617-1625.
- Ebel RE (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **211**: 227-233.
- Ernster L, Lind C, Nordenbrand K, Thor H y Orrenius S (1982) en: "*Oxygenases and Oxygen Metabolism*", (Nozaki M, Yamamoto S, Ishimura Y, Coon M, Ernster L y Estabrook R. eds.), Academic Press, Orlando FL, págs. 357-369.
- Ernster L (1986) *Chemica Scripta* **26**: 525-534.

- Fehér J, Csomós G y Vereckei A (1987) en: "*Free Radical Reactions in Medicine*", Springer-Verlag, Heidelberg, Berlín. págs. 11-17.
- Feller DR, Morita M y Gillette JR (1971a) *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **137**: 433-437.
- Feller DR, Morita M y Gillette JR (1971b) *Biochem. Pharmacol.* **20**: 203-215.
- Fernández Villamil SH (1990) "*Interacción de tripanocidas nitroheterocíclicos y naftoquinonas sobre sistemas de transporte de electrones microsomales y extramicrosomales*". Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
- Fernández Villamil SH, Dubin M, Brusa MA, Durán RP, Perissinotti LJ y Stoppani AOM (1990a) *Free Rad. Res. Comms.* **10**: 351-360.
- Fernández Villamil SH, Dubin M, Galeffi C y Stoppani AOM (1990b) *Biochem. Pharmacol.* **40**: 2343-2351.
- Fiske CH y Subbarow Y (1925) *J. Biol. Chem.* **66**: 375-400.
- Fitzsimmons SA, Lewis AD, Riley RJ y Workman P (1994) *Carcinogenesis* **15**: 1503-1510.
- Foote CS (1982) en: "*Pathology of Oxygen*", (Foote CS, ed.), Academic Press, New York, págs. 21-44.
- Fridovich I (1974) *Adv. Enzymol.* **41**: 35-97.
- Fridovich I (1975) *Annu. Rev. Biochem.* **44**: 147-159.
- Fridovich I (1983) *Annu. Rev. Pharmac. Toxicol.* **23**: 239-257.
- Frimer AA (1982) en: "*Superoxide Dismutase*", (Oberly LW, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, vol. 2, págs. 83-125.
- Fukuzaka K, Takase S y Tsukatani H (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **240**: 117-120.
- Gillette JR, Kamm JJ y Sasame HA (1968) *Molec. Pharmacol.* **4**: 541-546.
- Gillette JR (1971) en: "*Handbook of Experimental Pharmacology*", (Eichler O, Farah A, Herken H y Welch AO, eds.), Vol 28, págs. 349-361, Springer-Verlag, Berlín.
- Girotti AW (1985) *J. Free Rad. Biol. Med.* **1**: 87-95.
- Goijsman SG, Frasch ACC y Stoppani AOM (1985) *Biochem. Pharmacol.* **34**: 1457-1461.
- Goijsman SG y Stoppani AOM (1985a) *Biochem. Pharmacol.* **34**: 1331-1336.
- Goldstein JA y Faletto MB (1993) *Environm. Health Perspect.* **100**: 169-176.
- Gorla NB y Castro JA (1985) *Toxicol. Lett.* **25**: 259-265.
- Gornall AG, Bardawill CJ y David MM (1949) *J. Biol. Chem.* **177**: 751-766.
- Gram TE y Gillette JR (1971) en: "*Fundamentals of Biochemical Pharmacology*" (Baeq ZM, Capek R, Paoletti R y

