

## ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES EN LA MUCOSA DEL COLON DE RATAS TRATADAS CON NIFURTIMOX\*

MARIA MONTALTO de MECCA, CARMEN RODRIGUEZ de CASTRO, EDITH G. DIAZ, JOSE A. CASTRO

Centro de Investigaciones Toxicológicas (CEITOX-CITEFA-CONICET), Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires

**Resumen** El nifurtimox (Nfx) es un fármaco empleado en el tratamiento del Mal de Chagas agudo que ha evidenciado en su uso clínico y en estudios experimentales efectos colaterales tóxicos que comprometen su empleo. Estos efectos fueron correlacionados con la nitrorreducción del Nfx a radical nitroanión y la generación de aniones superóxido a través de un ciclo redox. El objetivo de este trabajo fue verificar si después de la administración oral de Nfx ( $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) a ratas macho Sprague Dawley se observan alteraciones ultraestructurales en el colon. Los resultados mostraron que 24 h después de administrar el Nfx se observan alteraciones consistentes en una dilatación moderada del retículo endoplásmico y en una dilatación intensa del complejo de Golgi en las células epiteliales colónicas. El Nfx está presente en el tejido colónico 1 y 3 h después de su administración oral, en concentraciones de  $9.7 \pm 2.9$  y  $7.0 \pm 1.7 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$  respectivamente. Los estudios de actividad nitrorreductásica del Nfx, espectrofotométricos y por HPLC, en fracciones subcelulares, permiten establecer su presencia en la fracción microsomal, con valores de  $0.72 \pm 0.29$  y  $0.26 \pm 0.04 \text{ nmol Nfx}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína, pero no en el citosol. Los resultados muestran una correlación entre la localización del daño observado y la fracción celular donde ocurre la nitrorreducción. El daño intenso del complejo de Golgi producido por el Nfx sugiere potenciales alteraciones en las funciones de síntesis y/o almacenamiento de productos de secreción de la mucosa colónica.

**Palabras clave:** nifurtimox, derivados nitroheterocíclicos, nitrorreducción, quimioterapia del mal de Chagas, daños en el colon

**Abstract** *Ultrastructural alterations in colonic mucosa of nifurtimox treated rats.* Nifurtimox (Nfx) is a chemotherapeutic agent used in the treatment of acute Chagas' disease. Clinical and experimental studies with this nitroheterocyclic compound evidenced serious undesirable side effects. These were correlated with Nfx nitroreduction to a nitroanion radical followed by superoxide anion generation through a redox cycling process. The aim of this study was to verify whether the oral administration of Nfx to Sprague Dawley male rats ( $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , po) produced any observable ultrastructural alteration in the cells of the colonic mucosa. Results showed that 24 h after Nfx administration there were observable alterations in this type of cells. They essentially consisted of moderate dilatation of their endoplasmic reticulum and intense dilatation of their Golgi complex. Already 1 and 3 h after Nfx administration, the original compound reached a concentration of  $9.7 \pm 2.9$  and  $7.0 \pm 1.7 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$  respectively in the colonic tissue. Studies on Nfx nitroreductase activity of colonic mucosa as determined spectrophotometrically and by HPLC methods showed that the microsomal fraction (from  $0.72 \pm 0.29$  to  $0.26 \pm 0.04 \text{ nmol Nfx}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein) but not the cytosol had the ability to nitroreduce Nfx. The results obtained show a correlation between the ultrastructural localization of injury and that of nitroreductase activity. The intense deleterious effects of Nfx in the Golgi apparatus suggest the potential occurrence of alterations in the synthesis/storage of secretory products of the colonic mucosa.

**Key words:** nifurtimox, nitroheterocyclic derivatives, nitroreduction, Chagas' disease chemotherapy, colon injury

El Mal de Chagas es una enfermedad endémica de los países latinoamericanos<sup>1-3</sup>. Existen al menos 20 millones de personas afectadas y alrededor de 60 millones viviendo en áreas de potencial infección. Después de la

fase aguda de la enfermedad en los pacientes chagásicos pueden aparecer efectos adversos en el corazón y sistema nervioso central y también procesos inflamatorios intensos en el colon y esófago<sup>1</sup>. Asimismo, en la literatura se han publicado casos de incidencia aumentada de cáncer en colon y esófago en estos pacientes<sup>4,5</sup>.

