



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències
Departament de Genètica i de Microbiologia
Grup de Mutagènesi

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE
DERIVADOS FURILETILÉNICOS APLICANDO
ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

TESIS DOCTORAL

Jorge I. González Borroto

2006

Este Trabajo de Tesis se ha realizado en los laboratorios del Grupo de Mutagénesis del Departamento de Genética y de Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona y en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo Aplicado (RCC CIDA S.A.), Santa Perpètua de Mogoda, Barcelona.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Ricard Marcos Dauder y al Dr. Amadeu Creus Capdevila, por haber aceptado hace ya algún tiempo mi solicitud como doctorando y haberme dado la posibilidad de integrarme en el Grup de Mutagènesi de la Universitat Autònoma de Barcelona. Agradezco la acertada dirección de este proyecto de Tesis Doctoral y todo el esfuerzo, dedicación y empeño que han puesto a lo largo de estos años de trabajo que han hecho posible llevar a buen término esta Tesis. Gracias por los consejos, las enseñanzas y las experiencias transmitidas, que no solo han sido científicas y profesionales sino también personales lo que ha hecho que además de una excelente relación de trabajo se haya creado una relación de amistad. De todo ello he aprendido y lo he integrado en mi formación como investigador y como persona. En verdad, Muchas Gracias.

Quiero agradecer al resto de profesores del Departamento de Genética y Microbiología y a todo el personal del Departamento, administrativo, técnico, a todos. En especial a todos aquellos que por sus líneas de trabajo están directamente vinculados al Grupo de Mutagénesis y que han estado de una manera u otra relacionados con mi trabajo y mis actividades durante el desarrollo de la Tesis. Gracias a todos, Jordi Surrallés, Noel Xamena, Antonia Velázquez y Oriol Cabré.

Un agradecimiento muy especial a Glòria Umbert, por la amistad que desde el primer momento me has brindado, porque para mi y para que esta Tesis este lista para presentarse ha sido fundamental el poder contar con tu ayuda y con tu apoyo cada vez que lo he necesitado y han sido muchas veces a lo largo de estos años las que has tenido que dedicar parte de tu tiempo a pesar de que fuéramos siempre muchos los que te necesitáramos. Gracias por tu paciencia, por las charlas de ciencia y de no ciencia que también se necesitan para poder hacer una Tesis. Gracias por la amistad desde los primeros días y por poder seguir contando contigo entre mis amigos.

A todos mis amigos del grupo de mutagénesis que con el paso de estos años han sido muchos, tantos que no los nombraría por temor a dejarme a alguno. Desde el primer día de mi llegada me han hecho sentir como uno más. Gracias por la confianza, la amistad y los muchos ratos buenos que hemos pasado juntos. Una de las mayores enseñanzas de una Tesis, es la que se obtiene cuando coincides en un laboratorio con tantos amigos y aprendes que una amistad y un buen amigo siempre son necesarios para las grandes y las pequeñas cosas. Gracias a todos y de corazón un gran abrazo. A todos mis amigos de Cuba, que también son muchos y que aunque están lejos y a veces el contacto ha sido y es muy difícil seguimos de tanto en

tanto en contacto y nos damos cuenta que los amigos verdaderos son para siempre, muchas gracias a todos.

A toda mi familia, que a pesar de la distancia y a pesar de todas las cosas que han pasado no han dejado de apoyarme durante todos estos años. Gracias a mis padres, mis hermanos, mis sobrinas, en fin a todos. Gracias a los consejos, las enseñanzas, los recuerdos, el cariño y los miles de momentos juntos que en fin constituyen gran parte de mi vida. Porque cuando se está lejos de todos, son las cosas que te ayudan y en las que te apoyas para salir adelante. Gracias por ser como sois y por tener la suerte de tenerlos como familia. Gracias a la familia de aquí, que ya a lo largo de este tiempo nos hemos convertido en familia, gracias por el apoyo en todo momento, por el cariño y por hacerme sentir como uno más, como si fuera así de toda la vida. Es duro estar lejos de muchas cosas y ustedes han sabido hacer que esa distancia muchas veces desaparezca, y han hecho que me siga sintiendo dentro de una familia. Gracias a todos los de allá y los de aquí.

Agradezco a todos los que de una forma u otra han contribuido al desarrollo de este trabajo. En especial a todo el personal del Centro de Investigación y Desarrollo, a su dirección que han apoyado parte importante de este trabajo y me han brindado el apoyo y la confianza para realizarlo en sus instalaciones. Y que ha permitido establecer una relación de amistad y de trabajo seria y sólida, a todos muchas gracias.

Quiero hacer un agradecimiento especial al Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de las Villas, Villa Clara, Cuba. Muy especialmente a su director el Dr. Nilo Castañedo Cancio que desde hace ya un tiempo atrás depositó su confianza en mi y en nuestro grupo de trabajo y ha permitido el desarrollo de este trabajo con algunos de los productos que ellos han desarrollado. Gracias por su confianza y espero que las colaboraciones de trabajo sigan siendo siempre tan buenas como las que se han establecido en estos años. Gracias además a todos sus investigadores y a la vez amigos que allí trabajan que a pesar del paso del tiempo seguimos de tanto en tanto en contacto y manteniendo la amistad de tantos años.

A todos muchas gracias!!!!!!



ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	TOXICOLOGÍA GENÉTICA	1
1.1.1.	MUTAGÉNESIS EN CÉLULAS SOMÁTICAS COMO UN MECANISMO IMPLICADO EN LA CARCINOGENÉISIS	4
1.2.	ENSAYOS EMPLEADOS EN LOS ESTUDIOS DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA ..	6
1.3.	LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA	12
1.4.	ENSAYO DE MICRONÚCLEOS (MN).....	14
1.4.1.	ENSAYO DE MICRONÚCLEOS <i>IN VITRO</i> EN LINFOCITOS HUMANOS	15
1.4.2.	ENSAYO <i>IN VITRO</i> DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMÁTIDAS HERMANAS (SCE).....	20
1.4.3.	ENSAYO DE MICRONÚCLEOS <i>IN VIVO</i>	23
1.4.4.	ENSAYO <i>IN VITRO</i> DE ELECTROFORESIS EN CÉLULAS AISLADAS.....	25
1.5.	NITROFURANOS	29
1.5.1.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS NITROFURANOS	30
1.5.2.	MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS NITROFURANOS.....	36
1.5.3.	RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN DERIVADOS 2-FURILETILÉNICOS. PAPEL DEL GRUPO NITRO	38
1.5.4.	CARACTERÍSTICAS ELECTRÓNICAS DEL GRUPO NITRO (NO ₂)	40
1.5.5.	METABOLISMO	41
1.5.6.	METABOLISMO DE LOS DERIVADOS NITROFURANOS.....	43
2.	OBJETIVOS	45
3.	ARTÍCULO N° 1	46
3.1.	ARTÍCULO N° 2	55
3.2.	ARTÍCULO N° 3	63
3.3.	ARTÍCULO N° 4	71
3.4.	ARTÍCULO N° 5	77

3.5.	ARTÍCULO N° 6	82
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	88
4.1.	ENSAYO DE MICRONÚCLEOS <i>IN VITRO</i>	88
4.2.	ENSAYO <i>IN VITRO</i> DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMÁTIDAS HERMANAS (SCE).....	93
4.3.	ENSAYO <i>IN VITRO</i> DE ELECTROFORESIS EN CÉLULAS AISLADAS.....	98
4.4.	ENSAYO <i>IN VIVO</i> DE MICRONÚCLEOS EN RATÓN	102
4.5.	EFICACIA ANTIMICROBIANA Y SEGURIDAD GENOTÓXICA.....	106
5.	CONCLUSIONES	109
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	111



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. TOXICOLOGÍA GENÉTICA

La Toxicología Genética es la rama de la Genética o de la Toxicología que se encarga de analizar e identificar la acción de aquellos agentes de diverso origen o naturaleza que, a concentraciones subtóxicas, son capaces de interactuar directa o indirectamente con la molécula de DNA o con algunos de los componentes asociados a la misma. Como ejemplos de este último tipo de actuación podemos mencionar las interacciones con las proteínas nucleares, con las proteínas que intervienen en la reparación del DNA, o con las proteínas que intervienen en la segregación cromosómica (Kirsch-Volders *et al.*, 1984), que conducen a la inducción de alteraciones o mutaciones en el material genético. Los estudios de Toxicología Genética han evolucionado con el establecimiento de numerosos procedimientos de ensayo, tanto *in vitro* como *in vivo*, diseñados para evaluar los efectos de los agentes físicos y químicos sobre los mecanismos genéticos y su consiguiente riesgo en diversos organismos, incluyendo el ser humano. Es evidente que se necesita información sobre las alteraciones que se producen a tres niveles (genes, cromosomas y aparato celular necesario para la segregación cromosómica), para determinar el posible potencial mutagénico y presuntamente carcinogénico de un producto químico o un agente físico (Krishna y Hayashi, 2000).

Desde tiempos remotos el hombre ha relacionado la acción de diversos agentes físicos y químicos con efectos adversos sobre la salud humana. En la tabla 1 se presentan algunos datos sobre la relación entre agentes ambientales y el riesgo de cáncer; al tiempo que se resumen cronológicamente algunos hallazgos y la introducción de los ensayos de corta duración, de gran interés en la Toxicología Genética.

Desde los primeros estudios en el campo de la mutagenésis, se demostró que los efectos mutagénicos se podían producir tanto por la acción de agentes físicos como las radiaciones (Müller, 1927), como de agentes químicos (Auerbach y Robson, 1946). Estos trabajos pioneros sirvieron de base a investigaciones posteriores que pusieron de manifiesto que el riesgo de padecer cáncer y otras enfermedades genéticas podía aumentar como consecuencia de la exposición ambiental, laboral o terapéutica a agentes genotóxicos. Sin embargo, no es hasta el año 1960 en que comienza el desarrollo formal de la Toxicología Genética, a medida que se incrementan los conocimientos y las evidencias sobre los posibles riesgos asociados con las sustancias químicas tóxicas presentes en el medio ambiente. Esta problemática llevó a la creación de la *Environmental Mutagen Society (EMS)* en 1969 y a la introducción en los Estados Unidos, en la década de los años 70, de los requerimientos para

evaluar las propiedades mutagénicas de los compuestos químicos. En el año 1976 se promulgó la *Toxic Substances Control Act*, requerida específicamente por la *Environmental Protection Agency (EPA)*, donde se establecían los criterios estandarizados para la estimación de los efectos adversos sobre la salud y el medio ambiente asociados a procesos de mutagénesis (United States Congress, 1976; Wassom, 1989; MacGregor *et al.*, 2000).

Durante estos primeros años, los estudios de Toxicología Genética fueron diseñados para detectar mutaciones a nivel de la línea germinal y, a pesar de los enormes esfuerzos realizados para determinar el riesgo genotóxico *in vivo*, habían pocos métodos que permitieran una eficiente determinación del daño genético usando modelos *in vivo*. No fue hasta mediados de los años 70 en que se desarrollaron la mayoría de las pruebas actualmente rutinarias en Toxicología Genética y sus resultados fueron usados para la identificación de carcinógenos y la determinación del riesgo de cáncer (Choy, 1996a). Durante los años 1970 a 1980, a medida que se iban obteniendo nuevos resultados sobre evaluaciones mutagénicas que demostraban una fuerte correlación entre la actividad mutagénica en ensayos *in vitro* (p. ej., en el test de Ames) y la carcinogénesis en animales, se fueron estableciendo directrices por parte de las agencias reguladoras y se cambió de dirección en las estrategias de evaluación, centrando los esfuerzos en la determinación de los efectos a nivel de mutación somática y de carcinogénesis, en lugar de la detección preferencial de mutaciones en la línea germinal (MacGregor, 1994; MacGregor *et al.*, 2000).

La Toxicología Genética podría, por tanto, definirse como un campo multidisciplinario que estudia los daños en el material genético inducidos por cualquier tipo de agente (físico, químico y biológico), así como los mecanismos que los generan. Estos daños, si no son reparados a tiempo y correctamente, pueden conducir a alteraciones del DNA causando así mutaciones. Las mutaciones a menudo resultan en la alteración o eliminación de la función de los genes y, si los daños no son letales, se producen cambios heredables. Las mutaciones, tanto génicas como cromosómicas, y otros eventos relacionados, son la causa de muchas enfermedades humanas. Existen evidencias de peso de que las mutaciones y otros eventos relacionados que causan alteraciones en oncogenes, en genes supresores de tumores y en genes de reparación, están implicados directamente en la inducción, promoción y progresión del cáncer en el ser humano (Krishna y Hayashi, 2000).

Tabla 1: Algunos hitos importantes y desarrollo de ensayos de corta duración para la detección del potencial mutagénico y carcinogénico

Año	Ensayo
1775	Asociación del hollín y el carbón con el cáncer de escroto en humanos.
1914	Se sugiere que las mutaciones en células somáticas son el primer paso en el proceso cancerígeno.
1915	Inducción química de tumores epidérmicos en conejos.
1927	Inducción de mutaciones en <i>Drosophila melanogaster</i> con rayos X.
1932	Aislamiento del benzo- α -pireno del alquitrán e identificación del mismo como agente cancerígeno.
1946	Inducción química de mutaciones por el gas mostaza.
1947	Se propone que los hidrocarburos policíclicos aromáticos requieren actividad metabólica para su acción carcinogénica.
1964	Se demuestra la correlación entre el grado de unión al DNA y la potencia carcinogénica de 5 hidrocarburos policíclicos aromáticos.
1969	Se propone que la mayoría de los carcinógenos químicos requieren metabolismo antes de ser activos.
1971	Activación de la dimetilnitrosamina a mutágeno bacteriano, usando homogenado hepático.
1973	Desarrollo y aplicación del ensayo de Ames para detectar carcinógenos como mutágenos, usando el sistema <i>Salmonella/S9</i> .
1975	Buenos resultados en la identificación de carcinógenos como mutágenos empleando el ensayo de Ames.
Posterior a 1975	Desarrollo y aceptación general de los ensayos de corta duración como herramientas útiles en la predicción del potencial mutagénico de diversos agentes.

Podríamos decir que la genotoxicidad, en su sentido más amplio, es la capacidad de un agente de interactuar con el DNA, pudiendo causar un daño que, si no es reparado y se fija, conduce a una mutación. Los cambios en la secuencia del DNA pueden ser simples cambios de nucleótidos y/o alteraciones en su número que resultarían en mutaciones puntuales. Si se producen macrolesiones, entonces tendremos como consecuencia las alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas, detectables citogenéticamente. Es importante

señalar que los efectos adversos de las distintas mutaciones serán dependientes no sólo de su naturaleza y magnitud, sino también de los genes y tejidos en donde se produzcan los daños. Los efectos adversos más importantes y graves en las células somáticas serían: el cáncer, los procesos degenerativos como el envejecimiento prematuro y las enfermedades cardiovasculares. En el caso de las células germinales, se producirían abortos, muertes perinatales, malformaciones e incremento del riesgo de enfermedades hereditarias o defectos en la descendencia (Hartman, 1983; Venitt y Phillips, 1995; Choy, 1996b; DeSesso y Harris, 1996; Dearfield *et al.*, 2002).

1.1.1. MUTAGÉNESIS EN CÉLULAS SOMÁTICAS COMO UN MECANISMO IMPLICADO EN LA CARCINOGENESIS

Los conocimientos sobre los mecanismos moleculares involucrados en la inducción del cáncer han avanzado con gran rapidez en los últimos años, habiéndose demostrado que los eventos mutacionales están claramente implicados en la carcinogénesis (DeMarini *et al.*, 1994). El conocimiento de los cambios biológicos y bioquímicos que preceden al desarrollo de un tumor, los cuales incluyen pero no se limitan a los procesos de mutagénesis, al incremento de la proliferación celular y a la inhibición de apoptosis, entre otros, pueden proporcionar una base importante para la determinación del riesgo de cáncer (EPA, 2005). El hecho de que el cáncer puede resultar como consecuencia de una serie de alteraciones en los genes que controlan el crecimiento, la división y la diferenciación celular, le confiere gran importancia a la evaluación de la capacidad de un agente para afectar el genotipo celular y, como consecuencia, alterar la expresión y el producto de los genes, para predecir así su influencia en el proceso de carcinogénesis (Vogelstein *et al.*, 1988; Hanahan y Weinberg, 2000; Kinzler y Vogelstein, 2002). De aquí que los aspectos iniciales a considerar sean:

- Si el agente interacciona directamente con el DNA, ocasionando mutaciones que provocan los cambios en la expresión o en el producto de los genes.
- Si el agente lleva a cabo su efecto sobre la expresión de los genes por medio de otra vía que no involucre una reacción directa con la molécula de DNA, considerando la posibilidad de un mecanismo epigenético.