- Renson J, eds.), Pergamon Press, Oxford, pág. 571.
- Grinblat L, Sreider CM y Stoppani AOM (1988) *Medicina (Buenos Aires)* **48**: 492-498.
- Grinblat L, Sreider CM y Stoppani AOM (1989) *Biochem. Pharmacol.* **38**: 767-772.
- Grunberg E y Titsworth EH (1973) *Ann. Rev. Microbiol.* **27**: 317-346.
- Guengerich FP y Mc Donald TL (1984) *Acc. Chem. Res.* **17**: 9-12.
- Guengerich FP (1987) en: "*Mammalian Cytochrome P-450*", (Guengerich FP, ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, vol. II, págs. 2-7.
- Gutteridge JM (1992) *Med. Lab. Sci.* **49**: 313-318.
- Gutteridge JMC, Richmond R y Halliwell B (1979) *Biochem. J.* **184**: 469-477.
- Gutteridge WE (1976) *Tropical Diseases Bull.* **73**: 699-704.
- Gutteridge WE (1980) en: "*The Host Invader Interplay*", (Van den Bossche H, ed.), Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Haberkorn A y Gönnert R (1972) *Arzn. Forsch. (Drug Res.)* **22**: 1570-1575.
- Hackenbrock CR (1967) *J. Cell Biol.* **30**: 269-297.
- Hackenbrock CR (1968) *J. Cell Biol.* **37**: 345-369.
- Halliwell B y Gutteridge JMC (1984) *Biochem. J.* **219**: 1-14.
- Halliwell B y Gutteridge JM (1989) en: "*Free Radicals in Biology and Medicine*", 2^a Ed., Clarendon Press, Oxford, págs. 22-179.
- Halliwell B y Gutteridge JM (1990) *Methods Enzymol.* **186**: 1-85.
- Halliwell B, Gutteridge JMC y Cross CE (1992) *J. Lab. Clin. Med.* **119**: 598-620.
- Hammond DJ, Cover B y Gutteridge WE (1984) *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* **78**: 91-99.
- Harada N y Omura T (1980) *J. Biochem (Tokyo)* **87**: 1539-1547.
- Harris y col. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**: 830-836.
- Hewick DS (1982) en: "*Metabolic Basis of Detoxication*" (Jakoby WB, Bend and Caldwell J, eds.), Academic Press, New York, págs. 151-170.
- Hoffman BK (1972) *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* **22**: 1590-1595.
- Högberg J, Orrenius S y Larson R (1975) *Eur. J. Biochem.* **50**: 595-602.
- Holtzman JL, Crankshaw DL, Peterson FJ y Polnaszek CF (1981) *Mol. Pharmacol.* **20**: 669-673.

- Hoogenboom LAP, van Kammen M, Huveneers-Oorsprong MBM y Kuiper HA (1992) *Toxic. in Vitro* **6**: 227-237.
- Hoogenboom LAP, Polman ThHG, Lommen A, Huveneers MBM y van Rhijn (1994) *Xenobiotica* **24**: 713-727.
- Iannone A, Bini A, Swartz HM, Tomasi A y Vannini V (1989) *Biochem. Pharmacol.* **16**: 2581-2586.
- Iba MM y Mannering G (1987) *Biochem. Pharmacol.* **36**: 1447-1455.
- İşcan M (1993) *Comp. Biochem. Physiol.* **106C**: 579-584.
- Iyanagi T y Mason HS (1973) *Biochemistry* **12**: 2297-2308.
- Iyanagi T, Makino R y Anan F (1981) *Biochemistry* **20**: 1722-1730.
- Joenje H (1989) *Mutat. Res.* **219**: 193-197.
- Johnson D y Lardy H (1967) *Methods Enzymol.* **10**: 94-101.
- Jones DP, Shan X y Park Y (1992) *Annu. Rev. Nutr.* **12**: 327-343.
- Jörg ME (1974) en: "*Tripanosomiasis cruzi humana o enfermedad de Chagas-Mazza*", Actualización de tratamientos N° 380, Laboratorios Roche, Buenos Aires, págs. 23-24.
- Joseph P, Jaiswal AK, Stobbe CC y Chapman JD (1994) *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **29**: 311-315.
- Joseph PD y Mason RP (1985) en: "*Bioactivation of Foreign Compounds*", (Anders MW, ed.), Academic Press, New York NY, USA, págs. 451-483.
- Jump D (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 4698-4703.
- Kanofsky JR (1989) *Chem.-Biol. Interact.* **70**: 1-28.
- Kappus H y Sies H (1981) *Experientia* **37**: 1233-1241.
- Kaschnitz RM y Coon MJ (1975) *Biochem. Pharmacol.* **24**: 295-297.
- Kato R, Oshima T y Takanaka A (1969) *Mol. Pharmacol.* **5**: 487-493.
- Kato R, Takahashi A y Oshima T (1970) *Biochem. Pharmacol.* **19**: 45-51.
- Kedderis GL y Miwa GT (1988) *Drug Metab. Rev.* **19**: 33-62.
- Kiese M (1974) en: "*Methemoglobinemia: A Comprehensive Treatise*", CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pág. 240.
- Klopman G y Rosenkranz H (1991) *Environ. Health Perspect.* **96**: 67-75.
- Klungsoyr L, Hagemen JH, Fall L y Atkinson DE (1968) *Biochemistry* **7**: 4035-4040.
- Knoll G y Brdiczka D (1980) *Eur. J. Cell Biol.* **22**: 281-289.