En el tratamiento de la fase aguda de la enfermedad de Chagas se han usado dos drogas, el Nifurtimox, 4-[(5-nitrofurfuriliden) amino]-3- metiltiomorfolina-1,1-dióxido (Nfx) (Fig 1) y el Benznidazol, N- bencil-2- nitro-1- imidazol acetamida (Bz)<sup>1, 6-8</sup>. Ambas drogas muestran distinta efectividad quimioterapéutica frente al agente etiológico de la enfermedad, el *Trypanosoma cruzi*, y

Recibido: 5-VI-2000

Aceptado: 11-IX-2000

\*Presentado en las VI Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial, Buenos Aires, 1999 y en el XI Congreso Argentino de Toxicología, La Plata, 1999.

**Dirección postal:** Dr. José A. Castro, Centro de Investigaciones Toxicológicas, J.B. de La Salle 4397, 1603 Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires, Argentina.  
Fax: (54-11) 4709 5911 e-mail: ceitox@dd.com.ar

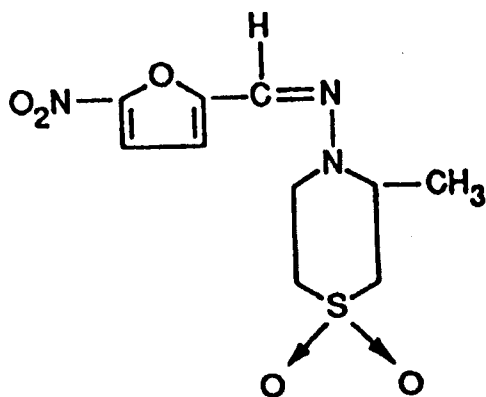


Fig 1.- Nifurtimox

producen diferentes efectos tóxicos colaterales<sup>7</sup>. Se han realizado estudios clínicos<sup>9-13</sup> empleando Nfx en los cuales se observaron reacciones indeseables que muchas veces obligaron a los pacientes a abandonar el tratamiento<sup>14, 15</sup>. En estudios experimentales el Nfx ha demostrado poseer efectos que no son fácilmente evidentes en su uso clínico, por ejemplo, mutagénicos, endocrinos, carcinogénicos, sobre la reproducción y otros<sup>16-24</sup>.

La toxicidad de este nitroheterociclo se ha atribuido a su metabolismo nitrorreductor que conduce a la formación del radical nitroanión y especies reactivas del oxígeno (Fig 2)<sup>7, 14, 15, 25, 26</sup>. En este proceso se ha observado la participación de nitrorreductas microsomas y citosólicas obtenidas a partir de diferentes tejidos<sup>22-24, 27-29</sup>.

En el presente estudio se describe la correlación entre los efectos ultraestructurales producido por el Nfx en la mucosa colónica y su biotransformación nitrorreductiva *in situ*.

## Materiales y métodos

**Reactivos:** El Nifurtimox, 4- [(5-nitrofurfuriliden) amino]-3-metilimorfolina-1, 1-dióxido (Nfx) fue suministrado por el la-

boratorio Bayer A.G. Leverkusen, Alemania. Todos las drogas empleadas fueron de grado analítico.

**Animales y tratamientos:** Se emplearon ratas macho Sprague Dawley de 200-300 g de peso que fueron criadas en nuestro laboratorio. Las ratas se distribuyeron en grupos de 5 por jaula y se mantuvieron en condiciones climáticamente controladas con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h (ciclo de luz de 07:00-19:00 h). El acceso a agua y alimento fue *ad libitum*. Los animales se ayunaron 12-14 h antes del tratamiento. El Nfx se administró po en una dosis de 100 mg/kg suspendido en carboximetilcelulosa (CMC) 1%. Las ratas control recibieron sólo CMC. Los animales se sacrificaron a diferentes tiempos después de la administración de la droga y el colon fue rápidamente retirado y lavado hasta eliminación completa de las heces. Para realizar los estudios metabólicos se empleó la mucosa del colon, que fue cuidadosamente raspada y acumulada antes de su procesamiento. La operación se realizó a 4°C.