El proceso de carcinogénesis comprende una serie de eventos complejos que al final alteran las señales que una célula recibe de su medio extracelular y se promueve un crecimiento celular incontrolado. Muchos, pero no todos los mutágenos, son carcinógenos y algunos, pero no todos los agentes que inducen la proliferación celular, llegan a ocasionar el

desarrollo de un tumor. Por consiguiente, conocer las fases o etapas fundamentales en las cuales un determinado agente puede actuar, es esencial no sólo para comprender el mecanismo de acción, sino también para una correcta evaluación del riesgo que el mismo supone.

La determinación de agentes carcinógenos que actúan mediante un mecanismo de acción mutagénico, incluye la evaluación de los resultados de ensayos de corta duración, tanto *in vitro* como *in vivo*, empleando diferentes dianas genéticas. Usualmente estos carcinógenos mutagénicos producen respuestas positivas en múltiples ensayos para distintas dianas genéticas, como, por ejemplo, mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas estructurales, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados obtenidos constituyen datos claves para establecer el mecanismo de acción mutagénico de un agente carcinogénico

Es bien conocido que muchos carcinógenos son agentes con un elevado poder electrofílico que interaccionan con el DNA provocando aductos y roturas en el mismo. Durante el proceso de replicación del DNA estas lesiones pueden fijarse y convertirse en mutaciones puntuales o en alteraciones cromosómicas que, a su vez, pueden iniciar o contribuir al proceso de carcinogénesis (Shelby y Zeiger, 1990; IARC, 1999).

Por otra parte, algunos carcinógenos no interaccionan directamente con el DNA, pero pueden producir mutaciones o anomalías citogenéticas que se detectan en los ensayos rutinarios de mutagénesis. En estos casos, las lesiones se producen a través de mecanismos indirectos como, por ejemplo, mediante la interacción con los elementos celulares implicados en la división celular. Por otro lado, un incremento en la tasa de mutaciones también puede ser debido a efectos citotóxicos que causen una proliferación regenerativa (Cohen y Ellwein, 1990).

El incremento en la división celular puede aumentar las mutaciones debido a la expansión clonal de las células iniciadas, o por el incremento del número de errores que se producen durante la replicación del DNA por la rapidez de la división celular y, por consecuencia, de la reducción del tiempo disponible para que puedan actuar los sistemas de reparación del DNA. Los agentes epigenéticos pueden incrementar las mutaciones interfiriendo con las enzimas de reparación, lo cual podría resultar en inestabilidad genómica, en una mayor predisposición a otras alteraciones genéticas y a un aumento de la probabilidad de que ocurra la progresión neoplásica (Rouse y Jackson, 2002; EPA, 2005).

En presencia de ciertos agentes, se pueden afectar procesos importantes como la reparación del DNA y el inicio de la muerte celular programada, permitiéndose la replicación

de células portadoras de daños genéticos que normalmente deberían ser eliminadas. Tanto la proliferación celular como la apoptosis constituyen mecanismos importantes para el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos normales y las alteraciones del equilibrio entre estos mecanismos afectarán directamente el desarrollo del proceso carcinogénico.

Algunos agentes son capaces de interactuar con proteínas y macromoléculas necesarias para la correcta segregación cromosómica y, de esta forma, causan aneuploidías (pérdida o ganancia de cromosomas). Aunque actualmente las evidencias de carcinogenicidad de los agentes aneunógenos es limitada, un gran número de estos agentes causan transformación celular *in vitro* en cultivos de células de mamífero, como por ejemplo, en células epiteliales de hámster sirio (Gibson *et al.*, 1995). La aneuploidía puede resultar en pérdida de la heterocigosidad y en inestabilidad genómica y, por tanto, influir en los procesos de carcinogénesis.

En el desarrollo secuencial desde una célula normal hasta un tumor maligno, que al menos comprende las fases de iniciación, promoción y progresión, los mecanismos genéticos y epigenéticos pueden actuar a distintos niveles. Los carcinógenos genotóxicos inducen cambios principalmente en un estado inicial, mientras que los carcinógenos no genotóxicos pueden crear condiciones favorables para que se produzcan cambios genéticos en etapas más tardías, de aquí la importancia de estos dos mecanismos en la carcinogénesis (Choy, 1996b). Hasta el momento, los mecanismos genéticos son los más conocidos y mejor estudiados, pero cada vez existen más evidencias de la importancia de los mecanismos epigenéticos.

1.2. ENSAYOS EMPLEADOS EN LOS ESTUDIOS DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA

Desde que Auerbach y Robson demostraron en la década de 1940 que las sustancias químicas podían ser mutágenos potentes en *Drosophila melanogaster*, numerosos estudios realizados tanto en plantas como en animales, sentaron las bases para que se aceptara que la exposición a determinadas sustancias químicas presentes en el medio ambiente podía inducir alteraciones y daños en el DNA de los seres humanos, tanto en las células germinales como en las somáticas. Como ya se ha mencionado, el creciente interés por esta problemática llevó a la creación en el año 1969 de la EMS y, seguidamente en 1970, a la introducción de los requisitos para evaluar las propiedades mutagénicas de las sustancias químicas. En estos primeros años, los principales esfuerzos se dedicaron a los estudios de mutaciones germinales (Choy, 1996b; MacGregor *et al.*, 2000). No fue hasta entrada la década de 1970 en que se desarrollaron la gran mayoría de los ensayos de mutagénesis y entre los años 1970 y 1980 se

empezaron a desarrollar las directrices y guías para la evaluación de sustancias químicas ambientales y de aditivos alimentarios. Las baterías de ensayos propuestas eran muy parecidas a las usadas en la actualidad.

Los distintos ensayos están diseñados, en general, para detectar mutaciones que pueden generar cambios en la calidad y/o cantidad del material genético de un organismo. Estas mutaciones pueden generarse en un gen individual, en grupos de genes o a nivel cromosómico. La justificación del uso de ensayos de mutagénesis para detectar carcinógenos está basada en la teoría de la mutación somática de la carcinogénesis (Boveri, 1929; revisado en Choy, 1996b), en la que se postula que el cáncer está causado por mutaciones en las células somáticas. Ya hemos indicado que las evidencias de esta teoría son muy fuertes, ya que se ha visto y demostrado que muchos de los carcinógenos en roedores son a la vez mutágenos (Gold *et al.*, 1993) y que una gran mayoría de los carcinógenos humanos también son mutágenos (Shelby, 1988; Shelby y Zeiger, 1990). Por otra parte, diversos estudios citogenéticos han evidenciado que, en general, las células cancerígenas son heteroploides y presentan cambios cromosómicos específicos en algunos tipos de tumores (Mitelman, 1988). Los estudios de genética molecular del cáncer han mostrado también que la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores y de reparación son procesos mayoritariamente mediados por eventos mutacionales (Knudson, 1993).

A pesar de la existencia de importantes diferencias entre especies en cuanto a metabolismo, reparación del DNA y otros procesos fisiológicos que pueden influir en la mutagenicidad de una sustancia química, la universalidad del DNA y del código genético, así como el hecho de que el DNA de cualquier organismo es susceptible al daño tanto por agentes físicos como químicos, proporciona una base racional y científica para el uso de diversos sistemas de ensayo en organismos procariontes y eucariotes para detectar los posibles efectos mutagénicos. Además, el uso de estos sistemas de ensayo también está basado en el hecho de que muchos agentes que causan daño genético en una determinada especie (p. ej., bacterias, hongos, insectos, roedores) con frecuencia también causan un daño similar en otras especies o sistemas de ensayo, lo cual permite estimar el potencial mutagénico y los posibles efectos para el ser humano a partir de la extrapolación de los resultados. Todo esto avala la utilización de los ensayos que se han ido validando (Choy, 1996a, b; Dearfield *et al.*, 2002).

El avance en el desarrollo de los diferentes ensayos continuó vertiginosamente durante la década de 1980 y ya a finales de esta década y principios de los años 90, tanto en Europa como en Canadá, Estados Unidos y Japón, se contaba con guías establecidas para la

evaluación de los efectos mutagénicos de sustancias químicas usadas con diversos fines, a las que el ser humano podía estar expuesto (EPA, 1986; DH, 1989; DNHW, 1991; Shelby y Sofuni, 1991; Kirkland, 1993; Purves *et al.*, 1995). Aunque a finales de la década de 1990 ya se habían desarrollado alrededor de un centenar de sistemas de ensayo, rutinariamente sólo se aplicaban unos pocos para la evaluación mutagénica de las sustancias químicas. A pesar de que predominaba el criterio de que esta evaluación se debería basar en un número limitado de ensayos bien validados, seguían existiendo diferencias en cuanto a los requisitos exigidos y los ensayos recomendados en los diferentes países y en las diferentes agencias reguladoras.

En las tablas 2 y 3 se indican, respectivamente, los ensayos *in vitro* e *in vivo* más utilizados para cumplimentar las exigencias de las agencias reguladoras y estimar el potencial mutagénico.

Tabla 2. Ensayos *in vitro* comúnmente usados en los estudios de Toxicología Genética

Ensayo	Sistema de ensayo empleado
Mutación génica en bacterias.	<i>Salmonella thyphimurium</i> , <i>Escherichia coli</i>
Mutación génica en mamíferos.	Células de ovario de hámster chino (CHO), células AS52 de CHO, células L5178Y de linfoma de ratón.
Aberraciones cromosómicas en células de mamíferos.	Linfocitos humanos de sangre periférica, fibroblastos de pulmón de hámster chino, células CHO.
Ensayos de reparación del DNA: síntesis no programada del DNA.	Hepatocitos primarios de rata, hepatocitos primarios de humanos.
Ensayo de transformación celular.	Fibroblastos de embrión de hámster sirio, fibroblastos de ratón (BALB/C3T3).

A medida que se han ido desarrollando los diferentes sistemas de ensayo, y hasta la actualidad, ha prevalecido el criterio de que, a causa de la gran variedad de los posibles daños genéticos que pueden ocurrir y pueden ser evaluados, no existe un único sistema capaz de detectar todos los posibles daños y dianas genéticas que acompañan directa o indirectamente a los procesos de genotoxicidad o mutagénesis. Esto significa que no hay ningún ensayo validado que brinde información sobre los tres niveles de daño genético asociados con enfermedades genéticas humanas y necesaria para estimar el potencial mutagénico/carcinogénico de un agente. Por este motivo, para poder evaluar con la mayor seguridad posible y poder abarcar un espectro de daño suficientemente amplio, se

recomienda el uso de una batería de ensayos (COM, 2000; MacGregor *et al.*, 2000; Dearfield *et al.*, 2002).

Tabla 3: Ensayos *in vivo* comúnmente usados en los estudios de Toxicología Genética

Ensayo	Sistema de ensayo empleado
Ensayos citogenéticos: aberraciones cromosómicas, micronúcleos.	Células de médula ósea de rata, eritrocitos de médula ósea de ratón, eritrocitos de sangre periférica de ratón.
Mutación génica en células somáticas.	Ratones transgénicos (Muta TM Mouse and Big Blue TM), linfocitos humanos.
Mutación génica en células germinales: ensayos de letales dominantes y de <i>locus</i> específico en ratón.	Diferentes líneas de ratones.
Ensayo de reparación del DNA: síntesis no programada del DNA.	Hepatocitos de rata.

A medida que se ha ido avanzando en el perfeccionamiento de los ensayos de mutagénesis, se han dedicado considerables esfuerzos para homogeneizar a nivel internacional los requisitos básicos de las baterías de ensayo a utilizar. En la década de 1990 se desarrollaron un gran número de actividades internacionales dirigidas a la armonización de las estrategias y los ensayos de mutagénesis por parte de las principales sociedades de mutagénesis ambiental de los países más desarrollados: Canadá, Estados Unidos, Japón y Reino Unido, entre otros.

La principal influencia en el proceso de armonización internacional ha sido por parte de la ICH (*International Conference on Harmonization*), un proyecto en el que han trabajado en conjunto autoridades reguladoras de Estados Unidos, Europa y Japón. De estas conferencias han surgido líneas directrices, recomendaciones y guías para homogeneizar las estrategias de evaluación y las baterías de ensayos y, desde la primera conferencia de la ICH en 1991, se estableció que la genotoxicidad era un aspecto importante y fundamental en la evaluación de la seguridad de los productos químicos. Se han desarrollado dos guías respecto a la genotoxicidad denominadas ICH S2A y ICH S2B, que son dos guías complementarias que contienen directrices básicas para los estudios de genotoxicidad, principalmente para las moléculas de interés farmacéutico (ICH S2A, 1995; ICH S2B, 1997; MacGregor *et al.*, 2000). Todo este esfuerzo de armonización ha hecho posible que en la actualidad sea aceptado a nivel internacional que la batería de ensayos estándar de genotoxicidad para las

moléculas farmacéuticas esté integrada por los siguientes ensayos (ICH, 1997; Müller y Kasper, 2000):

Batería de ensayos estándar para la evaluación de la genotoxicidad:

- Ensayo para detectar mutación génica en bacterias.
- Ensayo *in vitro* de evaluación citogenética de daños cromosómicos en células de mamíferos, o el ensayo *in vitro* del linfoma de ratón.
- Ensayo *in vitro* para detectar mutación génica en cultivos de células de mamíferos.
- Ensayo *in vivo* para el análisis del daño cromosómico usando células hematopoyéticas de roedores.

En conjunto, el trabajo de la ICH y el de otros organismos internacionales como la OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*), ha jugado un papel decisivo en la estandarización y armonización de los ensayos más utilizados y en la especificación de los ensayos validados que han de conformar las baterías más aceptadas.

Los rasgos más generales que definen, caracterizan y resumen una batería de ensayos de genotoxicidad y que la convierten en un procedimiento de evaluación internacionalmente aceptado son los siguientes (ICH, 1997; Müller *et al.*, 1999; MacGregor *et al.*, 2000; Müller y Kasper, 2000; Dearfield *et al.*, 2002):

- Es apropiado estimar la genotoxicidad a nivel de mutación génica en el ensayo de retromutación en bacterias. Este ensayo ha mostrado ser capaz de detectar cambios genéticos relevantes, así como la mayoría de carcinógenos genotóxicos en roedores.
- El daño en el DNA considerado como relevante en células de mamífero y que no puede ser medido en bacterias, debe ser evaluado en células de mamífero. Varios sistemas celulares de mamífero están en uso: sistemas que detectan daño cromosómico (ensayos *in vitro* para aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales), sistemas que detectan primariamente mutación génica (ensayo HPRT usando células CHO, V79, L5178Y) y sistemas que detectan simultáneamente mutación génica y efectos clastogénicos (ensayo del linfoma de ratón). Se ha demostrado que con protocolos apropiados, los diferentes ensayos *in vitro* para daño cromosómico y el ensayo del linfoma de ratón, producen resultados con un alto nivel de concordancia para compuestos que son considerados como genotóxicos y que han dado resultados negativos en el ensayo de retromutación en bacterias.

- Es necesario incorporar un ensayo *in vivo* en la batería, para así proveer un modelo de ensayo en el cual factores relevantes adicionales (absorción, distribución, metabolismo y excreción), que pueden influenciar la actividad genotóxica de los compuestos, sean tenidos en consideración. Los ensayos *in vivo* permiten la detección adicional de algunos agentes genotóxicos, ya que existe un pequeño número de carcinógenos genotóxicos que son detectables al analizar el daño cromosómico en médula ósea. Este tipo de compuestos producen resultados conflictivos, débiles o negativos en los demás ensayos recomendados para la batería estándar. Entre ellos podemos citar compuestos carcinogénicos como la procarbacin, las hidroquinonas, el uretano y el benceno. Entre los ensayos *in vivo* que detectan daño cromosómico en células hematopoyéticas de roedores se incluyen el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea de rata y el ensayo de micronúcleos en médula ósea o sangre periférica de ratón.