- Koppenol WH y Liebman JF (1984) *J. Phys. Chem.* **88**: 99-105.
- Kriek E y Westra JG (1979) en: "*Chemical Carcinogenesis and DNA*", Vol. 2, (Grover PL, ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, págs. 1-28.
- Kupfer D (1982) en: "*Hepatic Cytochrome P-450 Monooxygenase System*", (Schenkman JB y Kupfer D, eds.), Pergamon Press, Oxford, pág. 157.
- Kurzban G y Strobel H (1986) *J. Biol. Chem.* **261**: 7825-7830.
- Lake BG (1987) en: "*Biochemical Toxicology*", (Snell K y Mullock B, eds.), IRL Press, Oxford, págs. 200-201.
- Laplumé H, Barousse AP y Cabrera H (1982) *Medicina (Buenos Aires)* **42**: 223-228.
- Lehninger AL, Carafoli A y Rossi CL (1967) *Advanc. Enzymol.* **29**: 260-320.
- Lemaire P y Livingstone D (1994) *J. Biochem. Toxicol.* **9**: 87-95.
- Leo MA y Lieber CS (1985) *J. Biol. Chem.* **260**: 5228-5231.
- Leskovac V, Svircevic J, Trivic S, Popovic M y Radulovic M (1989) *Int. J. Biochem.* **21**: 825-834.
- Lu A y Coon M (1968) *J. Biol. Chem.* **243**: 1331-1332.
- Lundin A, Rickardsson A y Thore A (1976) *Anal. Biochem.* **75**: 611-620.
- Lundin A, Hasenson M, Persson J y Pousette Å (1986) *Methods Enzymol.* **133** (part B): 27-42.
- Maines MD y Kappas A (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 4293-4297.
- Maines MD y Kappas A (1975) *J. Biol. Chem.* **250**: 4171-4177.
- Maines MD y Kappas A (1976) *Biochem J.* **154**: 125-132.
- Marr JJ y Docampo R (1986) *Rev. Infect. Dis.* **8**: 884-903.
- Masana M, Toranzo EGD de y Castro JA (1984a) *Biochem. Pharmacol.* **33**: 1041-1045.
- Masana M, Toranzo EGD de y Castro JA (1984b) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **276**: 4-10.
- Mason RP y Holtzman JL (1975) *Biochemistry* **14**: 1626-1632.
- Mason RP y Josephy PD (1985) en: "*Toxicity of Nitroaromatic Compounds*", (Rickert DE, ed.), Hemisphere Publishing Corp., Washington DC, págs. 121-140.
- Masters B (1980) en: "*Enzymatic Basis of Detoxification*" (Jakoby W, ed.), Academic Press, New York, págs. 183-200.
- Mattammal MB, Zenser TV, Palmier MO y Davis BB (1985) *Cancer Res.* **45**: 149-156.
- Mc Calla DR (1983) *Environ. Mutagen.* **5**: 745-750.