**Microscopía electrónica:** Grupos de 5 ratas macho (control y tratadas con Nfx) se anestesiaron con éter etílico 24 h después de la administración de CMC or Nfx. Se expuso el colon mediante una incisión en la parte media del abdomen de cada animal y una vez retirado en su totalidad cada espécimen fue colocado inmediatamente en una solución buffer fría (pH 7.4) de formaldehído 2%-glutaraldehído 2% en ácido cacodílico 100 mmol·L<sup>-1</sup> que contenía 0.02% Cl<sub>2</sub>Ca. El tejido cortado longitudinalmente fue sumergido en el fijador y agitado suavemente varias veces para eliminar las heces. Después de una adecuada fijación, 10 cubos de 3 mm<sup>3</sup> obtenidos a partir de cada animal se lavaron con buffer barbital y se fijaron nuevamente con tetróxido de osmio 1%. Luego, cada bloque fue teñido con acetato de uranilo, deshidratado con distintas concentraciones de etanol y embebido verticalmente en resina epoxi con el objeto de asegurar una orientación apropiada para efectuar el corte perpendicularmente al plano de la superficie luminal.

La selección de áreas para hacer los cortes finos se efectuó examinando con un microscopio óptico secciones de 1mm de espesor teñidas con azul de toluidina. Las secciones finas se cortaron con cuchilla de diamante, se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 300<sup>22-24</sup>.

**Aislamiento de las fracciones celulares:** La mucosa del colon se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio/teflon Potter-Elvehjem con 4 volúmenes de buffer Tris/HCl 20 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4; que contenía sacarosa 0.25 mol·L<sup>-1</sup> y ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 5 mmol·L<sup>-1</sup>. Los homogenatos se centrifugaron a 9000 x g durante 20 min. Los sobrenadantes resultantes se centrifugaron a 105.000 x g durante 1 h para obtener los microsomas y el correspondiente sobrenadante. Éste se dializó durante la noche empleando 2 L de un buffer Tris/HCl 20 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4, que contenía sacarosa 0.25 mol·L<sup>-1</sup> y áci-

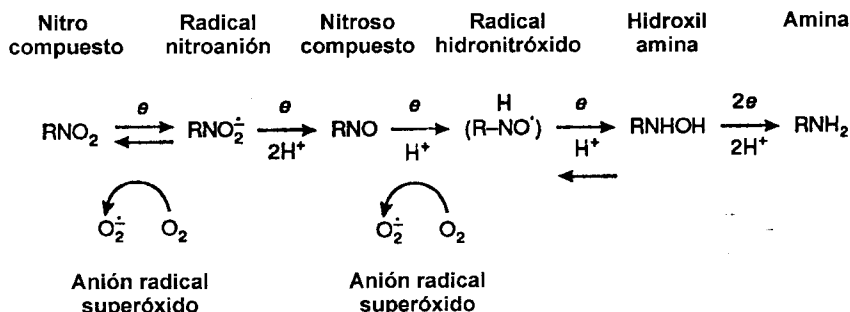


Fig 2.- Vía metabólica reductiva de los nitrocompuestos y formación del anión radical superóxido

do etilendiamino tetraacético (EDTA) 50 mmol·L<sup>-1</sup>. Durante estas operaciones la temperatura de las muestras se mantuvo a 4°C<sup>30</sup>.

**Determinación del contenido de Nfx en el tejido colónico:** El colon de ratas tratadas con una única dosis oral de Nfx se lavó para eliminar la materia fecal y luego se homogeneizó en un homogeneizador Ultra Turrax T<sub>25</sub> con solución salina (10 volúmenes por g). La extracción de 1 ml de homogenato con 6 ml de diclorometano se efectuó empleando una columna de Extrelut®. El solvente se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y el residuo se disolvió en 0.4 ml de fase móvil. La muestra (20 µl) se cromatografió a 40°C usando un cromatógrafo líquido Hewlett Packard modelo 1090 Serie II y una columna HP ODS Hypersil (20 cm x 2.1 mm DI, con tamaño de partícula de 5 µm). La fase móvil (metanol 60 %-agua) se bombeó a un caudal constante de 0.2 ml min<sup>-1</sup>. La absorbancia del eluyente de la columna se determinó a 400 nm. La eficiencia de la recuperación del Nfx agregado a un homogenato de tejido fue mayor que el 72%. La curva de calibración se preparó a partir de 1 ml de homogenato al que se le agregó cantidades conocidas del compuesto (entre 80 y 400 ng Nfx·ml<sup>-1</sup>). La correlación del área de los picos obtenidos fue lineal respecto de la concentración de las muestras en el rango estudiado (factor de correlación 0.998). El límite de detección fue de 80 ng Nfx·ml<sup>-1</sup> para 1 ml de homogenato y una relación señal-ruido de 2.

