

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIA Y TECNOLOGIA, MENCIÓN QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS
LATERALES TOXICOS DE
FARMACOS ANTICHAGASICOS EN
TEJIDO MAMARIO DE RATA**

Laura C. Bartel
2009

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTIN
INSTITUTO DE INVESTIGACION E
INGENIERIA AMBIENTAL



UNSAM

RESUMEN

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo estudiar los posibles efectos laterales tóxicos de dos fármacos nitroheterocíclicos, nifurtimox (NFX) y benznidazol (BZ), utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, en el tejido mamario de ratas Sprague-Dawley.

La toxicidad y efectos laterales que se observan con el uso de estas drogas están asociados con su nitrorreducción a metabolitos reactivos.

Los resultados obtenidos indican que ambas drogas tienen la capacidad de llegar al tejido mamario luego de su administración intragástrica. Además, se estudió la potencial bioactivación de los mismos en diferentes fracciones celulares del tejido.

Se comprobó que la xantino-oxidoreductasa (XO) es la enzima involucrada en la metabolización del NFX en la fracción citosólica, a raíz de los resultados obtenidos con la enzima pura y con alopurinol, un inhibidor específico de la misma. En cambio, no fue posible detectar la nitrorreducción citosólica ni por XO pura del BZ, en condiciones iguales.

La fracción microsomal nitrorredujo al NFX pero no al BZ en presencia de NADPH. El proceso fue inhibido por CO y parcialmente por DPI, indicando que el citocromo P450 y de la citocromo P450 reductasa estarían involucrados en la metabolización.

La administración intragástrica de NFX arrojó los siguientes resultados: disminución significativa de los niveles de sulfhidrilos proteicos luego de 1 y 3 h; mantenimiento de los niveles de carbonilos proteicos sin aumento en todos los tiempos analizados (1, 3, 6 y 24 h); aumento significativo de la quimioluminiscencia inducida por t-butilhidroperóxido luego de 6 h y de los niveles de lipohidroperóxidos a 3 y 6 h; cambios ultraestructurales relevantes respecto a los controles respectivos.

Además, se evaluó la nitrorreducción de otros compuestos nitroheterocíclicos ampliamente utilizados en medicina veterinaria y humana, algunos de los cuales tienen actividad genotóxica. Estos nitroheterociclos son nitrofurazona, nitrofurantoína, furazolidona y metronidazol y su metabolización está relacionada con su nitrorreducción y la generación de metabolitos reactivos, al igual que los fármacos antichagásicos.

Se describe la metabolización de estas drogas en las mismas fracciones celulares de tejido mamario descritas anteriormente y con XO pura, comparándola con la de los antichagásicos.

Se observó que todos los nitrofuranos fueron nitrorreducidos por la fracción citosólica y por XO, en presencia de hipoxantina. Además, fueron nitrorreducidos por la fracción microsomal en presencia de NADPH, excepto por la nitrofurazona. En general, los valores obtenidos indican que todos fueron más metabolizados que el NFX.

No se observó nitrorreducción de ninguno de los dos nitroimidazoles evaluados tanto con ambas fracciones celulares como con XO.

Considerando los efectos observados del NFX y, a pesar de que su nitrorreducción fue menos intensa respecto a los demás nitrofuranos, se podría relacionar su nitrorreducción y posterior bioactivación con lo observado anteriormente por otros autores respecto a la capacidad promotora de tumores en tejido mamario de rata. La diferencia observada entre NFX y BZ, respecto a la nula metabolización del último, concuerdan con lo observado por otros autores en otros órganos, por lo que confirma de algún modo la menor toxicidad aparente del BZ. Por último, el metabolismo nitrorreductor de los nitrofuranos y el posterior ciclo redox estarían involucrados en los efectos carcinogénicos de los mismos sobre este tejido.

