

Evaluación del Efecto Genotóxico de Quinonas mediante el Ensayo de Micronúcleos

Estela FERRATO, Margarita BRIÑÓN y Susana M. SICARDI*

Laboratorio de Genotoxicidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires. Junín 956 (1113) Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. La acción mutagénica de la 2-hidroxi-N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)1,4-naftoquinona-4-imina (IV), un nuevo compuesto con actividad tripanocida frente al *Trypanosoma cruzi* es demostrado mediante el Ensayo de Micronúcleos. La quinoneimina (IV) y sus precursores, la 2-hidroxi-naftoquinona (V) y el 5-amino-3,4-dimetil-isoxazol (VI) fueron inyectados a ratones S.J.L. Swiss, por vía intraperitoneal, a las dosis de 5, 50, 100 y 200 mg/Kg, examinándose luego de 24 horas las células de la médula ósea. Las quinonas (IV) y (V) mostraron un claro incremento en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos, la cual es máxima a 50 mg / Kg. Mediante el cálculo de las potencias relativas, se observa que el grupo 3,4-dimetil-5-isoxazolilo no influye mayormente en la actividad citotóxica a pesar de que incrementa la actividad parasiticida del grupo quinona. El precursor (VI) resultó mutágeno negativo a las dosis ensayadas.

SUMMARY. "Genotoxic Effect of Quinones Assessed by the Micronucleus Test". The mutagenic activity of 2-hydroxy- N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)1,4-naphthoquinone-4-imine (IV), a new compound with trypanocidal activity on *Trypanosoma cruzi* is demonstrated in the Micronucleus Test. The quinoneimine (IV) and their precursors 2-hydroxy-naphthoquinone (V) and 5-amine-3,4-dimethyl-isoxazole (VI) were given intraperitoneally at doses of 5, 50, 100 and 200 mg/Kg to S.J.L. Swiss mice. Bone marrow cells were examined 24 hs after the administration. Quinones (IV) and (V) showed a clear increase in the frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes (statistically significant). At 50 mg/Kg the order of relative mutagenic potencies was similar, showing that the substituted isoxazolyl group enhanced the parasiticidal activity of naphthoquinone but do not increase their cytotoxicity. No mutagenic activity was found in (VI).

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

PALABRAS CLAVE: Mutagenicidad; Micronúcleos; Naftoquinonas; 2-Hidroxi- N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)-1,4-naftoquinona-4-imina; 2-Hidroxi-1,4-naftoquinona; 5-Amino-3,4-dimetil-isoxazol.

KEY WORDS: Mutagenicity; Micronucleus test; Naphthoquinones; 2-Hydroxy-N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1,4-naphthoquinone-4-imine; 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone; 5-amine-3,4-dimethyl-isoxazole.

INTRODUCCION

El desarrollo de fármacos eficaces en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana continúa como tema prioritario en los programas nacionales de estímulo y financiación a la investigación científica ¹. Se necesitan compuestos con buena biodisponibilidad, activos en la fase aguda y crónica de la enfermedad y exentos de citotoxicidad.

Dos familias químicas se destacan como principales candidatos: los nitrocompuestos aromáticos y las quinonas (Figura 1). Pertenecientes al primer grupo, el nifurtimox (I) y el benznidazol (II) llegaron a la comercialización, resultando muy útiles en la fase aguda pero escasamente efectivos en el período crónico y con serios efectos adversos ². La actividad antichagásica de estos compuestos así como su citotoxicidad ha sido atribuida a la presencia de la función nitro unida a un anillo aromático. En el ensayo de Ames, en presencia de microsomas ³ y en el de micronúcleos ⁴, resultaron mutágenos positivos. Su genotoxicidad fue posteriormente confirmada mediante el estudio de aberraciones cromosómicas en niños chagásicos tratados con estos agentes ^{5,6}.

Por otra parte, varias naftoquinonas muestran en experimentación una apreciable actividad inhibitoria frente a algunos protozoarios, incluyendo tripanosomas. La β -lapachona (III), una o-naftoquinona de origen natural, inhibe *in vitro* el crecimiento del *Trypanosoma cruzi* ⁷. Su acción tripanocida ha sido correlacionada a su capacidad de generar anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$); esto es posible debido a su estructura quinoide que puede ser fácilmente reducida a las formas semiquinona y quinol por las fracciones mitocondriales del parásito y, posteriormente oxidadas por el oxígeno molecular, provocando una peroxidación lipídica con la consecuente generación de radicales libres ⁸.