En la actualidad se siguen utilizando los ensayos recomendados en la batería antes descrita para evaluar los efectos mutagénicos de diversos agentes químicos, en especial para las nuevas moléculas farmacéuticas. Pero el desarrollo, la estandarización y la validación de nuevos ensayos de genotoxicidad han hecho que cada vez haya nuevos ensayos aplicables a la evaluación de la potencialidad mutagénica.

Recientemente se han publicado por parte de prestigiosos comités de expertos, entre ellos el *Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (COM)* y la *Environmental Protection Agency (EPA)*, nuevos esquemas para establecer la estrategia, los requerimientos y los ensayos de mutagénesis necesarios.

La nueva batería propuesta no difiere en su esencia ni en sus fundamentos de la batería anterior y los principales cambios están enfocados en un aumento del peso de los ensayos *in vitro* utilizados, introduciendo como ensayo recomendado el ensayo *in vitro* de micronúcleos por su capacidad para detectar efectos clastogénicos y aneugénicos. Por otra parte, propone la aplicación de ensayos *in vivo* para detectar daño en el DNA en diversos órganos y no solamente en la médula ósea o en el hígado, que son los órganos dianas en los ensayos tradicionalmente empleados. Para ello se da énfasis al empleo del ensayo del cometa *in vivo* por su posible aplicación a un gran número de órganos dianas y por la valiosa información que puede brindar, de una manera bastante rápida.

Estas nuevas estrategias o esquemas para la evaluación de la mutagenicidad de los compuestos químicos cuentan cada vez más con mayor aceptación internacional; por lo que,

en un futuro no muy lejano, estarán presentes en las baterías de evaluación recomendadas (COM, 2000; Dearfield *et al.*, 2002; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005).

1.3. LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Las preparaciones de cromosomas a partir de muestras de sangre periférica han sido, desde hace varios años, una herramienta muy útil en el estudio de daños genotóxicos que pueden afectar a la salud humana. Las observaciones de que el daño en los cromosomas podía ser causado por la exposición a agentes como las radiaciones ionizantes o los compuestos químicos carcinogénicos, constituyeron unas de las primeras evidencias irrefutables de que determinados agentes pueden causar graves alteraciones en el material genético de las células eucariotas. A pesar de que nuestro conocimiento de la estructura de los cromosomas aún es incompleta, podemos afirmar que las alteraciones cromosómicas son una consecuencia directa y una manifestación del daño a nivel del DNA (Fenech, 2000).

Entre las células del torrente sanguíneo, unas de las más usadas en investigación son los linfocitos. Los linfocitos humanos son células del sistema inmunitario, de origen hematopoyético, que circulan normalmente en estado no proliferativo por todo el cuerpo. Gracias a la acción de algunos agentes mitógenos, como la fitohemaglutinina (PHA), podemos estimular los linfocitos, preferentemente a los de tipo T, y así establecer cultivos donde habrá proliferación y se alternarán períodos de síntesis de DNA con períodos de división mitótica.

La cinética de los linfocitos humanos en cultivo es bien conocida, lo cual es muy importante en el establecimiento y análisis de los resultados experimentales. Es importante tener presente que cuando se emplean diferentes donantes para este tipo de estudios de evaluación genotóxica, se pueden producir variaciones entre los cultivos de linfocitos de los diferentes donantes en relación a su cinética normal, debido a diferencias en la respuesta frente a los mitógenos. Esto afectará el crecimiento de las células en las condiciones de cultivo que se empleen (Albertini *et al.*, 2000).

La mayoría de los linfocitos se encuentran en el estado interfásico (G₀) del ciclo celular y, al ser estimulados con la PHA, pasan a una fase activa (G₁); aquí las células se preparan para la replicación del material genético, aumenta la síntesis de RNA, comienzan los procesos de síntesis protéica, etc. A las 24 h de la estimulación de los linfocitos, se inicia la fase de síntesis del DNA, la cual durará aproximadamente 20 h, por lo que, 48 h después de estimulados, los linfocitos entran en la primera fase mitótica para iniciar un segundo ciclo de

división celular que durará aproximadamente 24 h. Así, una vez transcurridas 72 h desde la estimulación inicial con PHA, las células alcanzan su segunda división mitótica.

Por lo tanto, todo el proceso de división y progresión del ciclo celular es importante y esencial para que se pueda expresar el daño genético en caso de haberse producido. La inducción y posterior detección del daño genético dependerá de la fase del ciclo celular en la que se encuentren las células durante la acción de un determinado agente que pueda ser potencialmente genotóxico.

El ciclo celular está caracterizado por cuatro etapas o fases. Dos fases de crecimiento, G1 y G2, separadas por una fase de síntesis (S) y la última fase que es una etapa de división, la mitosis (M). A su vez, la mitosis está formada por cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. En cada una de ellas actúan una serie de mecanismos y se originan una serie de procesos biológicos encaminados a la condensación del material genético en los cromosomas y a la separación de los mismos para garantizar la correcta dotación cromosómica de las células hijas después de completarse la división celular.

Durante las etapas G1, S y G2, los cromosomas son estructuras descondensadas que están ubicadas en el núcleo celular. Hacia el final de la fase G2, los cromosomas comienzan a condensarse y se convierten en estructuras localizables y visibles y su forma y tamaño son características únicas de cada especie. Los cromosomas alcanzan su máxima condensación durante la etapa de metafase de la mitosis celular.

Durante la metafase los cromosomas se encuentran bien definidos, con sus dos cromátidas separadas, y suele ser la fase donde se visualizan y estudian de forma adecuada y con relativa facilidad. Varios ensayos citogenéticos, como el análisis de intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) y el ensayo de aberraciones cromosómicas (CA), basan sus análisis en la observación de los cromosomas de las células durante esta etapa de la división celular.

Los linfocitos humanos de sangre periférica representan un sistema muy ventajoso para realizar estudios de mutagénesis *in vitro* (Carrano y Natarajan, 1988), y entre sus ventajas como sistema de ensayo podemos destacar:

- Son fáciles de obtener y de establecer cultivos.
- Constituyen una población relativamente sincrónica.
- Tienen un cariotipo estable, bien conocido y caracterizado.
- Presentan un ciclo celular corto y bien conocido.

- Se dispone de técnicas citogenéticas estandarizadas y relativamente económicas que permiten su uso y estudio.
- Son un sistema sensible para la detección de daño genético.
- Se utilizan como sistema celular en un gran número de técnicas *in vitro*.

Este sistema de ensayo también presenta algunas desventajas, entre ellas tenemos:

- Los linfocitos T que se estimulan en los cultivos pueden, en ocasiones, no ser las células dianas del agente cuya actividad genotóxica se quiere evaluar.
- Presentan una capacidad metabólica limitada.
- En algunas ocasiones, no constituyen una población homogénea.

Como las ventajas superan los inconvenientes, los linfocitos humanos han sido ampliamente utilizados para analizar daños genéticos inducidos por exposición a agentes químicos y físicos.

Los estudios de citogenética que usan cultivos de linfocitos permiten detectar alteraciones grandes en el DNA mediante la sencilla observación, por medio del microscopio óptico, de alteraciones en la estructura de los cromosomas (Carrano y Natarajan, 1988). Entre los ensayos citogenéticos más utilizados para estudiar el potencial genotóxico de diversos agentes se encuentran los estudios de CA, SCE y de micronúcleos (MN).

El aumento de la frecuencia de estos biomarcadores en diversas condiciones, ya sea de laboratorio o por exposiciones ambientales, se ha relacionado con un aumento del riesgo de cáncer y de otras enfermedades genéticas.

1.4. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS (MN)

El avance decisivo para que los MN fueran usados para medir el potencial genotóxico se produjo con el trabajo de Boller y Schmid en el año 1970 donde se sugirió, por primera vez, el término ensayo de micronúcleos y su aplicabilidad a los estudios de mutagénesis química (Boller y Schmid, 1970; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

El ensayo de micronúcleos es un ensayo que combina sensibilidad y simplicidad y que puede desarrollarse tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo su gran ventaja que tiene capacidad para detectar tanto clastógenos como agentes inductores de aneuploidía. Este ensayo fue originalmente desarrollado en eritrocitos de médula ósea de ratón (Schmid, 1976), aunque

también se ha empleado en otros mamíferos como ratas (George *et al.*, 1990) y primates (Choy *et al.*, 1993).

Además de su uso en animales de experimentación, este ensayo se ha usado en una amplia variedad de células y organismos eucariotas. En principio, cualquier población de células capaz de dividirse puede ser utilizada para el ensayo de MN.

Los MN tienen un aspecto parecido al de pequeños núcleos y se originan (de forma espontánea o inducida) a partir de cromosomas rezagados o fragmentos cromosómicos derivados de cambios cromosómicos estructurales. Por tanto, la expresión de MN puede ser consecuencia de alteraciones cromosómicas o de disfunción del huso acromático. Cuando una célula se divide, tanto los cromosomas retrasados como los pequeños fragmentos quedarán excluidos de los núcleos hijos en la telofase (Fenech, 1998).

Dada la gran aplicabilidad de este ensayo, el protocolo para la detección de MN puede sufrir variaciones en varios aspectos como, por ejemplo, el número de dosis aplicadas, el número de veces y los tiempos de recolección de las células, etc. (Ashby y Tinwell, 1990). Por lo tanto, en función del tipo de experimento, del organismo y del tipo celular utilizado, existen variaciones en la metodología del ensayo de MN.

La técnica más común del ensayo de MN en los estudios *in vivo* usa médula ósea de roedores por las conocidas ventajas de este sistema celular. Sin embargo, desde la década de los 90 se ha venido usando cada vez más el ensayo en sangre periférica de ratones (Hayashi *et al.*, 1990). El ensayo de MN en sangre o en médula ósea de roedores constituye en la actualidad uno de los ensayos *in vivo* mejor establecido y validado. Además del ensayo *in vivo*, se han ido desarrollando diversos métodos para medir la presencia de MN en una gran variedad de células nucleadas, fundamentalmente en ensayos *in vitro*. De los métodos propuestos, el que ha tenido mayor aceptación ha sido el ensayo de MN *in vitro* con bloqueo de la citocinesis (Fenech, 2000).

1.4.1. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS *IN VITRO* EN LINFOCITOS HUMANOS

Como ya hemos explicado, los MN son pequeños núcleos con membrana definida que presentan una apariencia morfológica similar a la del núcleo principal. Su origen puede ser por fragmentos cromosómicos o por cromosomas enteros y pueden aparecer en el citoplasma de la célula después de la división; así pues, este origen citogenético les confiere dos implicaciones importantes:

1. Se requiere una división celular para que los MN se expresen en la población celular.
2. Su origen hace que los MN resulten tanto de acciones clastogénicas como aneugénicas.

La figura 1 muestra esquemáticamente el origen citogenético de los MN.

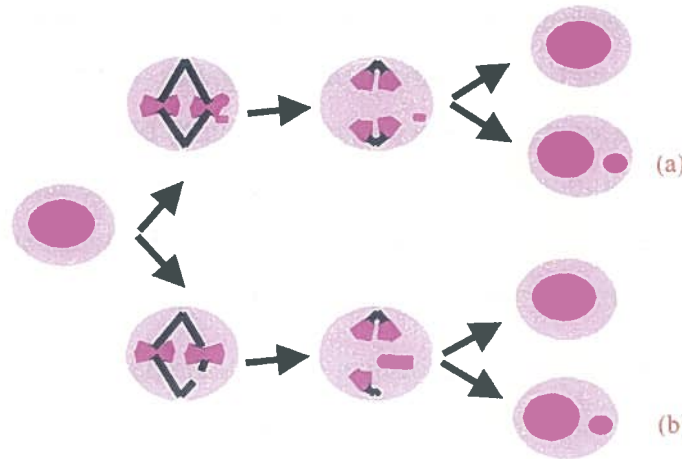


Figura 1: Origen citogenético de los micronúcleos y células micronucleadas.

(a), célula con micronúcleo originado por fragmento cromosómico, (b), célula con micronúcleo originado por un cromosoma entero.

Los MN fueron descritos en el citoplasma de eritrocitos hace más de un siglo y fueron llamados “fragmentos de material nuclear” por Howell o “corpúsculos intraglobulares” por Jolly. Por lo que estas estructuras son conocidas desde hace tiempo por los hematólogos como “cuerpos de Howell-Jolly” (Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

Son varios los autores que desde la década de 1920 se han referido a la presencia de MN en sus trabajos. Sin embargo, no fue hasta el año 1959 en que Evans y colaboradores propusieron el uso de los MN como una medida del daño cromosómico inducido por la radiación ionizante en plantas. La presencia de MN, como ya hemos comentado, se fue describiendo en una amplia diversidad de células y tejidos. A partir de 1976, año en que Schmid desarrolló el ensayo usando eritrocitos de médula ósea de ratón, se va convirtiendo en un ensayo de rutina en la evaluación de la genotoxicidad. También en el año 1976 se propuso el ensayo de MN en cultivos de linfocitos humanos y el uso de los MN como un biomarcador (Countryman y Heddle, 1976).

Desde su desarrollo hasta nuestros días el ensayo de MN ha demostrado ser una buena herramienta para la detección de daño cromosómico. En las técnicas de citogenética clásica, el daño cromosómico es estudiado directamente observando y registrando las aberraciones en

los cromosomas en metafase. Aunque este método constituya el análisis más detallado para evaluar daños estructurales en los cromosomas, es complejo y laborioso, existiendo además factores de confusión y posibles artefactos durante la realización de las preparaciones y análisis de los cromosomas en metafase. Por ello, se ha estimulado la puesta a punto y validación de sistemas más simples. Comparado con el análisis tradicional de CA en metafase, el ensayo de MN es mucho más fácil y rápido y tiene una sensibilidad parecida. Por estas razones, el ensayo de MN *in vitro* es usado actualmente con gran regularidad en la evaluación del daño citogenético (Natarajan *et al.*, 1994; Fenech, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2000, 2003).

En primer lugar se demostró la aplicabilidad del ensayo de MN en linfocitos humanos para medir el daño inducido por la radiación ionizante (Obe y Beek, 1975). El ensayo se siguió usando durante una década para estimar el daño inducido por diversos agentes químicos; no obstante, existían problemas que limitaban el uso de los MN en linfocitos de sangre periférica. Uno de los problemas era que no se conseguía preservar bien el citoplasma celular, lo que permitía que los MN fueran liberados del mismo y no pudiesen contabilizarse en los análisis.

Este problema se resolvió introduciendo cambios en el proceso de choque hipotónico y en la fijación de las células, y así se logró preservar el citoplasma y mantener los MN dentro de la célula donde se originaban (Hogstedt, 1984). Otro problema importante era el hecho de la respuesta variable de los linfocitos ante la PHA, ya que no todos responden al mitógeno, por lo que había dificultades en identificar las células en proliferación de aquellas que no se habían dividido. En las células que hubieran pasado más de una ronda de replicación podrían perderse los MN y esto llevaría a subestimar el daño genético (Evans, 1988). A pesar de estas limitaciones, el ensayo fue usado con bastante éxito tanto *in vitro* (Countryman y Heddle, 1976) como *in vivo* (Aghamohammadi *et al.*, 1984).

La no funcionalidad del ensayo de MN en tratamientos combinados como, por ejemplo, rayos X más cafeína (Natarajan *et al.*, 1982), y los problemas que anteriormente mencionamos, hicieron que varios investigadores dedicaran sus esfuerzos en encontrar soluciones. Así, Pincu *et al.*, (1984) propusieron el uso de la bromodeoxiuridina (BrdU) seguida de fluorescencia y tinción con Giemsa para distinguir entre las células que se habían dividido y las que no. Esta metodología resultó ser poco eficaz ya que en el recuento se incluían células en fase tardía de síntesis o en G₂, es decir, células que aún no habían

experimentado la primera mitosis. Además, también tenía en contra que la BrdU inducía daño por sí misma.

Aunque se propusieron varios métodos basados en la citometría de flujo y en el marcaje del DNA, la solución al problema de la cinética celular y el despegue del ensayo de MN *in vitro* no llegó hasta la técnica propuesta y desarrollada por Fenech y Morley en 1985. Estos autores propusieron el bloqueo de la citocinesis con el uso de la citocalasina-B (Cyt-B); esta droga, aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*, actúa específicamente bloqueando la citocinesis celular ya que impide la polimerización de la actina necesaria para la formación del anillo microfilamentoso requerido para la división del citoplasma celular tras la telofase.