- Mc Calla DR (1990) *Drug Metab. Rev.* **22**: 863-869.
- Mc Cord JM y Fridovich I (1969) *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.
- Mester B, Elguero J, Claramunt RM, Castanys S, Mascaró ML, Osuna A, Vilaplana MJ y Molina P (1987) *Arch. Pharm. (Weinheim)* **320**: 115-121.
- Mihara K y Sato R (1978) *Methods Enzymol.* **52**: 102-108.
- Miles PR, Wright JR, Bowman, L y Colby, HD (1980) *Biochem. Pharmacol.* **29**: 565-571.
- Minchin RF, Ho PC y Boyd MR (1986) *Biochem. Pharmacol.* **35**: 575-580.
- Minotti G y Aust SD (1987a) *J. Biol. Chem.* **262**: 1098-1104.
- Minotti G y Aust SD (1987b) *Free Rad. Biol. Med.* **3**: 379-384.
- Misra HP y Fridovich I (1972) *J. Biol. Chem.* **247**: 3170-3175.
- Moldéus P, Högberg J y Orrenius S (1978) *Methods Enzymol.* **53**: 60-71.
- Montilva P, Del Arco A, Usero JL, Izquierdo C y Casado J (1988) *Int. J. Biochem.* **20**: 41-47.
- Moreno SNJ, Palmero DJ, Palmero KE de, Docampo R y Stoppani AOM (1980) *Medicina (Buenos Aires)* **40**: 553-559.
- Moreno SNJ, Docampo R, Mason, RP, León W y Stoppani AOM (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* **218**: 585-591.
- Moreno SNJ, Mason RP y Docampo R (1984a) *J. Biol. Chem.* **259**: 6298-6305.
- Moreno SNJ, Mason RP y Docampo R (1984b) *J. Biol. Chem.* **259**: 8252-8259.
- Muhoberac BB, Hanew T, Halter S y Schenker S (1989) *Biochem. Pharmacol.* **38**: 4103-4113.
- Navarro ML, Dain L, Migliorini AM y Nagel R (1984) *Comun. Biol. (Buenos Aires)* **3**: 15-19.
- Neal RA y Halpert J (1982) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22**: 321-339.
- Nisimoto Y (1986) *J. Biol. Chem.* **261**: 14232-14239.
- Ohkawa H, Ohishi N y Yagi K (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 5629-5633.
- Ojha V y Kohli KK (1994) *Biochem. Mol. Biol. Internatl.* **32**: 55-65.
- Omura T y Sato R (1964) *J. Biol. Chem.* **239**: 2370-2378.
- Ondarza RN y Abney R (1970) *FEBS Lett.* **7**: 227-230.
- Orrenius S, Dallner G y Ernster L (1964) *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **14**: 329-334.
- Packmanian A (1957) *Antibiot. Chemother.* **7**: 13-19.

- Pahn EM de, Molina Portela MP y Stoppani AOM (1988) *Rev. Arg. Microbiol.* **20**: 107-118.
- Pederson TC, Buege JA y Aust SD (1973) *J. Biol. Chem.* **248**: 7134-7141.
- Pederson TC y Aust SD (1974) *Biochem. Pharmacol.* **23**: 2467-2473.
- Pérez-Reyes E, Kalyanaraman, B y Mason RP (1980) *Mol. Pharmacol.* **17**: 239-243.
- Pessayre D, Allemand H, Wandscheer JC, Descatoire V, Artigou JY y Benhamou JP (1979) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **49**: 355-340.
- Peterson FJ, Mason RP, Horsepian J y Holtzman JL (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 4009-4014.
- Pietrobon D, Di Virgilio F y Pozzan T (1990) *Biochem. J.* **193**: 599-622.
- Pinto Dias JC (1984) *Enfermedad de Chagas. Epidemiología Clínica, Terapéutica*. Programa de Salud Humana. Buenos Aires, págs. 1-106.
- Placer ZA, Cushman L y Johnson BC (1966) *Anal. Biochem.* **16**: 359-364.
- Polak A y Richle (1978) *Annu. Trop. Med. Parasitol.* **72**: 45-54.
- Polnaszek CF, Peterson FJ, Holtzman JL y Mason RP (1984) *Chem. Biol. Interact.* **51**: 263-271.
- Porter T y Kasper C (1986) *Biochemistry* **25**: 1682-1687.
- Pressman B (1969) en: "*Mitochondria, structure and function*", (Ernster L y Drahota Z, eds.), Academic Press, London and New York, págs. 315-333.
- Queiroz da Cruz M, Braescher MH, Vargens JR, Oliveira Lima A (1991) *Experientia* **47**: 87-92.
- Rafii F, Franklin W, Heflish RH y Cerniglia CE (1991) *Appl. Env. Microbiol.* **57**: 962-968.
- Ram PA y Waxman DJ (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 19223-19229.
- Ram PA y Waxman DJ (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 3294-3301.
- Rao DNR y Mason RP (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 11731-11736.
- Rao DNR, Jordan S y Mason RP (1988) *Biochem. Pharmacol.* **37**: 2907-2913.
- Redegeld FAM, Moison RMW, Koster AS y Noordhoeck J (1992) *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol. Sec.* **228**: 229-236.
- Reed DJ y Fariss MW (1984) *Pharmacol. Rev.* **36**: 25S.
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW y Potter DW (1980) *Anal. Biochem.* **106**: 55-62.
- Rivlin RS y Langdom RG (1969) *Endocrinology* **84**: 584-590.
- Rogerson TD, Wilkinson CF y Hetnarski K (1977) *Biochem. Pharmacol.* **26**: 1039-1042.