ABSTRACT

Nifurtimox (NFX) and Benznidazole (BZ), two nitroheterocyclic drugs used in the treatment of Chagas' disease, have serious side effects mainly attributed to their nitroreduction to reactive metabolites. We report the reaching of these drugs to the mammary tissue and their potential bioactivation in situ. Both were detected in mammary tissue from female Sprague-Dawley rats after their intragastric administration. Xanthine-oxidoreductase from buttermilk and from the tissue cytosol biotransformed NFX but not BZ. These activities were purine dependent and inhibible by allopurinol. Microsomes biotransformed NFX but not BZ in the presence of NADPH. The process was inhibited by carbon monoxide and partially by diphenyleneiodonium. NFX treatment produced: a significant decrease in mammary tissue protein sulfhydryl content after 1 and 3 h; no increases in protein carbonyl content at any time analyzed; a significant increase of *t*-butylhydroperoxide-induced chemiluminescence after 6 h and significantly higher levels of lipid hydroperoxides at 3 and 6 h. Ultrastructural observations after 24 h showed significant differences compared with control epithelial cells.

INDICE

I- Introducción

| | |
|---|----|
| I-1. Introducción general..... | 2 |
| I-2. Enfermedad de Chagas..... | 3 |
| I-2.1. Reseña histórica..... | 3 |
| I-2.2. Situación actual en América..... | 5 |
| I-2.3. Situación actual en países no endémicos..... | 7 |
| I-2.4. Agente etiológico..... | 8 |
| I-2.4.1. Generalidades..... | 8 |
| I-2.4.2. Etapas del desarrollo, morfología y organización estructural..... | 10 |
| I-2.4.3. Ciclo de vida del parásito..... | 12 |
| I-2.5. Transmisión de la enfermedad de Chagas..... | 13 |
| I-2.5.1. Vías de transmisión..... | 13 |
| I-2.5.1.1. Transmisión vectorial..... | 14 |
| I-2.5.1.1.1. Descripción general del insecto vector..... | 14 |
| I-2.5.1.1.2. Morfología y fisiología de los triatomíneos..... | 15 |
| I-2.5.1.2. Transmisión por hemotransfusión..... | 17 |
| I-2.5.1.3. Transmisión transplacentaria y por trasplante de órganos..... | 18 |
| I-3. Tratamiento de la enfermedad..... | 18 |
| I-3.1. Bioquímica del <i>T. cruzi</i> . Blancos de acción..... | 18 |
| I-3.2. Definición droga ideal..... | 20 |
| I-3.3. Reseña histórica de los compuestos utilizados anteriormente..... | 20 |
| I-3.4. Drogas utilizadas en la actualidad..... | 21 |
| I-3.4.1. Dosis y tratamiento..... | 21 |
| I-3.4.2. Efectos laterales..... | 25 |
| I-3.5. Nuevas drogas evaluadas clínicamente..... | 26 |
| I-3.6. Desarrollo de nuevas drogas..... | 27 |
| I-3.6.1. Drogas sintéticas..... | 29 |
| I-3.6.2. Drogas naturales..... | 29 |
| I-4. Mecanismo de acción tóxica y farmacológica de nitrocompuestos..... | 30 |
| I-4.1. Generalidades. Radicales libres y estrés oxidativo..... | 30 |
| I-4.2. Biotransformación de nitrocompuestos..... | 32 |
| I-4.2.1. Enzimas metabolizadoras..... | 36 |
| I-4.2.1.1. Enzimas microsomales..... | 37 |
| I-4.2.1.2. Enzimas citosólicas..... | 38 |
| I-4.3. Mecanismos de defensa contra las especies reactivas de oxígeno..... | 40 |
| I-4.3.1. Mecanismos enzimáticos..... | 40 |
| I-4.3.2. Mecanismos no enzimáticos..... | 41 |
| I-4.4. Interacciones entre intermediarios reactivos y macromoléculas..... | 41 |
| I-4.4.1. Tipos de interacciones..... | 41 |
| I-4.4.2. Daño celular..... | 44 |
| I-4.4.2.1. Métodos para determinar estrés oxidativo y peroxidación lipídica..... | 46 |
| I-4.4.2.1.1. Estimación de la peroxidación lipídica..... | 46 |
| I-4.4.2.1.2. Determinación de niveles de carbonilos y sulfhidrilos proteicos..... | 47 |