La Cyt-B no afecta los filamentos del uso mitótico, ni afecta el proceso de cariocinesis. Esto hace que sea posible diferenciar las células que no se han dividido de las que lo han hecho una vez, las cuales presentarán un aspecto de células binucleadas, y de las células multinucleadas que han experimentado más de una división (Fenech, 1993, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2000, 2003; OECD, 2004).

Este método nos permite observar una población de células binucleadas, lo que refleja que la división celular ha tenido lugar. La figura 2 muestra células de primera división, en las cuales se puede efectuar un recuento rápido, preciso y confiable de los MN ya que la Cyt-B es capaz virtualmente de detener a todas las células en división en este estado de célula binucleada, permitiendo de esta manera estimar el daño cromosómico.

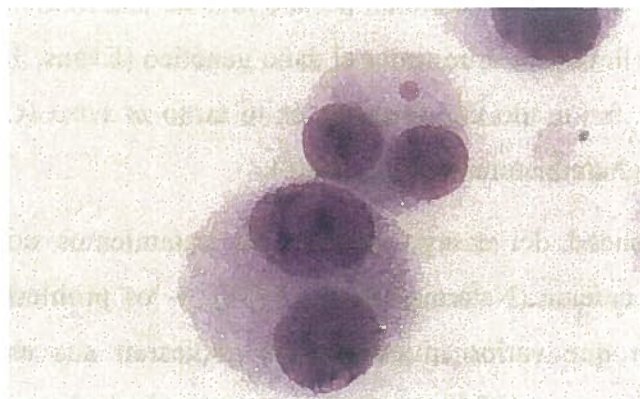


Figura 2: Célula binucleada normal y célula binucleada con un micronúcleo.

Después del desarrollo del ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis (CBMN), han sido muchos los investigadores y laboratorios que han usado esta técnica para determinar el potencial genotóxico de diferentes agentes. La técnica empleando linfocitos humanos se ha consolidado y ha experimentado un creciente uso en cultivos *in vitro* y en la biomonitorización de poblaciones humanas (Sorsa *et al.*, 1988; Surrallés *et al.*, 1995, 1997; Fenech *et al.*, 1997). Este ensayo también ha sido utilizado con éxito en cultivos de líneas celulares establecidas, como las células de ovario de hámster chino (Wakata y Sasaki, 1987; Eastmond y Tucker, 1989). Actualmente existe una gran cantidad de datos que dan soporte a la validación del ensayo de MN *in vitro*, tanto en linfocitos humanos como en diversas líneas celulares. Entre las líneas celulares recomendadas que pueden ser usadas y que ha sido validado su uso en múltiples estudios a nivel internacional, se encuentran las siguientes: CHL/IU, CHO, SHE, V79 y L5178Y (Gibson *et al.*, 1997; Matsushima *et al.*, 1999; von der Hude *et al.*, 2000; Garriott *et al.*, 2002; OECD, 2004).

Llegados a este punto podemos señalar que el ensayo de MN *in vitro* presenta numerosas ventajas con respecto al análisis de cromosomas en metafase. Los MN en células binucleadas pueden ser detectados de forma más objetiva que las aberraciones cromosómicas estructurales en células en metafase y no requieren de un riguroso entrenamiento y de experiencia previa por parte del personal técnico. Además, las preparaciones de MN pueden analizarse más rápidamente y permiten el análisis de miles de células, en lugar de cientos como ocurre en el análisis de metafases, lo que confiere al ensayo de MN un mayor poder estadístico en comparación con el de CA (Fenech, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2003; OECD, 2004).

Podemos afirmar que el ensayo de MN posee unas sólidas bases científicas y un gran poder desde el punto de vista mecanístico ya que permite la detección de agentes clastogénicos y aneugénicos y diferenciar estos dos mecanismos de acción. Debido a su amplia utilización, algunas nuevas propuestas lo han incluido y recomendado como uno de los ensayos de rutina a incorporar en las baterías para evaluar la clastogenicidad y aneugenicidad de los agentes genotóxicos (COM, 2000; Dearfield *et al.*, 2002; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

Las ventajas metodológicas del ensayo de MN, así como la información que brinda sobre el modo de actuar de los compuestos evaluados, constituyen las razones fundamentales por las cuales lo utilizamos en este trabajo.

1.4.2. ENSAYO *IN VITRO* DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMÁTIDAS HERMANAS (SCE)

Los intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) son la manifestación citológica de roturas de doble cadena de DNA y reunión en sitios aparentemente homólogos de las dos cromátidas de un mismo cromosoma (Carrano y Natarajan, 1988). A pesar de que los SCE pueden ser observados experimentalmente con facilidad, no se conoce si transcurren sin producir cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA. Aunque no se conocen con exactitud sus bases moleculares, se piensa que los SCE son consecuencia de errores en la replicación del DNA que suceden a nivel de la horquilla de replicación (Tucker *et al.*, 1993; Tucker y Preston, 1996; Albertini *et al.*, 2000).

La primera observación de SCE fue realizada por McClintock (1938), quien los describió como consecuencia de una transformación entre anillos cromosómicos (revisado en Tucker *et al.*, 1993). En el año 1958 Taylor, usando timidina tritiada como marcador y detección con métodos autoradiográficos, demostró la presencia de SCE. En sus experimentos permitió una primera replicación en presencia de timidina tritiada, con lo que se generaban cromátidas igualmente marcadas, y seguidamente una nueva replicación en ausencia de radioisótopo. Después de este proceso, los cromosomas portaban una cromátida marcada y otra sin marcar (Taylor, 1958). Debido al corto recorrido de las partículas β emitidas por el tritio, la resolución autoradiográfica permitió distinguir entre ambas cromátidas, y los SCE podían ser observados como sitios donde la señal radiactiva pasaba de una cromátida a su hermana. Este método radiactivo ha sido reemplazado por métodos citoquímicos que utilizan la incorporación de un análogo de la timina, la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en las cadenas de DNA de las células, y combina la incorporación de la BrdU y una tinción con colorante fluorescente más el uso de Giemsa (Perry y Wolff, 1974).

Esta metodología permite la diferenciación muy clara de las dos cromátidas de un mismo cromosoma, en función de la cantidad de BrdU incorporada (figura 3), ambas cromátidas muestran un color diferente y la visualización de los SCE se puede detectar con una observación detallada en aquellas células que sean capaces de dividirse en presencia de la BrdU e incorporarla durante dos ciclos celulares y luego ser detenidas en metafase, para una mejor observación de los cromosomas.

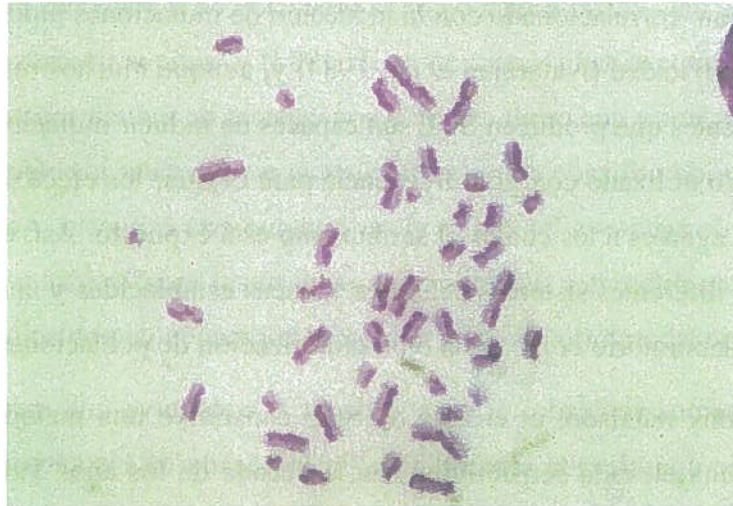


Figura 3: Metafase de segunda división. Se observan las dos cromátidas diferenciadas lo que permite determinar los SCE.

La técnica FPG (fluorescencia más Giemsa), desarrollada por Perry y Wolff, permite la realización de preparaciones permanentes, siendo ésta la metodología más utilizada en la actualidad con pequeñas modificaciones. El procedimiento se basa en el tratamiento de las preparaciones con el colorante fluorescente Hoechst 33258 seguido de exposición a la luz UV durante unas horas o bien a la luz del día por un período más prolongado. A continuación se sumergen los portaobjetos en un baño con soluciones de sales calientes y después se tiñen con Giemsa, con lo que la cromátida monosustituída con BrdU se visualizará con un color oscuro mientras que la bisustituída permanecerá clara. Las razones por las que se produce esta tinción diferencial no son bien conocidas, pero parece que puede estar implicada la degradación preferencial que ocurre en la cromátida que contiene mayor cantidad de BrdU. La metodología ha permitido detectar incrementos en la frecuencia de SCE inducidos por agentes alquilantes como la mitomicina C a concentraciones bastante menores a las necesarias para inducir CA. La introducción de la tinción diferencial incrementó la sensibilidad del ensayo de SCE y su uso para la determinación de la inducción de daño en el DNA.

Desde que se comprobó que la frecuencia de SCE aumentaba significativamente tras la exposición a determinados agentes genotóxicos, este ensayo ha sido muy usado y ha mostrado ser un indicador muy sensible en los estudios de genotoxicidad. Los SCE son inducidos de forma eficiente por un gran número de agentes mutagénicos y carcinogénicos, especialmente por aquellos que forman aductos covalentes con el DNA, por los que interfieren directa o indirectamente con el proceso de la replicación, así como por los agentes inductores de enlaces cruzados (Natarajan *et al.*, 1994; Albertini *et al.*, 2000).

Los SCE se han correlacionado con la inducción de mutaciones puntuales (Carrano *et al.*, 1978) y con citotoxicidad (Natarajan *et al.*, 1984) y, aunque muchos mutágenos inducen SCE, no todos los agentes que producen SCE son capaces de inducir mutaciones puntuales. El ensayo de SCE ha sido utilizado con gran frecuencia para evaluar los efectos citogenéticos de una gran variedad de agentes a los cuales el ser humano está expuesto. Así, el ensayo de SCE se utiliza *in vitro*, en diferentes sistemas celulares y líneas establecidas y en estudios *in vivo*, tanto en animales de laboratorio como en la biomonitorización de poblaciones humanas.

Como ya hemos señalado, el ensayo de SCE constituye una metodología muy bien establecida y posee una elevada sensibilidad. En la década de los años 1990, la evaluación realizada por el *National Toxicology Program* (NTP) de los Estados Unidos sobre cuatro sistemas de ensayo *in vitro* de genotoxicidad de corta duración, demostró que para un grupo de 73 compuestos químicos (44 carcinógenos y 29 no carcinógenos), el ensayo de SCE era el de mayor sensibilidad, siendo capaz de detectar una respuesta positiva para los compuestos carcinógenos evaluados con una sensibilidad del 73%. Un estudio posterior, con un total de 114 compuestos, confirmó los resultados del análisis anterior. En estudios y evaluaciones más recientes por parte del NTP, en donde se analizan un mayor número de sustancias químicas, el ensayo de SCE no ha sido incluido debido a la incorporación de nuevos ensayos *in vitro* de genotoxicidad como el de MN (Kirkland *et al.*, 2005).

A pesar de las ventajas del ensayo de SCE, también ha recibido críticas debido, fundamentalmente, a que no se conoce con exactitud cómo se producen los SCE. Además, a pesar de que una gran mayoría de compuestos genotóxicos y carcinogénicos induzcan SCE en frecuencias elevadas, no se ha establecido claramente la relación directa que pueda existir entre la formación de SCE y la inducción de mutaciones. Por consiguiente, y a pesar de la sensibilidad que tiene la técnica para evidenciar interacciones con el DNA y posibles efectos genotóxicos, el nivel de SCE suele ser una medida de efectos citotóxicos y/o genotóxicos pero, a diferencia de las CA, los SCE no tienen porque implicar un efecto mutagénico. Además, no se conocen claramente las implicaciones biológicas que tienen los SCE para las células (aparentemente ninguna), por lo que es difícil extrapolar sus efectos adversos para la salud humana. Por todo esto, en la actualidad se recomienda que el ensayo de SCE se utilice como un biomarcador de exposición (Tucker y Preston, 1996), más que como un biomarcador de efecto. De todos modos, y a pesar de estas limitaciones, el ensayo de SCE sigue siendo utilizado en la evaluación del riesgo genotóxico que representan los diferentes agentes ambientales a los cuales el ser humano puede estar expuesto y se incluye en bastantes estudios de biomonitorización de poblaciones humanas para evaluar el riesgo de diversos tipos de

exposición: ambiental, laboral y terapéutica (Aksoy *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2005; Cebulska-Wasilewska *et al.*, 2005; Duydu *et al.*, 2005).

El ensayo de SCE se considera, además, como uno de los posibles ensayos que pueden ser usados *in vivo* para obtener datos adicionales en la evaluación genotóxica de compuestos químicos. Por otra parte, el desarrollo del ensayo de SCE *in vivo* está indicado para determinar si los resultados de la evaluación genotóxica de un compuesto que produce resultados positivos *in vitro* y resultados negativos en el ensayo de micronúcleos en médula ósea de roedores son relevantes para la estimación del potencial mutagénico del compuesto. Asimismo, el ensayo de SCE *in vivo* utilizando células de testículo es recomendado para determinar riesgo de daño genético a nivel de células germinales (COM, 2000; Déarfild *et al.*, 2002).

Lo anteriormente expuesto justifica que el ensayo de SCE, tanto *in vitro* como *in vivo*, continúe siendo una metodología para la evaluación del potencial genotóxico. Por todo ello, y unido a la experiencia del Grupo de Mutagénesis de la UAB en el empleo del ensayo de SCE, se ha optado por su utilización en el presente trabajo.

1.4.3. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS *IN VIVO*

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, el ensayo de MN combina simplicidad, sensibilidad y capacidad de detección, tanto de agentes clastogénicos como aneugénicos. El avance definitivo para que el ensayo de MN se utilizase para evaluar la genotoxicidad se produce en el año 1970, cuando se propone por primera vez el término de ensayo de MN (Boller y Schmid, 1970). Pero no fue hasta el año 1975 cuando se desarrolló la técnica del ensayo de MN *in vivo*, usando eritrocitos de médula ósea de roedores (Schmid, 1975).

Aunque el ensayo puede desarrollarse en una gran variedad de organismos, lo más habitual es llevarlo a cabo usando ratas o ratones y estudiando los micronúcleos en eritrocitos inmaduros, tanto de médula ósea como de sangre periférica (Hayashi *et al.*, 1994; OECD, 1997).

Los MN pueden formarse y encontrarse en numerosos tipos celulares de los que se originan en la médula ósea de los mamíferos. En muchos de estos tipos celulares, debido a que poseen poco citoplasma celular, resulta tediosa, difícil y poco fiable la determinación de micronúcleos. Por ello, los eritrocitos constituyen las células ideales para el ensayo de micronúcleos; entre otras características, la idoneidad viene dada por el hecho de que provienen de células precursoras que desarrollan una serie de procesos de división celular. Además, otra

característica única de estas células es que, una vez que se ha completado la diferenciación celular y se obtiene un eritrocito diferenciado, el núcleo celular es expulsado y los eritrocitos constituyen el único tipo celular de los mamíferos que no posee núcleo. Por lo tanto, si se ha producido un daño citogenético en las células madres precursoras y se origina la formación de micronúcleos como consecuencia del daño, los micronúcleos que permanecen en la células después de la expulsión del núcleo principal pueden observarse y distinguirse fácilmente al realizar un análisis microscópico de las preparaciones.

El ensayo de micronúcleos ha sido ampliamente usado para medir la genotoxicidad, tanto *in vitro* como *in vivo*. La evaluación de la frecuencia de micronúcleos *in vivo* es un ensayo primario en la batería de estudios de genotoxicidad y es recomendado por las distintas agencias reguladoras para ser utilizado en la evaluación de la seguridad de cualquier producto. El ensayo de micronúcleos *in vivo* es especialmente relevante para estimar el riesgo de genotoxicidad, ya que permite la consideración de factores del metabolismo, procesos farmacocinéticos y de reparación del DNA. Asimismo, es útil para ampliar la investigación sobre efectos mutagénicos que se hayan detectado en ensayos *in vitro*.