- Rossi L, Moore GA, Orrenius S y O'Brien PJ (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **251**: 25-35.
- Seglen PO (1973) *Exp. Cell Res.* **82**: 391-398.
- Segura EL (1995) citada por Halperín F, *Diario "La Nación"*, Sección 6, 1 de marzo de 1995, págs. 2-3.
- Shen LC, Fall L, Walton GM y Atkinson DE (1968) *Biochemistry* **7**: 4041-4045.
- Shen A, Porter T, Wilson T y Kasper C (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 7584-7589.
- Shen AL, Christensen MJ y Kasper CB (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 19976-19980.
- Sies H, Gerstenecker C, Menzel H y Flohé L (1972) *FEBS Lett.* **27**: 171-176.
- Sies H (1991) en: *"Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants"*, (Sies H, ed.), Academic Press, London, San Diego, págs. XV-XXII.
- Sies H (1993) *Eur. J. Biochem.* **215**: 213-219.
- Simon FR, Sutherland E y Accatino L (1973) en: *"Bile Acid Metabolism in Health and Disease"*, (Paumgartner G y Stiehl A, eds.), MTP Press Ltd., Lancaster, Inglaterra, pág. 133.
- Slater TF (1984) *Biochem. J.* **222**: 1-15.
- Smyth GE y Orsi G (1989) *Biochem. J.* **257**: 859-863.
- Song M-KH, Dozin B, Grieco D, Rall JE y Nikodem VM (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 17970-17974.
- Sorrentino D y Hoener B (1987) *Biochem. Pharmacol.* **36**: 2875-2878.
- Sreider CM, Grinblat, L y Stoppani, AOM (1992) *Biochemistry International* **28**: 323-334.
- Sreider CM (1994) *"Interacción de compuestos nitroheterociclicos con flavoenzimas"*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Stacey NH y Kappus H (1982) *J. Toxicol. Environ. Health* **9**: 277-285.
- Stoppani AOM, Docampo R y Moreno SNJ (1981) *Rev. Asoc. Med. Arg.* **94**: 175-180.
- Storino RA y Milei J (1994) en: *"Enfermedad de Chagas"*, Ed. Doyma Argentina SA, Times Minor de España SA, División Mosby, Buenos Aires.
- Sutter T, Sangard D y Loper J (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 16428-16436.
- Svingen BA, Buege JA, O'Neal FO y Aust SD (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 5892-5899.
- Swaminathan S y Lower G (1978) en: *"Carcinogenesis. Vol. 4, Nitrofurans"* (Bryan GT, ed.) Raven Press, New York, págs. 59-97.
- Tatsumi K, Koga N, Kitamura S, Yoshimura H, Wardman P y Kato Y (1979) *Biochem. Biophys. Acta* **567**: 75-87.