**Determinación de la actividad nitrorreductásica:** Todas las incubaciones anaeróbicas se realizaron en viales de 20 ml de capacidad cerrados con tapas de goma, con agitación de 150 oscilaciones por minuto en baño de agua a 37°C. Para obtener condiciones anaeróbicas, se pasó una corriente de nitrógeno libre de oxígeno durante 5 min antes de la incubación de las mezclas. Éstas contenían: a) buffer fosfato (pH 7.4); b) la fracción microsomal (concentración final de proteína 4 g·L<sup>-1</sup>); c) sistema generador de NADPH 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> (que contenía 0.2 ml de buffer Tris/HCl 0.3 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4; 0.2 ml Cl<sub>2</sub>Mg 1 mol·L<sup>-1</sup>, 0.6 ml isocitrato deshidrogenasa tipo IV de corazón porcino, 124 mg de sal trisódica del ácido dl-isocítrico y 20 mg de sal sódica de NADP) y d) Nfx 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> en N,N-dimetilformamida (DMF).

Para determinar la actividad enzimática en el citosol, el NADPH fue omitido y reemplazado por un sustrato apropiado. En el caso de la aldehído oxidasa, la concentración final del sustrato específico, N-metilnicotinanida, y el inhibidor, menadiona, fueron de 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> y 10 µmol·L<sup>-1</sup> respectivamente. En el caso de la xantino oxidasa la concentración final del sustrato específico, hipoxantina, y el inhibidor, alopurinol, fueron de 0.25 mmol·L<sup>-1</sup> y 0.15 mmol·L<sup>-1</sup> respectivamente. La concentración citosólica proteica en las determinaciones de actividad enzimática fue de 6-8 g·proteína·L<sup>-1</sup>.

Para determinar espectrofotométricamente la actividad Nfx nitrorreductásica microsomal, los viales que contenían un volumen final de 2.5 ml se incubaron durante 20 minutos. La reacción enzimática se interrumpió por adición de 1 ml de sulfato de zinc 15%. Las mezclas de incubación se volcaron sobre 2.5 g de NaCl y se extrajeron con 7 ml de acetato de etilo. Se determinó la absorbancia de la fase orgánica a una longitud de onda de 400 nm, que corresponde al máximo de absorción del Nfx.

Para determinar la actividad Nfx-nitrorreductásica por HPLC, los viales que contenían un volumen final de 0.5 ml de la suspensión microsomal o citosólica se incubaron durante 20 ó 60 minutos respectivamente. La reacción enzimática se interrumpió por adición de 1 ml de metanol. Cada muestra (1.5 ml) se centrifugó a 13 000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se cromatografió por HPLC en fase reversa en forma similar a la descrita anteriormente. La cuantificación se realizó comparando el área de los picos con estándares de referencia tratados en forma idéntica.

En estos estudios efectuados *in vitro* la actividad Nfx nitrorreductásica se determinó midiendo la desaparición de sustrato.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry et al<sup>31</sup> usando albúmina sérica bovina como estándar de referencia.

## Resultados

Los estudios por HPLC de ratas que recibieron Nfx oralmente demostraron que la droga sin modificar llega al colon rápidamente (Tabla 1). También se comprobó que los microsomas obtenidos a partir de la mucosa del colon reducen al Nfx (Tabla 2). La fracción citosólica, en cambio, no produce nitrorreducción del Nfx en presencia de N-metil-nicotinamida como cosustrato de la enzima aldehído oxidasa o en presencia de hipoxantina como cosustrato de la enzima xantino oxidoreductasa.

## Discusión

Estudios previos de otros laboratorios demostraron que la biotransformación nitrorreductiva del Nfx conduce a la

TABLA 1.— Contenido de Nifurtimox (Nfx) en el tejido del colon de ratas a distintos tiempos después de su administración

Tiempo después de la administración (horas)	Contenido de Nfx (nmol·g <sup>-1</sup> colon ± DE)
1	9.7 ± 2.9
3	7.0 ± 1.7

El Nfx (100 mg·kg<sup>-1</sup>) se administró a las ratas oralmente. Los animales se sacrificaron a distintos tiempos después de la administración de la droga y el contenido de Nfx en el tejido del colon fue analizado por HPLC. Los resultados corresponden a la media ± DE de tres determinaciones.