En los roedores adultos, la médula ósea es un órgano hematopoyético en el que las células madres forman la base del proceso de eritropoyesis con etapas de proliferación y maduración. Durante la proliferación las células siguen dividiéndose. Un agente de ensayo determinado, administrado en este momento, puede actuar causando daños cromosómicos, como roturas e intercambios, y puede actuar también sobre macromoléculas implicadas en la disyunción de las cromátidas (p. ej., disfunción en el huso mitótico), dependiendo del mecanismo de acción. Estas anomalías (un fragmento acéntrico o un cromosoma entero) pueden permanecer en la célula durante la división y no llegar a integrarse en el núcleo hijo pero, ocasionalmente, pueden llegar a formar MN que se observan en el citoplasma.

Durante la maduración, cuando un eritroblasto se transforma en un eritrocito policromático (EPC), el núcleo principal es expulsado y los micronúcleos que se hayan formado pueden permanecer en el citoplasma enucleado. Un incremento en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNEPC) en los animales tratados indica que se ha producido un daño cromosómico (Schmid, 1975; Hayashi *et al.*, 1994; Salamone y Mavournin, 1994; Krishna y Hayashi, 2000).

Los eritrocitos policromáticos (eritrocitos jóvenes) todavía contienen RNA. Son basofílicos y se tiñen de azul claro o gris con Giemsa. Los EPC pierden RNA con el tiempo, contienen principalmente hemoglobina y se transforman en eritrocitos normocromáticos

(eritrocitos maduros, glóbulos rojos), algo más pequeños que los EPC. Éstos son acidofílicos y se tiñen de naranja claro o rosa anaranjado con Giemsa. Estos dos tipos de eritrocitos, teñidos de color diferente, pueden observarse en la médula ósea y los compartimentos sanguíneos. Los micronúcleos se visualizan fácilmente gracias a que estas células carecen de núcleo principal. Como se ha indicado anteriormente, un aumento en la frecuencia de MNEPC indica que se ha producido daño cromosómico.

1.4.4. ENSAYO *IN VITRO* DE ELECTROFORESIS EN CÉLULAS AISLADAS

El daño en la molécula de DNA puede expresarse de diferentes formas como, por ejemplo, roturas de cadena doble o de cadena sencilla. Rydberg y Johanson (1978) cuantificaron el daño en el DNA en células individuales aplicando una técnica novedosa: incluyeron linfocitos humanos aislados en agarosa y formaron microgeles sobre portaobjetos. Después realizaron una lisis bajo condiciones alcalinas suaves, con lo que se produce el desenrollamiento de las cadenas de la molécula de DNA. Después de su neutralización, tiñeron las células con naranja de acridina y cuantificaron la extensión del daño midiendo la proporción de fluorescencia verde (indicativa de DNA de doble cadena) respecto a la fluorescencia roja (que indica DNA de cadena sencilla).

En 1984 Ostling y Johanson añadieron un nuevo paso a la técnica anteriormente desarrollada. Consistió en que, después de la lisis celular, se llevaba a cabo una electroforesis del material nuclear contenido en los microgeles y después de tinción con bromuro de etidio se observaba que parte del DNA se había dirigido en dirección al ánodo. Ostling y Johanson sugirieron que la relajación del DNA causada por las roturas de cadena sencilla permitía su movimiento alejándose del centro del núcleo. A pesar de estos cambios, la técnica presentaba desventajas en cuanto a la correcta cuantificación del DNA migrado y a la sensibilidad (Ostling y Johanson, 1984).

En el año 1988, Singh y colaboradores desarrollaron la técnica de electroforesis en células aisladas comúnmente conocida como ensayo del cometa, utilizando linfocitos aislados. El procedimiento de Ostling y Johanson fue modificado por la realización de la electroforesis a pH alcalino, que facilita la desnaturalización, el desenrollamiento y la expresión de las roturas de cadena sencilla, y las roturas generadas a partir de los sitios alcalilábiles. Para la tinción se utilizó bromuro de etidio y se observó mayor extensión del DNA desde el núcleo hacia el ánodo cuanto mayor era el daño inducido. Con este método se pudo

detectar daño en el DNA aplicando dosis bajas de radiación con rayos X (Singh *et al.*, 1988; Singh, 2000).

A pesar de las mejoras metodológicas en el ensayo del cometa, seguían existiendo problemas sobre todo en cuanto a la sensibilidad del método. Para mejorarla, Singh y sus colaboradores fueron introduciendo varias modificaciones como, por ejemplo, emplearon proteinasa-K después de la lisis celular, añadieron antioxidantes a la solución alcalina de la electroforesis y utilizaron nuevos colorantes fluorescentes. Estos cambios mejoraron la sensibilidad del método y lograron detectar el daño inducido en el DNA a dosis tan bajas como 5 rad de rayos X (Singh *et al.*, 1994).

El principal inconveniente que seguía apareciendo en el método era debido a las variaciones que se producían en la migración del DNA entre las diferentes preparaciones de un mismo experimento, a causa de la acumulación de sales en el cátodo de las fuentes de electroforesis, lo cual provocaba una distribución desigual de la corriente aplicada. Además, otro inconveniente del ensayo era que, por problemas de artefactos en las preparaciones, se dificultaba la detección del DNA mediante los sistemas de análisis de imagen que se utilizaban. Entre 1995 y 1999, Singh y sus colaboradores fueron perfeccionando el método (Singh *et al.*, 1995; Singh, 1998; Singh *et al.*, 1999).

En la figura 4 se muestra una imagen típica de las células en un experimento del ensayo del cometa, pudiéndose observar la región del núcleo con el DNA intacto y la región correspondiente a la cola, que está formada por los fragmentos de DNA que han migrado en la dirección de la corriente aplicada durante la electroforesis.

Las distintas técnicas descritas para detectar roturas en el DNA han sido muy utilizadas para evaluar los efectos genotóxicos de agentes físicos y químicos en diferentes sistemas celulares.

Las roturas de cadena simple del DNA y los sitios álcali-lábiles son lesiones fáciles de detectar y constituyen las lesiones más abundantes cuando se induce daño en el material genético. Además, constituyen lesiones del DNA que pueden ser relevantes para la salud ya que se han relacionado con procesos de mutagénesis, teratogénesis, envejecimiento y muerte celular. Muchos agentes físicos y químicos producen roturas de simple y doble cadena, daño oxidativo y sitios álcali-lábiles, daños que pueden ser detectados aplicando el ensayo de electroforesis en células aisladas (Chicca *et al.*, 1996; Ames, 1998; Vogel *et al.*, 1999; Singh, 2000).

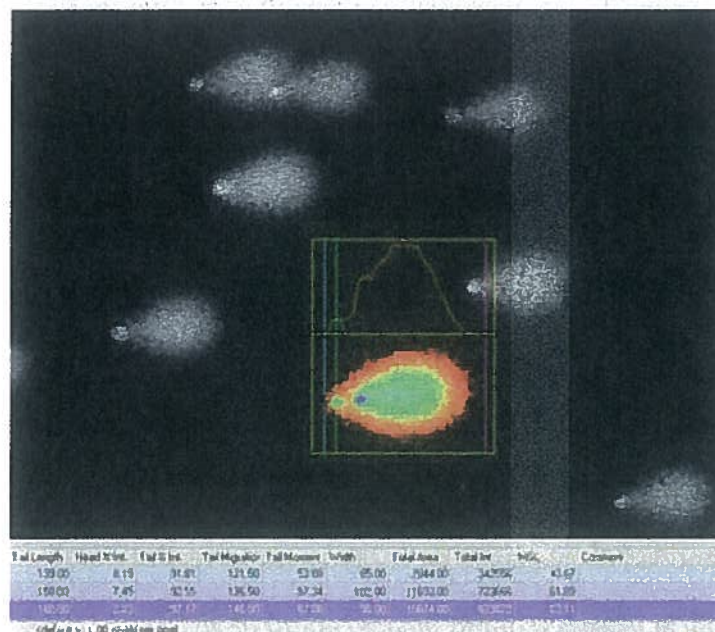


Figura 4: Imagen típica de las células en un experimento del ensayo del cometa. Registro de datos durante el análisis de las preparaciones.

El ensayo del cometa se ha convertido en los últimos años en uno de los más usados en el campo de la Toxicología Genética debido a la variedad de aplicaciones que permite. Al compararlo con otras técnicas para detectar roturas de simple cadena, el ensayo del cometa presenta mayor sensibilidad, tal como se refleja en la tabla 4 (tomada de Singh, 2000).

Tabla 4: Sensibilidad de diferentes técnicas para detectar roturas de simple cadena en el DNA

Ensayo	Límite inferior de detección de roturas de simple cadena/Daltons de DNA	Dosis de rayos X (rad) ^a
Sedimentación alcalina	1 rotura/(2-5) x 10 ⁸	500
Sedimentación nuclear	1 rotura/2 x 10 ⁹	33
Elución alcalina	1 rotura/(2-3) x 10 ⁹	30
Electroforesis alcalina en gel	1 rotura/3 x 10 ⁹	30
Desenrollamiento alcalino	1 rotura/(6-9) x 10 ⁹	10
Electroforesis alcalina en microgeles (ensayo del cometa)	1 rotura/2 x 10 ¹⁰	3,2

^aDosis mínima de radiación (rayos X) necesaria para producir niveles detectables de daño en el DNA.

Estas ventajas han hecho que, desde su introducción como ensayo de genotoxicidad en el año 1988, el ensayo de electroforesis en células aisladas en su versión alcalina (pH >13) haya sido utilizado por un gran número de investigadores y que su utilización haya crecido

exponencialmente. En resumen, las principales ventajas del ensayo del cometa son las siguientes:

- Sensibilidad para detectar bajos niveles de daño en el DNA.
- Aporta información del daño en el DNA en células individuales.
- Ensayo de fácil realización aplicable, en principio, a cualquier célula que pueda ser aislada.
- Permite la evaluación del daño en el DNA en células que no están en proliferación.
- Rápido de realizar y con un coste económico relativamente bajo.
- Requiere de poca cantidad de sustancia de ensayo para su realización.
- Posibilidad de aplicar el ensayo tanto *in vitro* como *in vivo*.

Todo ello ha hecho que durante la última década este ensayo se haya convertido en una herramienta muy útil para investigadores de diversas áreas que abarcan desde el estudio de la cinética de reparación del DNA hasta la biomonitorización de poblaciones humanas expuestas a contaminantes ambientales.

El ensayo de electroforesis en células aisladas en su versión alcalina (pH >13) puede detectar no sólo roturas de simple y doble cadena del DNA, sino también daño oxidativo, sitios álcali-lábiles, enlaces cruzados DNA-DNA y DNA-proteínas, así como roturas de simple cadena asociadas a sitios de reparación por escisión incompleta.

A pesar de que en la actualidad aún no se cuente con un protocolo estándar para la técnica, cada vez más es aceptado como integrante de los ensayos de evaluación mutagénica por parte de las agencias reguladoras a nivel mundial. Fruto de los estudios de validación internacional que se desarrollan para homogeneizar la metodología y desarrollar las directrices para el desarrollo del mismo, el ensayo del cometa podría ser, en un futuro muy próximo, uno de los ensayos recomendados y requeridos dentro de la batería de pruebas de genotoxicidad para la evaluación de los productos químicos. De hecho, algunas estrategias recientes para la evaluación del riesgo genotóxico recomiendan el ensayo del cometa, tanto *in vitro* como *in vivo*, para obtener información definitiva sobre el posible riesgo genotóxico de los productos evaluados, sobre todo en el caso de moléculas de interés farmacéutico o productos a los cuales el ser humano se encuentra expuesto (Sasaki *et al.*, 1999; COM, 2000; Singh, 2000; Tice *et al.*, 2000; Dearfield *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005).

Considerando todas las razones antes expuestas, nos planteamos incluir y desarrollar el ensayo de electroforesis en células aisladas en su versión alcalina (pH >13) con el fin de obtener una mayor información sobre los posibles efectos genotóxicos de los productos evaluados en nuestro trabajo de tesis.

1.5. NITROFURANOS

Esta serie de compuestos químicos es conocida desde hace muchos años dada su actividad antimicrobiana que fue puesta de manifiesto por primera vez en los años 1940 como resultado de pruebas microbiológicas que se realizaron en los Estados Unidos y Alemania. Estos primeros indicios de actividad biológica motivaron que varias compañías farmacéuticas empezaran a producir una gran cantidad y variedad de nitrofuranos.

Dadas sus propiedades, varios nitrofuranos se han introducido en la práctica clínica. Así, hace alrededor de unos 30 años, cuatro de estos compuestos estaban disponibles en el Reino Unido (nitrofurantoína, nitrofurazona, nifuratel y furazolidona). Sin embargo, actualmente sólo la nitrofurantoína permanece en uso para el tratamiento y prevención de infecciones del tracto urinario. Sin embargo, estos y otros nitrofuranos tales como la nifuroxima, el nifurtoinol, el nitrovin y el nifurtimox son usados en diferentes países. El declive en el uso de los nitrofuranos se debe, fundamentalmente, a la falta de interés por los mismos a causa de la gran cantidad de nuevos compuestos con nuevas propiedades que se han sintetizando, más que a problemas debidos a fallos o falta de eficacia en los tratamientos o a efectos adversos importantes (Hamilton-Miller, 1997; Brumfitt y Hamilton-Miller, 1998; Guay, 2001; Karlowsky *et al.*, 2002; Polatti *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2003).

Los nitrofuranos antimicrobianos son derivados químicos del 5-nitro-2-furaldehído, comúnmente llamado furfural, (figura 5). Todos mantienen en su estructura el grupo nitro (NO₂) en posición 5 del anillo furánico, lo cual se considera necesario para la actividad biológica. Además, un gran número de sustituciones pueden ser introducidas sobre el grupo aldehído de la posición 2. En función de las sustituciones químicas posibles, se puede generar un gran número de compuestos diferentes, con distinto grado de actividad biológica, farmacocinética y toxicológica.

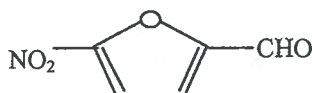


Figura 5: Estructura química del 5-nitro-2-furaldehído (furfural).

Los derivados del 2-furiletileno que han sido evaluados en nuestro trabajo son derivados obtenidos por síntesis química a partir del furfural. Pero la característica química fundamental que los distingue es el hecho de que el grupo nitro no se encuentra como sustituyente directo en el anillo furánico. El grupo nitro en todos los derivados estudiados en esta tesis doctoral se encuentra como sustituyente en el carbono β del doble enlace exocíclico de la cadena etilénica lateral, que se encuentra en posición dos del anillo furánico.

Los 5-nitrofuranos clásicos y los derivados 2-furiletilénicos estudiados son, por tanto, isómeros de posición con respecto al grupo nitro que ambos poseen. La característica química fundamental que los diferencia es la diferente posición del grupo nitro, lo que implica que ambos grupos de compuestos presenten diferencias importantes en su comportamiento químico, biológico y toxicológico.

1.5.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS NITROFURANOS

Los nitrofuranos presentan una gran actividad y un amplio espectro antimicrobiano. Estos compuestos han mostrado actividad *in vitro* contra un amplio número de microorganismos, entre ellos podemos citar algunos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridia*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Bacteroides spp.* y *Neisseria spp.* La tabla 5 muestra tres de los nitrofuranos más ampliamente usados y su actividad frente a diferentes cepas de microorganismos.

Además de los fármacos mostrados en la tabla 5, hay otra serie de nitrofuranos que se usan en la actualidad y que también poseen actividad biológica, a veces superior; sin embargo, hay que señalar que la actividad varía para cada grupo dependiendo de la cepa de microorganismo, de las condiciones donde actúan, etc. Se ha visto que algunos microorganismos, que producen cambios en el pH del medio donde crecen, disminuyen la efectividad de algunos nitrofuranos, sobre todo de aquellos que basan su actividad en que se genere una forma ionizada del producto; en otros casos, los cambios de pH no influyen en la actividad antimicrobiana (Hamilton-Miller, 1997).