En busca de compuestos más activos ha sido sintetizada una serie de isoxazolil naftoquinonas ⁹, entre cuyos miembros se destaca la 2-hidroxi-N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)1,4-naftoquinona-4-imina (IV) por su actividad *in vivo* frente al *T. cruzi*. Las quinoneiminas tienen propiedades similares a las quinonas, incluyendo la habilidad de reducirse vía un electrón para dar un radical libre semiquinona o vía dos electrones para llegar a un derivado tipo aminofenol. En común con la β -lapachona inhiben el crecimiento, la síntesis de ADN y generan anión superóxido por los epimastigotes del *T. cruzi* ^{10,11}.

Este mecanismo de acción tóxica frente al parásito puede involucrar acciones citotóxicas para el huésped. En base a esta suposición y a la escasa bibliografía sobre genotoxicidad de quinonas ^{12,13} hemos considerado de interés evaluar el potencial mutagénico y/o carcinogénico de la quinoneimina (IV) y sus precursores, la 2-hidroxi-naftoquinona (V) y el 5-amino-3,4-dimetil-isoxazol (VI) mediante el ensayo de Micronúcleos ¹⁴.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Ratones S.J.L. Swiss, con libre acceso al agua y alimentos (Nutrimentos S.A. dieta 3) fueron criados y mantenidos a 20-25 °C respetando el ciclo 12 h luz - 12 h oscuridad. Para el ensayo de Micronúcleos se seleccionaron machos y hembras cuyo peso oscilaba entre 20 y 25 g.

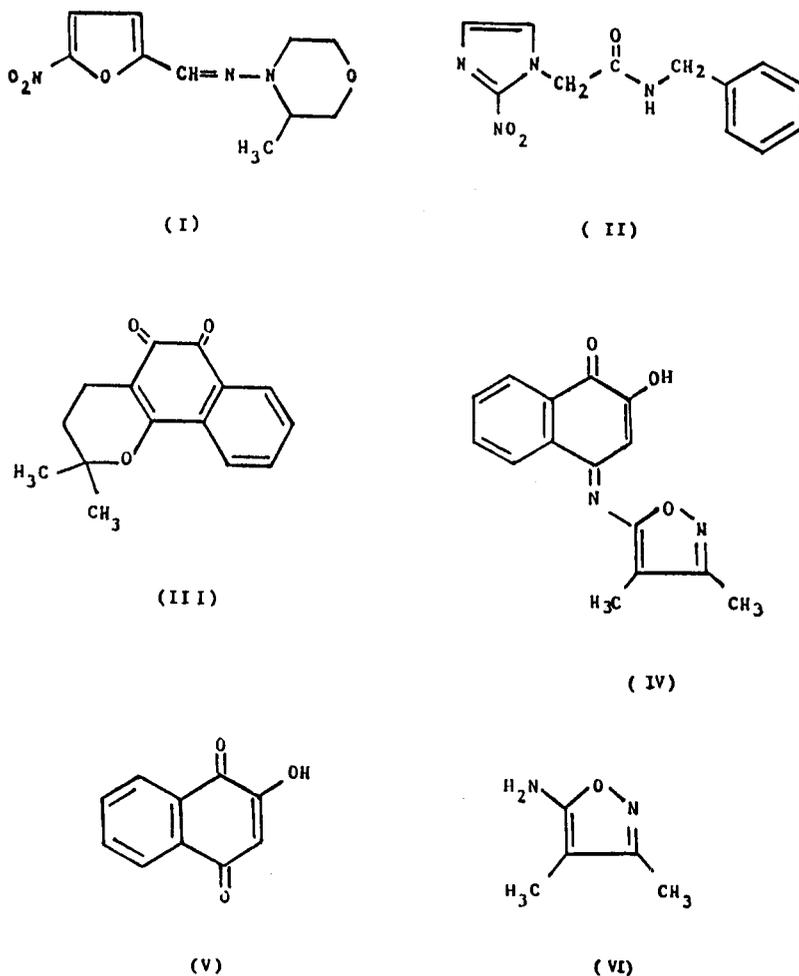


Figura 1. Nifurtimox (I), Benznidazol (II), β -lapachona (III), 2-hidroxi-N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)-1,4-naftoquinona-4-imina (IV), 2-hidroxi-naftoquinona (V) y 5-amino-3,4-dimetilisoxazol (VI).