TABLA 2.— Actividad nifurtimox (Nfx) nitrorreductásica en microsomas de colon de rata

Microsomas	Tiempo de incubación (min)	Actividad Nfx nitrorreductásica (nmol Nfx·min <sup>-1</sup> ·x·proteína)
Determinación espectrofotométrica	20	0.72 ± 0.29
Determinación por HPLC	20	0.26 ± 0.04

Los microsomas se incubaron a 37°C en atmósfera de N<sub>2</sub> con Nfx y sistema generador de NADPH. En cada experimento se emplearon 25 animales. Los resultados corresponden a la media ± DE de tres determinaciones.

formación del radical nitroanión y del anión superóxido<sup>25,26</sup>. Los efectos adversos observados pueden ser debidos a la disminución de la concentración de glutatión que acompaña al ciclo redox de la reacción<sup>32,33</sup>. Las pérdidas significativas de glutatión reducido provoca que las células sean más susceptibles a las especies reactivas del oxígeno y consecuentemente se produce la peroxidación lipídica<sup>34</sup>. La formación de radicales libres hidroxilo en el proceso nitrorreductor del Nfx *in vitro* no se observa<sup>35</sup>. La peroxidación de lípidos que ocurre *in vivo* podría deberse a la disminución de la concentración de glutatión asociada a la nitrorreducción de la droga. Asimismo, se sabe que existe una correlación entre la capacidad nitrorreductiva del Nfx y la producción de daño celular ultraestructural en diferentes tejidos como testículos, ovarios y glándulas adrenales<sup>22,24</sup>. En este estudio también se observó una correlación entre nitrorreducción y daño ya que el Nfx fue reducido por la fracción microsomal de la mucosa del colon y los estudios por microscopía electrónica mostraron una dilatación moderada del retículo endoplásmico y una marca-

da dilatación del complejo de Golgi de las células epiteliales del colon de ratas tratadas con la droga (Fig. 5 y 6) comparados con las mencionadas organelas de animales control (Fig. 3 y 4).

Acerca de las implicancias potenciales de estas observaciones es interesante señalar que en los pacientes tratados con Nfx se observan con frecuencia alteraciones funcionales gastrointestinales<sup>14</sup>. Los efectos descritos en este estudio podrían estar asociados con las mismas. En efecto, la dilatación del retículo endoplásmico y del complejo de Golgi inducida por el Nfx en las células epiteliales del colon podría alterar las funciones de absorción/secreción de la mucosa ocasionando procesos inflamatorios<sup>36,40</sup>. Estos efectos podrían estar relacionados con las reacciones indeseables observadas en el uso clínico del Nfx<sup>14</sup>. Las acciones indeseables no tendrían mucha importancia siempre que no fueran demasiado prolongadas o de gran intensidad. Los efectos observados en estos estudios son reversibles y no suficientemente intensos como para comprometer la supervivencia de la célula.

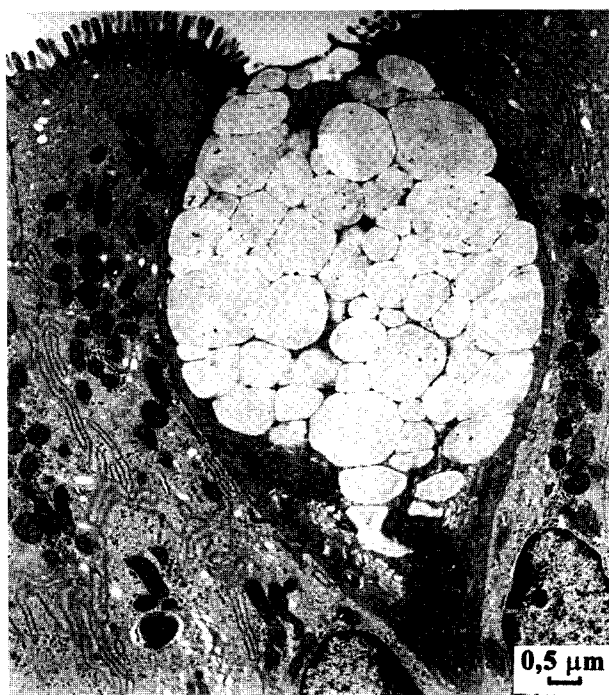


Fig 3.— Microfotografía electrónica de transmisión de células epiteliales del colon de una rata control. Las células epiteliales absorbentes muestran vellosidades regulares en el borde luminal. El resto del citoplasma contiene numerosas mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, complejo de Golgi y ribosomas libres. Una célula de goblet llena de mucus está cerca del lumen. x 11 000.