Tabla 5: Actividad de 3 nitrofuranos frente a bacterias patógenas comunes (Mínima concentración inhibitoria: mg/mL)

Cepas	Furazolidona	Nitrofurazona	Nitrofurantoína
<i>S. aureus</i>	2 – 8	8 – 16	4 – 32
<i>S. pyogenes</i>	4 – 8	8 – 64	4 – 16
<i>E. faecalis</i>	8 – 32	32 – 128	4 – 128
<i>N. gonorrhoeae</i>	---	0,1 – 8	0,25 – 2
<i>E. coli</i>	<0,5 – 4	4 – 16	0,5 – R
<i>Proteus spp.</i>	32 – 128	8 – 128	8 – R
<i>Klebsiella</i>	2 – 8	8 – 128	32 – R
<i>Salmonella</i>	0,25 – 2	4 – 16	4 – 128
<i>Shigella</i>	0,25 – 4	4 – 32	4 – 128
<i>B. fragilis</i>	8 – 16	4 – 32	8 – 16

Nota: R significa resistencia de algunos microorganismos a determinadas concentraciones de los nitrofuranos.

A pesar de que existe un gran número de compuestos con actividad antimicrobiana pertenecientes a diversos grupos de antibióticos: β -lactámicos, ciclosporinas, quinolonas, nitroimidazoles, etc, de los cuales se siguen sintetizando y desarrollando nuevos derivados, en la actualidad se continúan utilizando los antibacterianos del grupo de los 5-nitrofuranos, preferentemente en el tratamiento de infecciones urinarias (Guay, 2001; Pires *et al.*, 2001; Karlowsky *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2003). Los procesos infecciosos constituyen un elevado porcentaje de las visitas médicas y entre las más comunes están las infecciones urinarias. Se calcula a escala mundial que se producen alrededor de unas 150 millones de infecciones urinarias anualmente (Karlowsky *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2003). Los datos publicados nos permiten asegurar que anualmente se prescriben en todo el mundo una gran cantidad de tratamientos con productos antibacterianos, lo cual ha tenido como una de sus principales consecuencias negativas el desarrollo y el incremento de la resistencia de los microorganismos a los productos antibacterianos.

En el caso de las infecciones del tracto urinario, entre un 75% y un 90% de las veces son debidas a *E. coli*, y el resto a otras especies de microorganismos. En estudios de vigilancia microbiológica llevados a cabo en varios países se ha observado que, frente a los tratamientos comunes para las infecciones del tracto urinario y en su profilaxis, cada vez es más frecuente encontrar cepas bacterianas resistentes. Por este motivo, hay un creciente esfuerzo para lograr tratamientos más eficaces y se proponen cambios en la indicación de tratamientos primarios alternativos a los que se han venido utilizando hasta ahora (Zhanel *et al.*, 2000; Sahn *et al.*, 2001; Karlowsky *et al.*, 2002).

Un hecho interesante a señalar en el tratamiento de estas infecciones urinarias es el uso de un antibiótico del grupo de los nitrofuranos, concretamente la nitrofurantoína. Este producto se ha usado desde hace más de 40 años en muchos países y en la actualidad se continúa empleando y tanto la eficacia, la tolerabilidad del tratamiento y la baja resistencia de los microorganismos frente al compuesto son evidentes. Así pues, la nitrofurantoína y este grupo de antibacterianos se comportan de un modo inusual con relación a la aparición de resistencia microbiana y se consideran quizá únicos en relación a este aspecto (Brumfitt y Hamilton-Miller, 1998; Guay, 2001; Karlowsky *et al.*, 2002). En las tablas que se muestran a continuación, que han sido extraídas de publicaciones recientes, se puede observar de manera evidente todo lo expuesto sobre la eficacia de la nitrofurantoína y la poca resistencia bacteriana frente a la misma, que es el nitrofurano más usado en distintos países.

Tabla 6: Sensitivity to various antibiotics of infecting organisms isolated at Royal Free Hospital Clinic, United Kindom, 1985-1992

Species (n)	Percent resistant isolates				
	ampicillin	cefaclor	sulphamethoxazole	nitrofurantoin	trimethoprim
E. coli (527)	41	6	44	4	24
Enterococci (85)	0	100	100	1	11
K. pneumoniae (69)	100	9	26	1	23
P. mirabilis (35)	3	11	33	100	1
S. epidermidis (15)	6	3	10	0	30
Total (731)	39	18	48	8	22

(Brumfitt and Hamilton-Miller, 1998).

Dentro del grupo de compuestos 2-furiletílicos que nosotros hemos venido estudiando, y que presentan similitud en la estructura química con los nitrofuranos clásicos, existen varios derivados que poseen una actividad antibacteriana y antifúngica muy potente (Blondeau *et al.*, 1999, Estrada y Molina, 2001; Fernández-Torres *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2004; Marrero-Ponce *et al.*, 2004, 2005). En estudios *in vitro* con algunos de estos derivados se ha comprobado que, además de la eficacia frente a diversos microorganismos, también se observa que algunas cepas de bacterias patógenas, tanto cepas de referencia como cepas de aislamiento clínico, no son capaces de desarrollar resistencia (Medina *et al.*, 2000). Un ejemplo de ello lo constituye el derivado G-1, cuya eficacia frente a diversos microorganismos se refleja en las siguientes tablas extraídas de una publicación reciente (Blondeau *et al.*, 1999).

Tabla 7: Antimicrobial susceptibilities of *E. coli* urinary isolates from female outpatients in the United States from 1995 to 2001

Antimicrobial and year ^a	% of isolates		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Ampicillin			
1995	63.1	0.5	36.4
1996	62.5	0.6	36.9
1997	63.2	0.8	36.0
1998	62.3	0.7	37.0
1999	61.8	0.8	37.4
2000	62.7	0.6	36.7
2001	62.1	0.9	37.0
Ciprofloxacin			
1995	99.2	0.1	0.7
1996	99.3	0	0.7
1997	99.1	0	0.9
1998	98.8	0	1.2
1999	98.3	0	1.7
2000	97.8	0	2.2
2001	97.4	0.1	2.5
Nitrofurantoin			
1995	99.1	0.5	0.4
1996	98.8	0.5	0.8
1997	98.9	0.5	0.6
1998	98.8	0.6	0.6
1999	98.7	0.7	0.6
2000	98.7	0.7	0.6
2001	98.3	1.0	0.7
Trimethoprim-Sulfamethoxazole			
1995	85.2	0	14.8
1996	83.7	0	16.3
1997	84.0	0	16.0
1998	83.0	0	17.0
1999	83.1	0.1	16.8
2000	83.4	0.1	16.5
2001	83.8	0.1	16.1

^a 1,653 isolates were tested in 1995; 10,937 isolates were tested in 1996; 22,748 isolates were tested in 1997; 45,509 isolates were tested in 1998; 64,815 isolates were tested in 1999; 82,460 isolates were tested in 2000; 58,065 isolates were tested in 2001 (Karlowsky *et al.*, 2002).

Table 8:
In vitro activity of G1 against 1609 Gram-negative and 879 Gram-positive microorganisms

Microorganism	n	MIC (mg/l)		
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range
<i>Gram-negative</i>				
<i>Escherichia coli</i>	222	16	16	4-32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	73	16	32	8-32
<i>Moraxella catarrhalis</i>	87	1	2	0.5-4
<i>Proteus mirabilis</i>	46	4	16	4-16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1084	2	4	0.5-16
<i>Serratia marcescens</i>	21	16	32	4-32
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	7	8	8	8
Other	69	16	32	≤ 0.5-32
<i>Gram-positive</i>				
Listeria	1	32	32	32
<i>Enterococcus</i> sp.	68	16	16	2-32
<i>Staphylococcus aureus</i>	198	8	16	4-32
Staphylococci coag-neg.	51	16	32	4-32
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	307	32	32	8-64
<i>Streptococcus pyogenes</i>	241	4	4	0.25-16
Other Streptococci	13	4	8	4-8

Table 9:
In vitro activity of G1 against 30 anaerobic microorganisms^a

Microorganism	n	MIC (mg/ml)		
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range
<i>B. fragilis</i>	6	1	2	0.5-16
<i>P. acnes</i>	12	1	4	1-4
<i>Propionibacterium</i> sp.	3	1	1	0.5-1
<i>C. perfringens</i>	2	0.5	2	0.5-1
Total	23			

^a Other single strains [7]: *B. vulgatus*, 0.5; *B. ureolyticus*, 8; *P. magnus*, 0.5; *P. multocida*, 1; *Peptostreptococcus* sp., 4; pigmented Bacteroides, 1; *Acinetobacillus* sp., 16.

Table 10:
In vitro activity of G1 against 154 yeast isolates and 30 dermatophyte microorganisms^a

Microorganism	n	MIC (mg/l)		
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range
<i>Yeast</i>				
<i>C. albicans</i>	138	2	2	1-4
Non-albicans yeasts	16	2	2	2-4
<i>Dermatophytes</i>				
<i>Trichophyton rubrum</i>	14	4	4	1-4
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	14	2	4	1-4

^a MIC of single isolates *Microsporon canis*, 2; and *Epidermophyton floccosum*, 0.5.

Table 11:
In vitro activity of G1 against selected species (from Cuba) (see text for explanation of MIC_{50/90})^a

Microorganism	n	MIC (mg/l)	
		MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>Gram-negative</i>			
<i>Enterobacter</i> sp.	33	5.4	18.0
<i>E. coli</i>	44	7.4	15.0
<i>Klebsiella</i> sp.	76	11.5	21.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	492	8.2	15.8
<i>Gram-positive</i>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	48	5.2	12.0
<i>Yeast</i>			
<i>C. albicans</i>	31	1.2	2.9
<i>Dermatophytes</i>			
<i>Aspergillus</i> sp.	11	16.2	48.3
<i>Microsporum canis</i>	8	7.9	20.8
<i>Trichophyton rubrum</i>	14	13.8	40.6
<i>Filamentous fungi</i>			
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	—	—
<i>Fusarium</i> sp.	2	—	—
<i>Microsporum gypseum</i>	1	—	—
<i>Trichophyton rubrum</i>	3	17.7	40.6

^a Other strains tested in Cuba gave the following MIC₅₀ values: *Pasteurella haemolytica* (15) 3.7; *Pasteurella multocida* (16) 3.6; *Serratia* (15) 10.2; *Listeria monocytogenes* (2) 3.1; *Corynebacterium* sp. (13); *Candida parapsilosis* (5) 1.8; and *C. tropicalis* (2) 0.8 mg/ml.

Todo lo anteriormente planteado, junto con los resultados de nuestros estudios que indican que los compuestos 2-furiletilénicos son productos con menor actividad genotóxica, hace que constituyan un grupo de nuevos productos químicos con un gran potencial de aplicación en medicina humana.

1.5.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS NITROFURANOS

El mecanismo de acción de los nitrofuranos es complejo y no está completamente aclarado, a pesar de que varios nitrofuranos se vienen usando desde hace varias décadas en diferentes países (Bandow *et al.*, 2003). Los nitrofuranos son convertidos, dentro de la célula bacteriana y por enzimas nitroreductasas, en intermediarios altamente reactivos, algunos de los cuales tienen una vida muy corta. Además, en su metabolización se generan radicales superóxido.

La figura 6 muestra el proceso general de nitroreducción descrito anteriormente.

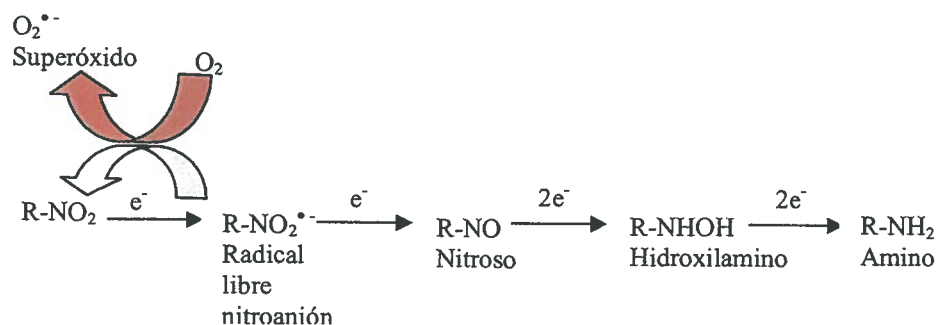


Figura 6: Esquema general de la reducción de los nitrofuranos, produciendo intermediarios biológicamente activos.

Por lo tanto, el proceso de nitroreducción parece ser el mecanismo fundamental por el cual estos compuestos llevan a cabo su actividad; así, el grupo nitro es reducido hasta un grupo amino, produciéndose durante este proceso diferentes intermediarios con actividad biológica que tienen acción antibacteriana. Las vías por las cuales estos intermediarios llevan a cabo la inhibición del crecimiento bacteriano y la actividad antibacteriana no han sido completamente esclarecidas, habiéndose propuesto diferentes mecanismos de acción. Incluso parece ser que los nitrofuranos sin reducir también pueden ejercer una actividad antimicrobiana significativa. Sus productos de reducción se unen de forma inespecífica a las proteínas de los ribosomas de las bacterias, deteniendo el proceso de síntesis proteica. A concentraciones cercanas a la mínima concentración inhibitoria, la nitrofurantoína, por ejemplo, puede interrumpir las interacciones codón-anticodón y así interrumpir la traducción del mRNA (McOsker y Fitzpatrick, 1994; Hamilton-Miller, 1997; Guay, 2001; Sisson *et al.*, 2002).

Investigaciones recientes han demostrado que diferentes enzimas nitroreductasas intervienen en el proceso metabólico de nitroreducción de los nitrofuranos. Las tres enzimas fundamentales que intervienen son: la piruvato óxidoreductasa (POR) y dos nitroreductasas

insensibles al oxígeno denominadas RdxA y FrxA. De estas dos, la enzima FrxA es la que presenta una mayor actividad y afinidad por los nitrofuranos como sustrato de reacción.

Estas y otras nitroreductasas están presentes en diversos microorganismos, constituyendo uno de los motivos por lo que los nitrofuranos son activos contra diversas especies de microorganismos. Resulta un hecho destacable que en varios microorganismos la enzima POR sea una enzima esencial que interviene en múltiples procesos bioenergéticos. Aunque algunos microorganismos sufren mutaciones como parte del proceso para crear resistencia, se ha demostrado en cepas resistentes a diversos fármacos que algunas nitroreductasas disminuyen o anulan totalmente su actividad, pero se mantiene la actividad de la enzima POR al ser una enzima fundamental. Esta podría ser una de las explicaciones a la baja resistencia desarrollada frente a los nitrofuranos. Este hecho se ha comprobado en cepas resistentes a otros nitrocompuestos, como es el caso del metronidazol, donde mutantes nulos para los genes que codifican las enzimas RdxA y FrxA y que son resistentes al metronidazol, son susceptibles a los nitrofuranos porque mantienen una considerable actividad nitroreductasa por medio de la enzima POR (Sisson *et al.*, 2002).

Otro estudio reciente ha demostrado, a través de técnicas basadas en la proteómica y la expresión de proteínas para determinar el mecanismo de acción de diversos antibióticos, un aspecto novedoso e interesante del mecanismo de acción de los nitrofuranos, en especial de la nitrofurantoína. Incluso se plantea que puede ser el mecanismo de acción principal para inhibir la síntesis de proteínas y por el cual ejercen su acción antimicrobiana. Se demostró que la nitrofurantoína induce un perfil de expresión de proteínas muy similar a otro antibiótico que produce daño oxidativo. La nitrofurantoína induce la formación de enlaces disulfídicos (S-S) en los centros catalíticos de varias enzimas y provoca cambios conformacionales y estructurales en estos centros afectando así a diversos procesos metabólicos y produciendo la inhibición total de la síntesis proteica y la inhibición de varias enzimas que intervienen en procesos fundamentales como son la síntesis de DNA, RNA y el metabolismo de carbohidratos. Este nuevo mecanismo de acción a través de la formación de enlaces disulfídicos (S-S) ha sido propuesto como el principal mecanismo de acción por el que ejercen su actividad los nitrofuranos y explica porque hay tan poco desarrollo de resistencia en los microorganismos y porque los nitrofuranos logran su actividad a través de la inhibición de múltiples procesos metabólicos en distintos microorganismos (Bandow *et al.*, 2003).

Entre los procesos a través de los cuales los nitrofuranos ejercen su acción antimicrobiana, se encuentran:

- Inhibición de la síntesis de enzimas inducibles que intervienen en la síntesis de DNA y de RNA.
- Inhibición de la formación de la acetil coenzima A (CoA) y de procesos bioenergéticos.
- Inhibición de enzimas relacionadas con la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico y de enzimas que participan en el metabolismo de los carbohidratos.
- Daño en el DNA.
- Inducción de enlaces disulfídicos (S-S) y cambios estructurales en el centro catalítico de diversas enzimas.