- Tephly TR y Hibbeln P (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**: 589-595.
- Thompson D y Moldéus P (1988) *Biochem. Pharmacol.* **37**: 2201-2207.
- Thor H, Moldéus P, Hermanson R, Högberg J, Reed D y Orrenius S (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* **188**: 122-129.
- Thurman RG, Ley HG y Scholz R (1972) *Eur. J. Biochem.* **25**: 420-430.
- Tsai SC (1987) *Biochem. J.* **242**: 447-452.
- Van den Bossche M (1978) *Nature* **273**: 626-630.
- Van Ommen B, Ploemen JHTM, Ruven HHJ, Vos RME, Bogaards JJP van Berkel WJH y van Bladeren PJ (1989) *Eur. J. Biochem.* **181**: 423-429.
- Van Voorhis WC (1990) *Drugs* **40(2)**: 176-202.
- Vance WA y Levin DE (1984) *Environ. Mutagen.* **6**: 797-811.
- Vance WA, Okamoto HS y Wang YY (1986) *Mutat. Res.* **173**: 169-176.
- Vermilion J, Ballou D, Massey V y Coon M (1981) *J. Biol. Chem.* **256**: 266-267.
- Vroomen LHM, Berghmans MCJ, van Leeuwen P, van der Struijs TDB, de Vries PHU y Kuiper HA (1986) *Food Additives and Contaminants* **3**: 331-346.
- Vroomen LHM, Berghmans MCJ, Hekman P, Hoogenboom LAP y Kuiper HA (1987a) *Xenobiotica* **17**: 1427-1435.
- Vroomen LHM, van Ommen B y van Bladeren PJ (1987b) *Toxic. in Vitro* **1**: 97-104.
- Vroomen LHM, Groten JP, van Muiswinkel K, van Veldhuisen A y van Bladeren PJ (1987c) *Chem.-Biol. Interact.* **64**: 167-169.
- Vroomen LHM, Berghmans MCJ, Groten JP, Koeman JH y van Bladeren PJ (1988) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **95**: 53-60.
- Vroomen LHM, Berghmans MCJ, van Bladeren PJ, Groten JP, Wissinik HCG y Kuiper HA (1990) *Drug Metab. Rev.* **22**: 79-92.
- Wang CY, Behrens BC, Ichikawa M y Bryan GT (1974) *Biochem. Pharmacol.* **23**: 3395-3404.
- Waxman DJ, Morrissey JJ y LeBlanc GA (1989) *Mol. Pharmacol.* **35**: 519-525.
- Weilbel FJ, Leutz JC, Diamond L y Gelboin HV (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **144**: 78-86.
- Weiss RH y Estabrook RW (1986a) *Arch. Biochem. Biophys.* **251**: 336-347.
- Weiss RH y Estabrook RW (1986b) *Arch. Biochem. Biophys.* **251**: 348-360.
- Westfall BB (1946) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **88**: 300-306.

White RE y Coon MJ (1980) *Ann. Rev. Biochem.* **49**: 315-356.

Wilson RL (1978) en: "*Biochemical Mechanism of Liver Injury*", (Slater T, ed.), Academic press, London, New York, San Francisco, págs. 124-224.

Williams CH y Kamin H (1962) *J. Biol. Chem.* **237**: 587-595.

Williams CH Jr. (1976) en: "*The Enzymes*", Vol. XIII, 3° edición, (Boyer P, ed.), Academic Press, New York, San Francisco, Londres, págs. 89-173.

Wolpert MK, Althaus JR y Johns DG (1973) *J. Pharmac. Exp. Ther.* **185**: 202-213.

Wong KH y Agrawal KC (1988) *Biochem. Pharmacol.* **37**: 473-479.

World Health Organization (1981) *Workshop on Guideline for Standardized Protocols for the Chemotherapy of Chagas' Disease* (WHO, Ginebra).

World Health Organization (1986) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **81** (supl): 180-244.

Wroblevski F y LaDue JS (1955) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **90**: 210-213.

Zenser TV, Mattammal MB, Palmier MO y Davis BB (1981) *J. Pharmac. exp. Ther.* **219**: 735-740.

Dra Marta Dubin

Lic Patricia H. Carro

Prof. Dr. Andrés O. M. Stópani
DIRECTOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

Buenos Aires, 20 de diciembre de 1995

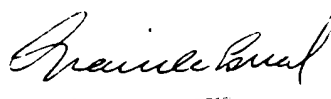
Sres. Miembros de la
Comisión de Doctorado
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
UBA

Tengo el agrado de dirigirme a ustedes con referencia a la presentación de la Tesis: *Ciclo de vida y distribución espacial de Gondogeneia antarctica Chevreux (Crustacea, Amphipoda)*, realizada por el Lic. Fernando Roberto Momo bajo mi dirección y la del Dr. Jean Claude Brethes, de la Universidad de Rimousky, Quebec, Canadá.

Deseo expresar mi entera satisfacción por el desempeño del tesista y por los resultados obtenidos. Este trabajo representa una importante y original contribución al conocimiento de la ecología de este anfípodo clave en la red trófica del bentos antártico. Se trata de la primer descripción completa del ciclo de vida y la dinámica poblacional de Gondogeneia antarctica y sus relaciones con la oferta de alimento y las perturbaciones del ambiente. El marco teórico en que se desarrolla el trabajo es novedoso por la aplicación que se hace de los conceptos de la ecología teórica.

Considero, en suma, que esta tesis constituye un valioso aporte al conocimiento del ecosistema antártico.

Sin otro particular, los saluda muy atentamente



Dra. Graciela B. Esnal