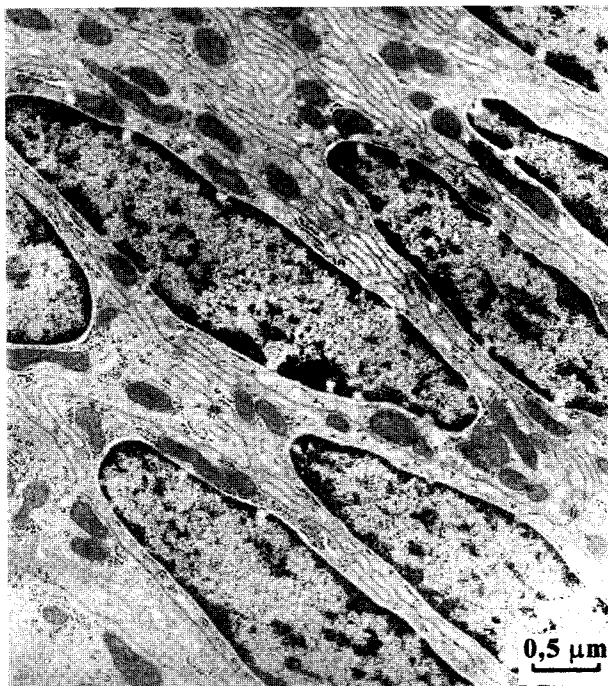


Fig 4.— Microfotografía electrónica de transmisión de células epiteliales del colon de una rata control. Se observan núcleos elongados en numerosas células columnares. Las mitocondrias y los ribosomas libres están dispersos en el citoplasma. Hay numerosas interdigitaciones entre los bordes laterales de las células absorbentes. x 23 760.

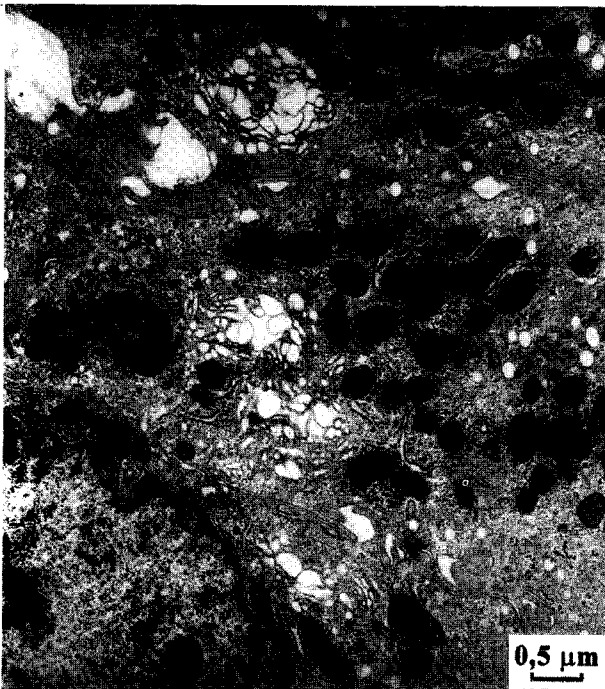


Fig 5.— Microfotografía electrónica de transmisión de células epiteliales del colon de una rata tratada con Nfx. En las células absorbentes se observa hipertofía, dilatación y distorsión del complejo de Golgi. Numerosos complejos de Golgi ocupan grandes áreas de la célula. x 17 600.