Por todo lo anteriormente planteado acerca de los mecanismos de acción de los nitrofuranos y la baja resistencia desarrollada por los microorganismos frente a estos compuestos, resulta muy interesante el desarrollo de nuevas moléculas que presenten estas ventajas y que, a su vez, sean más seguras y menos genotóxicas que los nitrofuranos. De ahí la importancia de la evaluación de la genotoxicidad de los derivados 2-furiletílicos objeto de estudio, los cuales pueden llevar a un futuro desarrollo de fármacos más eficaces y seguros.

1.5.3. RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN DERIVADOS 2-FURILETILÉNICOS. PAPEL DEL GRUPO NITRO

Varios derivados 5-nitrofuranos 2-sustituídos son considerados como potentes agentes mutagénicos y carcinogénicos (McCalla, 1983). En todos estos casos se ha asumido que la presencia del núcleo estructural 5-nitrofurano es responsable de las actividades mutagénicas y carcinogénicas de estos compuestos. Entre ellos cabe citar los compuestos pertenecientes al grupo de los 5-nitro-2-furiletílicos, que son el grupo de compuestos con mayor actividad mutagénica (Sturdik *et al.*, 1985).

Debido a esta actividad mutagénica, estos derivados vieron limitado su uso a pesar de que muchos mostraban una actividad antimicrobiana importante. El hecho de que el grupo nitro (NO₂), responsable de la actividad antimicrobiana, fuera también el responsable principal de sus propiedades mutagénicas, hizo que se perdiera el interés por los mismos.

Estudios posteriores sobre el mecanismo de acción antimicrobiana de los 2-furiletílicos indicaron que estos compuestos pueden actuar como agentes electrofílicos en un sistema biológico (Sturdik *et al.*, 1983; Rosenberg *et al.*, 1987) y que el grupo tiol de varias

enzimas presentes en los microorganismos atacan el átomo de carbono (carbono- α) del doble enlace exocíclico a través de una reacción de adición nucleofílica. Este hallazgo abrió una nueva oportunidad para estos compuestos, ya que evidenciaba que el grupo nitro unido al anillo furánico, característica principal de los derivados descritos como agentes antimicrobianos, no era una condición exclusivamente necesaria para la actividad antimicrobiana de esta clase de compuestos, lo que abrió las puertas a nuevos procesos de síntesis para obtener nuevos candidatos con posibilidades de convertirse en fármacos de uso clínico y en medicina veterinaria.

Hay varios trabajos que muestran que, dentro de los compuestos 2-furiletílenos, sólo aquellos que presentan el grupo nitro como sustituyente en posición 5 del anillo furánico son mutagénicos. Además, se ha descrito que los compuestos con el grupo nitro como sustituyente en el doble enlace exocíclico no presentan actividad mutagénica *in vitro* y que, probablemente, el grupo vinilo no es responsable de las actividades mutagénicas en estos compuestos. A pesar de la importancia que tienen los grupos electrofílicos en los procesos toxicológicos, y a pesar de que algunos vinil compuestos presentan actividad toxicológica importante, se ha identificado que la actividad mutagénica de los 2-furiletílenos está relacionada con el grupo nitro y no con el doble enlace electrofílico de su estructura (McCalla, 1983; Sturdik *et al.*, 1985)

Sturdik y colaboradores, en los años 1985 y 1986, estudiaron un gran número de derivados del 2-furiletíleno, con vistas a relacionar su estructura química y la actividad mutagénica. Los planteamientos teóricos los corroboraron en ensayos de mutagenicidad en bacterias, a través de la inducción del sistema SOS en *E. coli* y de inducción de mutación génica en cepas de *S. typhimurium*. El primer grupo de derivados estudiados incluyó alquilésteres, el segundo N-alquilamidas sustituidas y el tercero fue más heterogéneo.

Hay que hacer notar que en el primer y segundo grupo se mantiene constante el grupo nitro (NO₂) como sustituyente en la posición 5 del anillo furánico, mientras que en el tercer grupo varían los sustituyentes tanto en el anillo furánico como en el doble enlace exocíclico. Los primeros dos grupos mantienen constante la reactividad química del anillo 5-nitrofurano y varían sólo sus características lipofílicas y el grado de estericidad por los sustituyentes alquílicos; sin embargo, los representantes del tercer grupo varían tanto en las características lipofílicas y en la estericidad, como en la reactividad química.

Todos los representantes del primer grupo resultaron ser mutagénicos en bacterias, disminuyendo la mutagenicidad en el siguiente orden: (metil > etil > propil > isopropilésteres), lo que indica que la mutagenicidad disminuye con el incremento de la cadena alquílica sustituyente, debido quizás al impedimento estérico que inhibe o dificulta la acción de las nitroreductasas. Aunque algunos derivados con sustituyentes alquílicos ramificados no cumplen del todo esta característica.

Resultados similares a los obtenidos para los ésteres se observan para las amidas alquilsustituídas. Sin embargo, al comparar los dos grupos, se concluye que los ésteres son más mutagénicos que las amidas alquilsustituídas, para aquellos casos con características lipofílicas similares.

El tercer grupo evidenció lo antes indicado, ya que sólo los compuestos con el grupo nitro unido al anillo furánico en posición 5 eran mutagénicos en bacterias. Así, la sustitución de este grupo lleva a una pérdida de la mutagenicidad y, además, el grupo vinilo parece no ser el responsable de la actividad mutagénica.

En este grupo de compuestos, la mutagenicidad aumenta con la capacidad de aceptar electrones de los sustituyentes en el doble enlace exocíclico, lo que está en correspondencia con la reactividad de los productos de reducción que se forman (Sturdik *et al.*, 1985).

1.5.4. CARACTERÍSTICAS ELECTRÓNICAS DEL GRUPO NITRO (NO₂)

La carga electrónica de los diferentes átomos de una molécula constituye una de las características electrónicas más importantes para explicar su comportamiento químico y biológico. Esto se cumple para el grupo nitro (NO₂) en posición 5 del anillo furánico (5-NO₂) y para el grupo nitro en posición β del doble enlace exocíclico (β-NO₂), los cuales podrían tener diferentes características electrónicas que influyan en la actividad biológica y mutagénica de los derivados furiletílicos.

El estudio de una serie de derivados 2-furiletílicos muestra un análisis de relación estructura-actividad muy interesante. Así, el valor promedio de la carga del grupo nitro para los compuestos estudiados resultó ser (- 0.0447) y (- 0.1248) para los grupos 5-NO₂ y β-NO₂, respectivamente. Puede observarse que el grupo 5-NO₂ tiene menor carga electrónica negativa que el grupo β-NO₂, y que la carga total del grupo β-NO₂ es cuatro veces más negativa que la del 5-NO₂. Este es un hallazgo importante que presupone diferencias significativas en la

reactividad química de este grupo nitro en las diferentes posiciones de estos derivados (Estrada, 1998).

Así, podemos considerar como un aspecto interesante la facilidad de reducción de este grupo nitro en un medio biológico, lo cual se atribuye que sea la característica fundamental que determina la mutagenicidad y la toxicidad de estos compuestos. El primer paso en el mecanismo de reducción del grupo nitro es la captura de un electrón por parte de este grupo, produciendo después iones radicales. Es evidente que la capacidad de capturar un electrón por el grupo nitro depende de su carga electrónica neta; mientras menos negativa sea la carga sobre el grupo nitro, mayor será la capacidad de capturar un electrón del medio. Sobre esta base, y de acuerdo con los datos antes expuestos, resulta que la capacidad del grupo 5-NO₂ para reducirse en un medio biológico es significativamente mayor que para el grupo β-NO₂; por lo tanto, estos derivados 2-furiletilénicos tendrán diferente comportamiento toxicológico y, muy especialmente, podrían diferir en su potencial genotóxico (Estrada, 1998).

En el caso de estos compuestos 2-furiletilénicos estudiados también hay otros parámetros moleculares importantes, como son la suma de las cargas electrónicas sobre los 7 átomos que componen el esqueleto de los 2-furiletilenos, la energía del orbital molecular más bajo desocupado y la energía del orbital molecular más alto ocupado. Todas estas características serán diferentes para cada uno de los derivados, dependiendo de su estructura química, y estos rasgos indiscutiblemente tendrán influencia en su potencial mutagénico.

1.5.5. METABOLISMO

El metabolismo es un proceso esencial que influye sobre el comportamiento de la gran mayoría de agentes químicos a los cuales se exponen los organismos vivos. Los procesos metabólicos, de forma general pueden, a través de las enzimas que participan en las diversas etapas, activar o desactivar los compuestos iniciales produciendo especies químicas activas o inactivas.

En los procesos toxicológicos, y en particular en los procesos de mutagénesis, el papel que tiene el proceso metabólico es esencial. Son muchos los casos en los que el metabolismo influye de modo distinto sobre la genotoxicidad de diversos compuestos dado que, en unos casos, el proceso metabólico activa promutágenos hacia especies más reactivas, capaces de reaccionar con el DNA o estructuras afines y provocar mutaciones como, por ejemplo, en el caso del benzo-α-pireno; mientras que, por otra parte, hay compuestos que al ser objeto de las

reacciones metabólicas se convierten en especies inocuas e incapaces de provocar daño a las células. Es por esto, por lo que el metabolismo puede considerarse como un factor determinante en la toxicidad de diversos compuestos químicos.

El metabolismo ha ido evolucionando, al igual que las especies, muchas veces condicionado por los compuestos a los que las diversas especies de organismos se han ido enfrentando durante el proceso de evolución. Así, podemos encontrar diferentes mecanismos de metabolización para las miles de sustancias químicas que se producen naturalmente y para las que se producen de forma sintética. Por lo tanto, hay una gran diversidad de enzimas que participan en el metabolismo y se presentan diferencias, entre otros aspectos, en la función, en el ritmo de actividad y en el modo de actuación. Así, por ejemplo, hay diferencias entre las bacterias y los mamíferos, en el ritmo de actividad de las nitroreductasas.

Incluso entre organismos de la misma especie hay diferencias y también entre los distintos órganos de los organismos se encuentran importantes diferencias en las tasas de metabolismo.

Por regla general, las reacciones metabólicas comprenden reacciones de oxidación, reducción, epoxidación, desaminación, hidroxilación y conjugación con compuestos endógenos, etc. El proceso general del metabolismo se ha dividido en dos etapas, determinadas por las reacciones que ocurren en cada una de ellas.

- **Reacciones de fase I:** Que resultan en una funcionalización de los sustratos que entran en el metabolismo, añadiendo, eliminando o transformando un determinado grupo funcional, el cual será necesario para las posteriores reacciones que ocurran.
- **Reacciones de fase II:** Son reacciones biosintéticas, las cuales se producen sobre los productos de las reacciones de fase I. Fundamentalmente son reacciones de conjugación.

Normalmente estos dos tipos de reacciones son procesos coordinados en los organismos. El producto de una reacción se convierte en sustrato de la siguiente y así sucesivamente. En las células y organismos el proceso de metabolización de los compuestos químicos más común persigue la conversión de compuestos hidrofóbicos en compuestos más polares y más fáciles de excretar.

El metabolismo es pues un proceso complejo donde las enzimas que protegen a un determinado organismo de la toxicidad de ciertos compuestos son responsables de los efectos tóxicos de otros compuestos (Donald de Bethizy y Hayes, 1994).

1.5.6. METABOLISMO DE LOS DERIVADOS NITROFURANOS

A pesar de que los nitrofuranos se han catalogado como agentes de acción directa, que por sí solos pueden interactuar con el DNA, se asume que la reducción del grupo nitro (NO_2) es una de las vías principales por la que estos compuestos ejercen su actividad biológica y mutagénica.

El metabolismo de estos compuestos comienza con una reducción del grupo nitro, generándose así la producción de diversos metabolitos intermediarios responsables de sus acciones biológicas y tóxicas, como ya hemos explicado. Dentro de los intermediarios que se producen, y desde el punto de vista toxicológico y mutagénico, hay que destacar en especial la producción de especies de nitroanión ($\text{R-NO}_2^{\cdot -}$) y de superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), ya que estas especies tienen una alta capacidad reactiva para interactuar con las proteínas tisulares y con el DNA y producir daño genético. Se piensa que estas son las especies activas causantes y responsables de las propiedades mutagénicas y carcinogénicas atribuidas a varios nitrofuranos, especialmente los derivados 5-nitrofuranos.

La figura 7 muestra el proceso metabólico general que pueden experimentar los derivados 5-nitrofuranos.

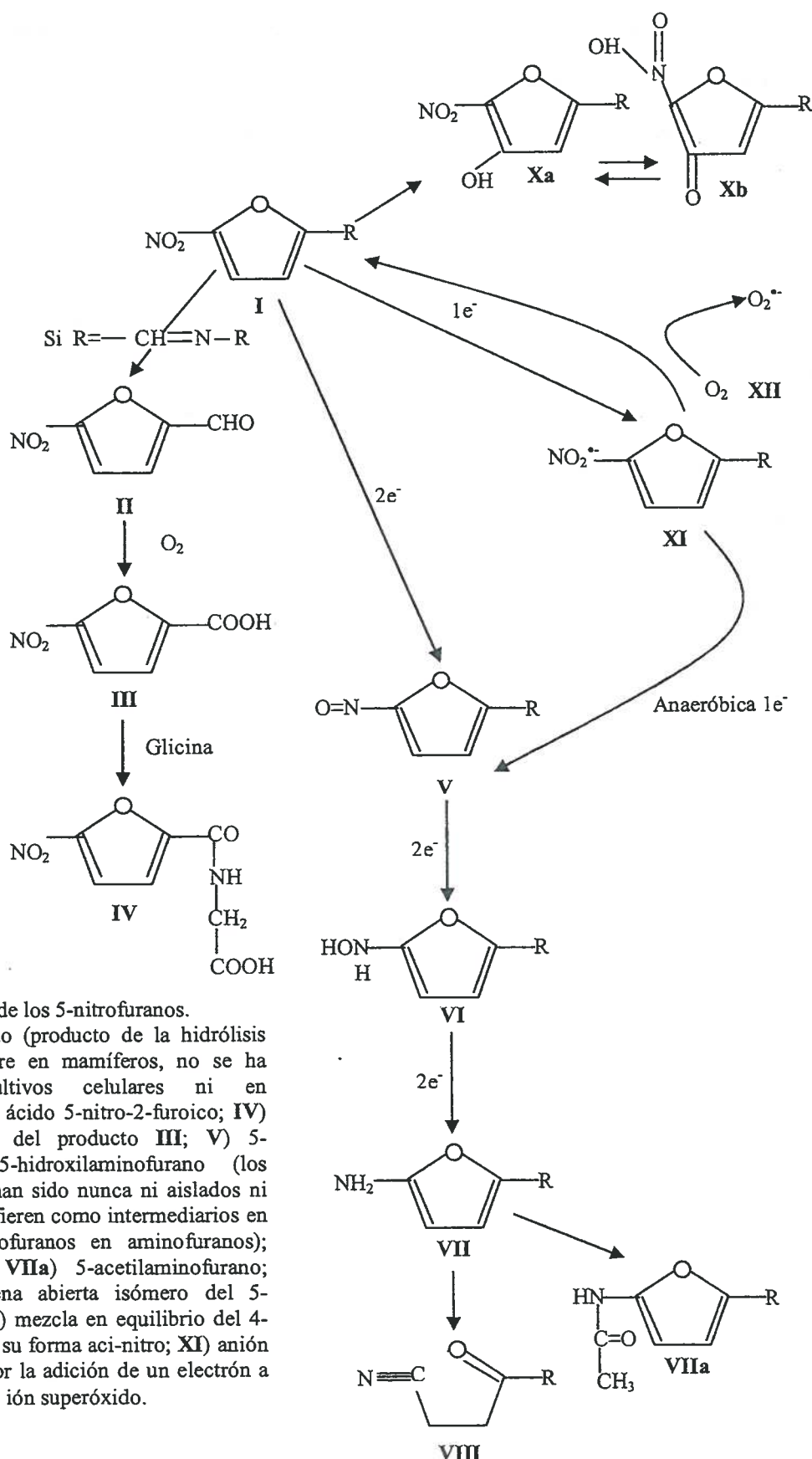


Figura 7: Metabolismo de los 5-nitrofuranos. **II**) 5-nitro-2-furaldehído (producto de la hidrólisis de I, el proceso ocurre en mamíferos, no se ha comprobado en cultivos celulares ni en microorganismos); **III**) ácido 5-nitro-2-furoico; **IV**) conjugado de glicina del producto III; **V**) 5-nitrosofurano; **VI**) 5-hidroxi-aminofurano (los productos V y VI no han sido nunca ni aislados ni sintetizados, pero se infieren como intermediarios en la conversión de nitrofuranos en aminofuranos); **VII**) 5-aminofurano; **VIIa**) 5-acetilaminofurano; **VIII**) nitrilo de cadena abierta isómero del 5-aminofurano; **Xa** y **Xb**) mezcla en equilibrio del 4-hidroxi-5-nitrofurano y su forma aci-nitro; **XI**) anión nitroradical formado por la adición de un electrón a los 5-nitrofuranos; **XII**) ión superóxido.