| | |
|--|-----------|
| I-5. Mecanismo de acción tóxica del NFX y del BZ..... | 47 |
| I-5.1. Enzimas involucradas..... | 48 |
| I-5.2. Nifurtimox..... | 49 |
| I-5.2.1. Mecanismo de acción tripanocida..... | 50 |
| I-5.2.2. Efectos observados experimentalmente..... | 51 |
| I-5.2.3. Acción genotóxica y carcinogénica..... | 53 |
| I-5.3. Benznidazol..... | 55 |
| I-5.3.1. Mecanismo de acción tripanocida..... | 57 |
| I-5.3.2. Efectos observados experimentalmente..... | 57 |
| I-5.3.3. Acción genotóxica..... | 58 |
| | |
| I-6. Otros nitrocompuestos..... | 59 |
| I-6.1. 5-nitrofuranos..... | 60 |
| I-6.1.1. Metabolismo y toxicidad..... | 61 |
| I-6.1.2. Nitrofurantoína..... | 62 |
| I-6.1.3. Furazolidona..... | 65 |
| I-6.1.4. Nitrofurazona..... | 67 |
| I-6.2. Nitroimidazoles..... | 68 |
| I-6.2.1. Metabolismo y toxicidad..... | 69 |
| I-6.2.2. Metronidazol..... | 69 |
| I-6.3. Síntesis..... | 72 |
| | |
| II- Objetivos | |
| | |
| II-1. Objetivo general..... | 75 |
| II-1.1. Objetivos específicos..... | 75 |
| | |
| III-Materiales y Métodos | |
| | |
| III-1. Compuestos y reactivos..... | 77 |
| III-2. Instrumental..... | 78 |
| III-3. Animales y tratamiento..... | 79 |
| III-4. Obtención de las fracciones celulares..... | 80 |
| III-4.1. Fracciones microsomal y citosólica..... | 80 |
| III-5. Determinación de proteínas..... | 81 |
| III-6. Métodos de cuantificación..... | 82 |
| III-6.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución..... | 82 |
| III-6.2. Espectrofotometría de absorción..... | 82 |
| III-7. Concentración de los fármacos antichagásicos en el tejido mamario..... | 84 |
| III-8. Determinaciones enzimáticas..... | 85 |
| III-8.1. Determinación de la actividad nitrorreductásica..... | 85 |
| III-8.1.1. Actividad nitrorreductásica de xantino-oxidoreductasa de suero de leche bovina | 87 |