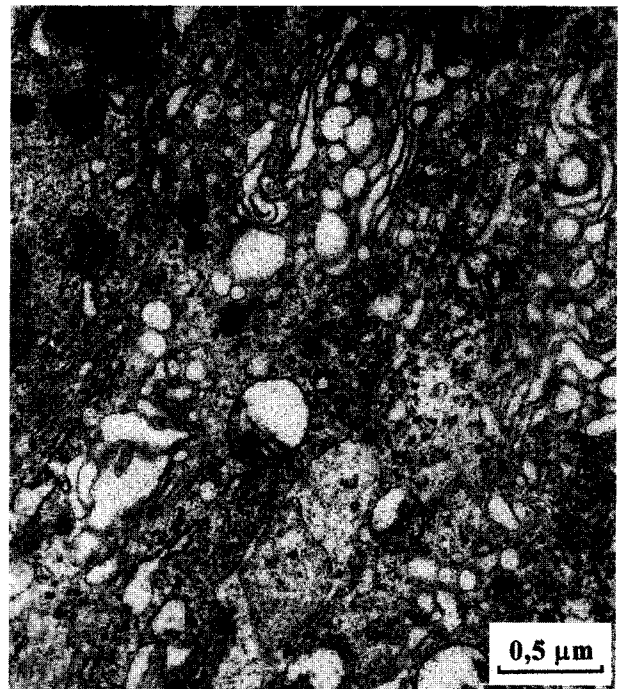


Fig 6.— Microfotografía electrónica de transmisión mostrando los efectos del Nfx sobre el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi de células epiteliales del colon de una rata tratada. Se observan con mayor detalle dichas organelas dilatadas. x 38 000.

**Agradecimiento:** Este trabajo fue financiado con fondos del FONCYT Subsidio PICT/97, Argentina.

## Bibliografía

- World Health Organization (WHO). Workshop on guidelines for standardized protocols for the chemotherapy of Chagas' disease 1981; TDR/CHEMCHA/DC WKSHP/81: 3 p 1-12.
- World Health Organization (WHO). Meeting on the development of trypanocidal compounds for the sterilization of blood 1985; TDR/CHA/BS 84: 3.
- Pinto Díaz JC. Enfermedad de Chagas. Epidemiología. Clínica. Terapéutica. Buenos Aires: Programa de Salud Humana. 1984. p 1-106.
- Lustig ES de, Puricelli L, Bal E, Lansetti JC. Asociación entre la enfermedad de Chagas y el cáncer. *Medicina* 1980; 40: 43-8.
- Chaves Olivera E, Brasil Leite M, Luguetti Ostermayer A, Caetano Almeida A, Moreira H. Chagasic megacolon associated with colon cancer. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 596-8.
- De Castro SL. The challenge of Chagas disease chemotherapy. An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 1993; 53: 83-98.
- Stoppani AOM. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59 Suppl 2: 147-65.
- Storino RA, Gallerano R, Sosa R. Tratamiento antiparasitario específico. En: *Enfermedad de Chagas* (eds) Buenos Aires, Mosby-Doyma Argentina SA, (1994); pp 557-68.
- Cichero JA, Segura E, Quatrochi JC. Evolución clínica-parasitológica y tolerancia a la droga de 33 niños con infección chagásica crónica tratados con Bay 2502. *Bol Chil Parasitol* 1969; 24: 59-62.
- Cerisola, JA. Evolución serológica de pacientes con enfermedad de Chagas aguda tratadas con Bay 2502. *Bol Chil Parasitol* 1969; 24: 54-9.
- Lugones HS, Peralta F, Canal Feijoo DC, De Marteleur AEA. Evolución de la sintomatología clínica y la función hepática en la enfermedad de Chagas aguda tratada con Bay 2502. *Bol Chil Parasitol* 1969; 24: 19-24.
- Cançado JR, Salgado AA, Batista SM, Chiaric C. Segundo (Buenos Aires) ensaio terapêutico com Nifurtimox na doença de Chagas. *Rev Goiana de Medicina* 1976; 22: 203-33.
- Laplumé H, Barousse AP, Cabrera H. Efectos indeseables de nifurtimox y benznidazol. *Medicina (Buenos Aires)* 1982; 42: 223
- Castro JA, Toranzo, EG. de. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Biomed Environ Sci* 1988; 1: 19-33.
- Docampo R, Moreno SNJ. Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Rev Biochem Toxicol* 1985; 7: 159-204.