Sustancias a ensayo

La 2-hidroxi-N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)-1,4-naftoquinona-4-imina (IV) fue sintetizada de acuerdo a la técnica previamente descrita¹⁰. Sólido anaranjado, recrystaliza de EtOH. P.F = 214.5 °C. La 2-hidroxi-naftoquinona (V) y el 5-amino-3,4-dimetil-isoxazol (VI), comercialmente disponibles fueron recrystalizadas y se constató su pureza por TLC.

Ensayo de Micronúcleos

Ocho ratones Swiss de ambos sexos fueron utilizados para cada dosis. Doce grupos recibieron una de las diferentes dosis (Tabla 1) del compuesto en ensayo mediante inyección intraperitoneal. Para cada lote de animales, un grupo fue usado como control, inyectándoles el vehículo solamente. Los compuestos (IV), (V) y (VI) fueron suspendidos en una solución acuosa de propilenglicol (0,15 ml/ml) a

Cto.	Dosis mg/kg	EPCMN X ± ES	F obs. ^a	% Incr. s/ contr.	PR ^b
IV	0	0.71 ± 0.28			
	5	1.88 ± 0.23		164	
	50	4.86 ± 0.46*	A	584	1333
	100	3.14 ± 0.23*		342	236
	200	2.43 ± 0.43		242	
V	0	0.71 ± 0.28			
	5	1.71 ± 0.28		140	
	50	2.83 ± 0.48*	B	298	1038
	100	1.67 ± 0.42		135	
	200	2.00 ± 0.58		182	
VI	0	0.71 ± 0.28			
	5	1.14 ± 0.26		60	
	50	1.89 ± 0.26	C	166	
	100	1.13 ± 0.23		59	
	200	1.73 ± 0.22		143	

REF: ^a F de Fischer calculada usando el ANOVA de un solo factor,

A: $F(4,40) = 4.31$, $p < 0.01$. B: $F(4,27) = 2.73$, $p < 0.05$. C: $F(4,40)$, $p > 0.05$.

^b PR: Potencia relativa calculada como % de incremento sobre control en función de la dosis (mM/kg)

* Dosis significativas en relación al resto de las dosis (Análisis de Newman-Keuls)

Tabla 1. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN).

la concentración deseada e inmediatamente antes de su aplicación. Veinticuatro horas después de la inyección i.p se llevó a cabo la eutanasia por dislocación cervical y se extrajo de cada ratón ambos fémures, preparándose extendidos de la médula ósea de acuerdo a la técnica previamente descripta^{14,15}. La presencia de micronúcleos (MN) fue analizada en 500 eritrocitos policromáticos (EPC) por animal, sobre portaobjetos codificados, registrándose el número de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN). Los valores dados en la Tabla 1 expresan el promedio de EPCMN más menos el error estándar. Se utilizó el método de ANOVA de un solo factor para detectar diferencias significativas en la frecuencia de MN entre animales tratados y controles. A posteriori, el análisis de Newman-Keuls permitió individualizar las dosis tóxicas. En todos los casos, una $p < 0,05$ fue considerada significativa.

Las potencias relativas (PR) fueron calculadas como el cociente entre el % de incremento de MN sobre los controles y la correspondiente dosis molar del compuesto.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

No aparecen diferencias significativas entre machos y hembras en el recuento de micronúcleos provenientes de ratones tratados, por lo cual los datos son analizados en conjunto (n = 8). Los resultados se describen en la Tabla 1.

Las quinonas (IV) y (V) mostraron un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos en relación a los controles. A las dosis ensayadas, no se manifestaron efectos tóxicos visibles en los animales ni se modificó la relación entre eritrocitos normocromáticos y policromáticos, indicando que estos compuestos no producen inhibición en el desarrollo de la progenie roja.

La 2-hidroxi-N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)-1,4 naftoquinona-4-imina (IV) y la 2-hidroxi-naftoquinona (V) dan una curva dosis-respuesta en forma de U invertida con un efecto tóxico máximo a las dosis de 50 y 100 mg/Kg para la primera y sólo a 50 mg/Kg para la segunda. Este tipo de curva, común para muchos compuestos evaluados in vivo¹⁵⁻¹⁷, sugiere que estos compuestos facilitan una acción genotóxica a dosis medias pero no son tóxicos a bajas y altas dosis. Si bien resulta comprensible la ausencia de toxicidad a dosis bajas debido a la presencia de sistemas enzimáticos de defensa que posee el organismo (por ejemplo, Glutathion-Glutathion transferasa), no lo es para dosis altas.