| | |
|--|-----|
| III-8.1.2. Actividad nitrorreductásica de fracciones celulares de tejido mamario de animales adultos post-lactación..... | 87 |
| III-8.1.2.1. Fracción microsomal..... | 87 |
| III-8.1.2.2. Fracción citosólica | 88 |
| III-8.1.3. Actividad nitrorreductásica de fracciones celulares de tejido mamario de animales adultos vírgenes sobre Nfx..... | 89 |
| III-8.1.3.1. Fracción microsomal..... | 89 |
| III-8.1.3.2. Fracción citosólica..... | 89 |
| III-9. Efectos del NFX..... | 90 |
| III-9.1. Determinaciones bioquímicas..... | 90 |
| III-9.1.1. Determinación del contenido de sulfhidrilos y carbonilos proteicos..... | 90 |
| III-9.1.2. Determinación de lipohidroperóxidos..... | 93 |
| III-9.1.3. Determinación de la quimioluminiscencia inducida por t-butilhidroperóxido | 94 |
| III-9.2. Determinaciones histológicas..... | 96 |
| III-9.2.1. Breve descripción histológica del tejido mamario..... | 97 |
| III-9.2.2. Microscopía óptica..... | 98 |
| III-9.2.3. Microscopía electrónica..... | 99 |
| III-10. Tratamiento estadístico de datos..... | 100 |
| IV-Resultados | |
| <i>Fármacos antichagásicos</i> | |
| IV-1. Contenido de NFX y BZ en tejido mamario..... | 102 |
| IV-2. Determinaciones enzimáticas..... | 103 |
| IV-2.1. Actividad nitrorreductásica de xantino-oxidoreductasa pura sobre NFX y BZ..... | 103 |
| IV-2.2. Actividad nitrorreductásica de fracciones subcelulares de animales adultos post-lactación sobre NFX y BZ..... | 103 |
| IV-2.3. Actividad nitrorreductásica de fracciones subcelulares de animales adultos vírgenes sobre NFX..... | 104 |
| IV-3. Efectos del NFX..... | 106 |
| IV-3.1. Determinaciones bioquímicas..... | 106 |
| IV-3.1.1. Contenido de sulfhidrilos proteicos..... | 106 |
| IV-3.1.2. Contenido de carbonilos proteicos..... | 106 |
| IV-3.1.3. Niveles de lipohidroperóxidos..... | 107 |
| IV-3.1.4. Determinación de quimioluminiscencia inducida por t-butilhidroperóxido..... | 108 |
| IV-3.2. Determinaciones histológicas..... | 111 |
| IV-3.2.1. Determinación de daños estructurales..... | 111 |
| IV-3.2.2. Determinación de daños ultraestructurales..... | 113 |
| <i>Nitroderivados</i> | |
| IV-4. Determinaciones enzimáticas..... | 116 |
| IV-4.1. Actividad nitrorreductásica de xantino-oxidoreductasa pura sobre distintos nitroderivados..... | 116 |

| | |
|---|-----|
| IV-4.2. Actividad nitrorreductásica de fracciones subcelulares de animales adultos post-lactación sobre distintos nitroderivados..... | 116 |
| V- Discusión | |
| V. Discusión..... | 119 |
| VI- Conclusiones | |
| VI. Conclusiones..... | 125 |
| VII- Referencias | |
| VII. Referencias..... | 127 |
| VIII- Apéndice | |
| VIII-1. Abreviaturas..... | 144 |
| VIII-2. Unidades | 146 |
| VIII-3. Expresiones en latín..... | 146 |
| VIII-4. Glosario..... | 147 |
| VIII-5. Difusión de resultados..... | 148 |
| VIII-5.1. Presentaciones a congresos..... | 148 |
| VIII-5.2. Publicaciones..... | 149 |

INDICE DE FIGURAS

I-Introducción

| | |
|--|----|
| Figura 1. Distribución de los vectores e iniciativas gubernamentales asociadas..... | 6 |
| Figura 2. Estados morfológicos del <i>T. cruzi</i> | 11 |
| Figura 3. Ciclo de vida del <i>T. cruzi</i> | 12 |
| Figura 4. Estructuras químicas de NFX y BZ..... | 22 |
| Figura 5. Biotransformación reductiva por el sistema citocromo P450..... | 33 |
| Figura 6. Ciclo redox y etapas de la nitrorreducción | 34 |
| Figura 7. Formación de intermediarios reactivos..... | 35 |
| Figura 8. Etapas de la nitrorreducción..... | 35 |
| Figura 9. Dismutación del radical anión superóxido..... | 36 |
| Figura 10. Formación del radical hidroxilo..... | 36 |
| Figura 11. Esquema de producción de NO catalizada por la XO..... | 40 |
| Figura 12. Detoxificación de H ₂ O ₂ por la GSH peroxidasa..... | 41 |
| Figura 13. Reacción del O ₂ ^{•-} con los grupos sulfhidrlicos..... | 43 |