16. Hoffman BK. Toxicological investigations on the tolerability of Nifurtimox. *Arzneim Forsch* 1972; 22: 1590-603.
17. Castro JA. Toxicology in problem detection and as problem solving for tropical diseases. The Latin American example of Chagas'disease. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Conf. Toxicol. Dev. Count., Cairo, Egypt, 19-23- Nov., 1995, Vol I, 109-24.
18. Nagel R and Nepomnaschy I. Mutagenicity of 2-anti-chagasic drugs and their metabolic deactivation. *Mut Res* 1983; 117: 237-42.
19. Ohnishi T, Ohashi Y, Nozu K, Inohi S. Mutagenicity of nifurtimox in *Escherichia coli*. *Mut Res* 1980; 77: 241-4.
20. Gorla NB, Castro JA. Micronucleus formation in bone marrow of mice treated with nifurtimox or benznidazole. *Toxicol Lett* 1985; 25: 259-63.
21. Teixeira ARL, Calixto MA, Teixeira ML. Chagas'disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. *Mut Res* 1994; 305: 189-96.
22. Bernacchi AS, Castro CR de, Toranzo EGD de, Castro JA. Effects of nifurtimox or benznidazole administration on rat testes: Ultrastructural observations and biochemical studies. *Exp Mol Pathol* 1986; 45: 245-56.
23. Castro CR de, Toranzo EGD de, Bernacchi AS, Carbone M, Castro JA. Ultrastructural alterations in ovaries from nifurtimox or benznidazole-treated rats. Their relation to ovarian nitroreductive biotransformation of both drugs. *Exp Mol Pathol* 1989; 50: 385-97.
24. Castro CR de, Toranzo, EGD de, Carbone M, Castro JA. Ultrastructural effects of nifurtimox on rat adrenal cortex related to reductive biotransformation. *Exp Mol Pathol* 1990; 52: 98-108.
25. Docampo R, Stoppani AOM. Generation of oxygen reduction derivatives induced by nifurtimox and other nitrocompounds in *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* 1980; 40 Suppl 2: 10-6.
26. Docampo R, Mason RP, Mattley C, Muñoz R. Generation of free radicals induced by nifurtimox in mammalian tissues. *J Biol Chem* 1981; 256: 10 930-3.
27. Toranzo EGD de, Masana M, Castro JA. Nitroreduction of benznidazole and nifurtimox by rat and human feces. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1983; 41: 341-4.
28. Masana M, Toranzo EGD de, Castro JA. Studies on Nifurtimox nitroreductase activity in liver and other rat tissues. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1984; 270: 4-10.
29. Aguilar EG, Arranz CK de, Toranzo EGD de, Castro JA. Benznidazole and nifurtimox nitroreductase activity in liver microsomes from male rats preinduced with phenobarbital or 3-methylcholanthrene. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985; 50: 443-6.
30. Castro CR de, Toranzo EGD de, Castro JA. Benznidazole-induced ultrastructural alterations in rat adrenal cortex. Mechanistic studies. *Toxicology* 1992; 74: 223-32.
31. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-71.
32. Dubin M, Moreno SNJ, Martino EE, Docampo R, Stoppani AOM. Increased biliary secretion and loss of hepatic glutathione in rat liver after nifurtimox treatment. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 483-7.
33. Docampo R, Dubin M, Martino EE, Moreno SNJ, Stoppani AOM. Influencia del nifurtimox sobre el contenido en glutatión del hígado y de la bilis en la rata. *Medicina (Buenos Aires)* 1983; 43: 33-40.
34. Comporti M. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 1987, 45: 143-69.
35. Castro GD, Castro JA. Studies on pentane evolution by rats treated with nifurtimox or benznidazole. *Toxicology* 1985; 35: 319-26.
36. Watkins PB. The metabolic barrier of the gastrointestinal tract. In: McCuskey RS, Earnest DL, v editors; Sipes IG, McQueen CA, Gandolfi AJ, editors in chief. *Comprehensive Toxicology*; v 9. New York: Elsevier Sciences Inc; 1997. p 549-58.
37. Ilett KF, Tee LBG, Reeves PT, Minchin RF. Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen and wall. *Pharmac Ther* 1990; 46: 67-93.
38. Van der Vliet A, Bast A. Role of reactive oxygen species in intestinal diseases. *Free Rad Biol Med* 1992; 12: 499-513.
39. Earnest DL. Clinical toxicology of common drugs and chemicals: Colon. In: McCuskey RS, Earnest DL, v editors; Sipes IG, McQueen CA, Gandolfi AJ, editors in chief. *Comprehensive Toxicology*; v 9. New York: Elsevier Sciences Inc; 1997. p 661-75.
40. Morré DM. Role of the Golgi apparatus in cellular pathology. *J Electron Microscopy Tech* 1991; 17: 200-11.

-----  
*It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent; it is the one that is most adaptable to change.*

No es el más fuerte de la especie el que sobrevive, ni el más inteligente; sino el más adaptable al cambio.

Charles R. Darwin (1809-1882)