En este último caso, dicho comportamiento podría ser atribuido a diversos factores, tales como a) saturación en el mecanismo de captación y metabolización del pretoxógeno o b) participación de otros sistemas enzimáticos de defensa¹⁸ a dosis altas.

El 5-amino-3,4-dimetil-isoxazol (VI) no mostró diferencias significativas entre grupos tratados y controles, por lo cual a las dosis ensayadas resultó mutágeno negativo. Este compuesto que posee un grupo amino de carácter aromático, y por lo tanto sospechoso de genotoxicidad¹⁵, posee en su estructura un nitrógeno aromático que se comporta electrónicamente como atractor de electrones y por lo tanto disminuye o anula las propiedades toxogénicas del amino aromático¹⁹.

En conclusión, la actividad mutagénica de las quinonas estudiadas está en concordancia con su estructura química, la cual es capaz de entrar con facilidad en reacciones redox. Cuando se comparan las potencias inductoras de micronúcleos de (IV) y (V) se observa que el grupo isoxazolilo no influye mayormente en la actividad mutagénica. Sin embargo, el grupo isoxazolilo exalta la actividad tripanocida de la 2-hidroxi-naftoquinona¹¹, lo cual lleva a pensar que ambas actividades podrían ser separadas por modificación molecular.

Agradecimientos. A la Farm. Nora E. Cáceres por su colaboración en la parte experimental. Este trabajo ha sido financiado por UBA-SECYT Resol. N° 2625/91, FA087.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. PAHO/WHO *Scientific Publications* (1970-1976) N° 195 y 318; Programas de Investigación PID-CONICET 1980-1993
2. Brener, Z. (1984) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro. Suppl. **79**: 149-55
3. Ferreira, R. C. C. y I. C. S. Ferreira (1986) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **19**: 19-25

4. Gorla, N.B y J.A. Castro (1985) *Toxicol. Lett.* **25**: 259- 64
5. Gorla, N.B, O.S. Ledesma, G.P. Barbieri e I.B. Larripa (1988) *Mutation Res.* **206**: 217-20
6. Gorla, N.B. , O.S. Ledesma, G.P. Barbieri e I.B. Larripa (1989) *Mutation Res.* **224**: 263-7
7. Docampo, R., J.N. Lopes, F. Cruz y W. Di Souza (1977) *Expt. Parasit.* **42**: 142-9
8. Boveris, A., A.O. Stoppani, R. Docampo y F.S. Cruz. (1978) *Comp. Biochem. Physiol.* **61**: 327-9
9. Fernández, A. E., M. M. de Bertorello y R. H. Manzo (1982) *An. Asoc. Quim. Argentina* **70**: 49-60
10. Amuchastegui P.I., E.R.A. Moretti, B. Basso, N. Sperandeo y M.M. de Bertorello (1990) *Rev. Arg. Microbiol.* **22**: 199-207
11. Schwarcz de Tarlovsky M.N. , S.G. Goijman , M.P. Molina de Portela y A.O. Stoppani (1990) *Experientia* **46**: 501-7
12. Chesis, P.L., D.E. Levin, M.T. Smith, L. Ernster y B.N. Ames. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 1696-700
13. Miller, M.G. , A. Rodgers y G.M. Cohen (1986) *Biochem. Pharmacol.* **35**: 1177-84
14. Schmid, W (1975) *Mutat. Res.* **31**: 9-15
15. Sicardi, S.M. , J.L. Martiarena y M. T. Iglesias (1991) *J. Pharm. Sci.* **80**: 761-4
16. Faiman, C.P., G.A. de Eravsquin y C. M. Baratti (1992) *Meth. Find Exp. Clin. Pharmacol.* **14**: 607-13
17. Baratti, C.M., J.W. Opezzo y S.R. Kopf (1993) *Behav. Neural Biol.* **60**: 69-74
18. Llesuy, S., P. Evelson, B. González Flecha, J. Peralta, M.C. Carreras, J.J. Poderoso y A. Boveris (1994) *Free Radic. Biol. Med.* **1**: 131-8
19. Sicardi, S.M. y E. Ferrato (1993) datos no publicados