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Visto el interés de la aplicación de las metodologías descritas y de la investigación de los efectos genotóxicos de los derivados 2-furiletilénicos seleccionados, los objetivos principales planteados en este trabajo de Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1. Evaluar el potencial genotóxico de los derivados 2-furiletilénicos (G-0, 2-βNF y G-1) mediante ensayos in vitro e in vivo.*
- 2. Aportar nuevos datos sobre la genotoxicidad en células eucariotas de esta serie de derivados del 2-furiletileno y corroborar nuestros resultados con los obtenidos en el análisis estructura-actividad en estos derivados.*
- 3. Determinar la influencia del metabolismo sobre la genotoxicidad de estos derivados 2-furiletilénicos.*
- 4. Comparación del potencial genotóxico de los derivados 2-furiletilénicos estudiados con compuestos 5-nitrofuranos clásicos.*



ARTÍCULOS

3. ARTÍCULO N° 1

Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in cultured human lymphocytes

Jorge I. González Borroto, Amadeu Creus, Ricard Marcos

Mutation Research 497 (2001) 177–184



Mutation Research 497 (2001) 177–184

Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis

www.elsevier.com/locate/genetox

Community address: www.elsevier.com/locate/mutres

Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in cultured human lymphocytes

Jorge I. González Borroto, Amadeu Creus, Ricard Marcos*

*Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain*

Received 7 February 2001; received in revised form 14 June 2001; accepted 26 June 2001

Abstract

The compound 2-furyl-1-nitroethene (G-0) was evaluated for genotoxicity in cultured human peripheral blood lymphocytes, at concentrations ranging from 1 to 15 $\mu\text{g/ml}$. Micronuclei (MN) and sister-chromatid exchanges (SCEs) were scored as genetic endpoints. In order to detect the role of metabolic enzymes on the genotoxicity of this furylethylenic derivative, the cultures for MN and SCE demonstrations were also treated with S9 microsomal fraction. The results indicate that, under the conditions of the study, the test agent does not seem to induce significant increases in the frequency of micronucleated cells, irrespective of the presence of metabolic activation. Nevertheless, a slight increase in the SCE frequency was observed in those cultures treated without the S9 mix; although this increase disappeared in presence of the microsomal fraction. In addition, cytostatic effects of 2-furyl-1-nitroethene were observed mainly in cultures without S9 fraction, as indicated by the reduction of cell proliferation. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Nitrofurans; 2-Furyl-1-nitroethene; Human lymphocytes; Micronuclei; Sister-chromatid exchanges

1. Introduction

Among the 2-substituted 5-nitrofurans, many compounds have been widely used in human and veterinary medicine as bacteriostatic drugs, as well as in food preservatives and food additives [1–3]. The genotoxicity in bacteria and mammalian cells and the tumorigenic capacity in experimental animals have been well documented for several of these compounds [4,5]. Although nitroreduction has been proposed as an important metabolic activation pathway, many aspects on the action of the genotoxic mechanisms of 5-nitrofurans derivatives still remain unclear [2].

In spite of the known genotoxic properties of different components of this group of chemicals, at present several nitrofurans are still in use, i.e. nitrofurantoin, nifurtimox, nifuratel, and nifuroxime [6]. In addition, the current literature includes many papers and patents covering the synthesis and/or uses of new nitrofurans derivatives [4,6]. It must be pointed out that the variety of substitutions that can be introduced to the furan ring structure can lead to a great diversity of new derivatives [7].

The furanic derivative 2-furyl-1-nitroethene (G-0) belongs to a series of furylethylenic derivatives where the nitro group is not attached to the furan ring, since this group is in the exocyclic double bond present in the ethylenic chain. This compound itself has shown biological activity and, on the other hand, it constitutes a parent compound for the synthesis of a series

* Corresponding author. Tel.: +34-93-5812052;
fax: +34-93-5812387.
E-mail address: ricard.marcos@uab.es (R. Marcos).

of structurally modified furylethylenic compounds with interesting biological properties. Thus, to evaluate the genotoxic potential associated with the nitro group attachment, experiments in cultured human lymphocytes have been carried out by using micronuclei (MN) and sister-chromatid exchanges (SCEs) as genetic endpoints.

2. Materials and methods

2.1. Donors and collection of blood samples

The study was carried out using blood samples from three healthy, non-smoking males, aged between 28 and 32 years old. Approximately 20 ml of blood was collected, by venipuncture, into syringes containing sodium heparin as anticoagulant. Blood was taken the same day of the initiation of the experiment between 9.00 and 9.30 a.m. to minimize possible confounding effects of dietary factors.

2.2. Test chemicals

The test chemical 2-furyl-1-nitroethene (G-0) (Fig. 1) used in the study was synthesized at the Centro de Bioactivos Químicos (CBQ, Villa Clara, Cuba). Purity (96.58%) was established by high-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis. The same range of concentrations of the test agent (1, 5, 10 and 15 $\mu\text{g/ml}$) was used for both the MN and SCE assays, with and without metabolic activation. The range was chosen by taking into account the survival and the general cytotoxicity found in this and in a previous dose-range study. The test agent was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, CAS No. 67-68-5, Panreac, Barcelona, Spain) at a final volume in culture of 1% of the total, which was also tested as solvent control.

In the cultures without metabolic activation, the positive control for testing MN was mitomycin C (MMC,

CAS No. 50-07-7, Sigma, St. Louis, MO, USA), at 0.067 and 0.67 $\mu\text{g/ml}$ for treatments lasting 48 and 3 h, respectively. For cultures with metabolic activation, cyclophosphamide (CP, CAS No. 6055-19-2, Sigma), at 28 $\mu\text{g/ml}$ was used. For SCE in cultures without metabolic activation, MMC at 0.033 and 0.17 $\mu\text{g/ml}$ was used for treatment at 48 and 3 h, respectively, whilst in cultures with metabolic activation 1.4 $\mu\text{g/ml}$ CP was used.

2.3. Metabolic activation

S9 from (CRIFFA, Barcelona, Spain) was used as metabolic activation system. The S9 mix freshly prepared, consisted of 1 ml of S9, 0.33 ml of 1 M KCl, 0.32 ml of 0.25 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 ml of 0.2 M glucose-6-phosphate, 1 ml of 0.04 M NADP, 2.10 ml of distilled water and 5 ml of phosphate buffer (pH 7.4).

2.4. Lymphocyte cultures: MN and SCE assays

Two blood cultures were established for each genetic endpoint and concentration. A whole blood sample (0.5 ml) was added to 4.5 ml culture medium composed of 3.69 ml (82%) RPMI 1640 medium supplemented with 0.675 ml (15%) heat-inactivated foetal calf serum, 0.045 ml (1%) phytohaemagglutinin (PHA), 0.045 ml (1%) L-glutamine and 0.045 ml (1%) antibiotics (5000 IU penicillin and 5000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin). All compounds were obtained from Gibco (Barcelona, Spain).

The cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay was carried out using the standard technique proposed by Fenech [8]. Briefly, 24 h after culture initiation the cells were exposed to 0.05 ml of the different concentrations of the test agent; 44 h after de initiation of cultures the cells were treated with 10 μl of cytochalasin B (6 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma). The cultures were kept for the entire incubation period of 72 h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. After this time the harvest of cultures was carried out. Cells were centrifuged at 800 rpm for 8 min, then the supernatant was eliminated and the cells were treated with 5 ml of KCl hypotonic solution (0.075 M) at room temperature and another centrifugation was made. The hypotonized cells were fixed by at least three washes with a 3:1 methanol/acetic acid solution.

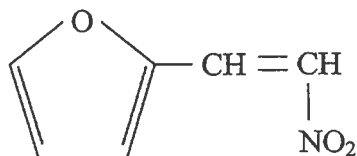


Fig. 1. Structure of 2-furyl-1-nitroethene (G-0).

Finally the cells were centrifuged, the supernatant was eliminated and the pellet was resuspended, then two drops of 20 μ l were placed on clean glass slides. After drying overnight, the cells were stained with Giemsa solution for 10 min.

For SCE demonstration, the cultures were established in the same manner as above. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Kodak, Rochester, USA) used for the SCE analysis, was added to the cultures (8 μ g/ml) 24 h after the initiation together with the test compound. At 70 h of incubation, 0.05 ml of Colcemid (0.1 μ g/ml) was added to the cultures. After the end of incubation period, cells were collected by centrifugation (1000 rpm) and resuspended in a prewarmed hypotonic solution of KCl (0.075 M) for 20 min at 37°C. The fixation procedure was similar to that used for MN. Staining was conducted according to the fluorescence plus Giemsa procedure [9].

The procedures indicated above were used for the assays conducted with and without metabolic activation. In the case of cultures with metabolic activation, 24 h after the initiation of cultures, 0.5 ml of S9 mix was added together with the test agent. After an incubation period of 3 h at 37°C the test chemical and S9 mix were removed from the culture by centrifugation 7 min at 700 rpm. Concurrent cultures, treated 3 h without activating system, were set-up. The pellet of lymphocytes was washed twice with 5 ml of RPMI 1640 medium and resuspended in complete medium and the cultures were incubated until the entire period of 72 h at 37°C.

2.5. Microscopic observation

All slides were coded prior to scoring. MN and SCE scoring was carried out by the same person (J.I.G.) using a Leitz–Leica light microscope at 1000 \times magnification under oil immersion. The criteria for scoring MN was as described by Fenech [8] and recently reviewed by Kirsch-Volders et al. [10].

Five hundred cells were scored to evaluate the percentage of cells with one, two, three and four nuclei. The number of MN in 1000 binucleated (BN) cells was scored for each treatment and the number of BN cells with MN was also recorded. A cytokinesis-block proliferation index (CBPI) was calculated according

to the following formula:

$$\text{CBPI} = \frac{M_{\text{I}} + 2M_{\text{II}} + 3(M_{\text{III}} + M_{\text{IV}})}{N}$$

where M_{I} to M_{IV} represent the number of cells with one to four nuclei, respectively, and N is the number of cells scored [11].

For the SCE analysis 50 metaphases of second division were examined for each treatment and donor. A further 100 metaphases for each concentration were also scored to determine the proportion of cells that had undergone one, two and three divisions. The proliferative rate index (PRI) was calculated according to the following expression:

$$\text{PRI} = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3}{N}$$

where M_1 , M_2 and M_3 indicate those metaphases corresponding to first, second and third division and N the total number of metaphases scored [12].

2.6. Statistical analysis

A database was created for the BN cells with MN and the values were compared for each treatment using the one-tailed Fisher's exact test. The Chi-square test was used for the analysis of CBPI and PRI among each treatment. For the statistical analysis of SCE, the Mann–Whitney U -test was used. For all the analyses, a significant level of 5% ($P \leq 0.05$) was used.

3. Results

Tables 1–3 show the results obtained in the study of the induction of MN in cultured human lymphocytes using cytochalasin B, with and without S9 fraction. This assay potentially detects both clastogenic and aneugenic compounds and its simplicity and sensitivity has made its use in genotoxicity testing very promising [13–15].

The results obtained after the treatment of the cultures with the product G-0, with and without metabolic activation, indicate that this furylethylene derivative does not induce MN, because the frequency of binucleated cells with micronuclei (BNMN) never reaches values with statistical significance when compared to the vehicle control. In addition, cytotoxic

Table 1
Induction of micronuclei (MN) and CBPI values in human lymphocyte cultures treated with 2-furyl-1-nitroethene for 48 h^a

Donor	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Distribution of MN in BN cells					MN	BNMN	Distribution of cells according to number of nuclei				BN (%)	CBPI
		0	1	2	3	>3			1	2	3	4		
A	DMSO (1%)	993	7	0	0	0	7	7	105	336	21	38	67.2	1.90
	1	992	8	0	0	0	8	8	205	262	14	19	52.4	1.65***
	5	987	13	0	0	0	13	13	209	271	7	13	54.2	1.62***
	10	986	14	0	0	0	14	14	298	196	2	4	39.2	1.41***
	MMC (0.067)	927	68	5	0	0	78	73***	312	182	2	4	36.4	1.38***
B	DMSO (1%)	988	12	0	0	0	12	12	148	298	17	37	59.6	1.81
	1	989	10	1	0	0	12	11	104	310	25	61	62.0	1.96
	5	983	15	2	0	0	19	17	148	319	9	24	63.8	1.77*
	10	983	14	2	1	0	21	17	182	315	1	2	63.0	1.64***
	MMC (0.067)	926	68	6	0	0	80	74***	276	209	4	11	41.8	1.47***
C	DMSO (1%)	992	7	1	0	0	9	8	147	288	18	47	57.6	1.84
	1	985	14	1	0	0	16	15	117	314	22	47	62.8	1.90
	5	992	7	1	0	0	9	8	184	297	4	15	59.4	1.67
	10	988	12	0	0	0	12	12	317	182	1	0	36.4	1.37***
	MMC (0.067)	951	48	1	0	0	50	49***	243	243	5	9	48.6	1.54***

^a MN, total MN; BN, binucleated; BNMN, binucleated cells with one or more micronuclei; BN (%), percentage of BN cells; CBPI, cytokinesis-block proliferation index.

* $P \leq 0.05$ (one-tailed Fisher's exact test for BNMN and Chi-square test for CBPI).

*** $P \leq 0.001$ (one-tailed Fisher's exact test for BNMN and Chi-square test for CBPI).

Table 2
Induction of micronuclei (MN) and CBPI values in human lymphocyte cultures treated with 2-furyl-1-nitroethene for 3 h with S9 fraction, donor A^a

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Distribution of MN in BN Cells					MN	BNMN	Distribution of cells according to number of nuclei				BN (%)	CBPI
		0	1	2	3	>3			1	2	3	4		
3h (+S9)	DMSO (1%)	990	8	2	0	0	12	10	121	306	42	31	61.2	1.90
	1	983	15	1	1	0	20	17	135	272	54	39	54.4	1.92
	5	989	10	1	0	0	12	11	157	279	40	24	55.8	1.81*
	10	993	7	0	0	0	7	7	162	297	27	14	59.4	1.76***
	15	991	8	1	0	0	10	9	288	201	8	3	40.2	1.45***
	CP (28)	931	66	3	0	0	72	69***	322	163	6	9	32.6	1.39***
3h (-S9)	DMSO (1%)	987	13	0	0	0	13	13	174	273	24	29	54.6	1.75
	1	988	10	2	0	0	14	12	135	295	34	36	59.0	1.87
	5	988	11	1	0	0	13	12	184	272	28	16	54.4	1.72
	10	989	10	1	0	0	12	11	299	196	3	2	39.2	1.41***
	15	Cytotoxicity							Cytotoxicity					
	MMC (0.67)	876	115	8	1	0	134	124***	162	281	19	38	56.2	1.79***

^a MN, total MN; BN, binucleated; BNMN, binucleated cells with one or more micronuclei; BN (%), percentage of BN cells; CBPI, cytokinesis-block proliferation index.

* $P \leq 0.05$ (one-tailed Fisher's exact test for BNMN and Chi-square test for CBPI).

*** $P \leq 0.001$ (one-tailed Fisher's exact test for BNMN and Chi-square test for CBPI).

Table 3

Induction of micronuclei (MN) and CBPI values in human lymphocyte cultures treated with 2-furyl-1-nitroethene for 3 h with S9 fraction, donor B^a

Treatment	Concentration (µg/ml)	Distribution of MN in BN cells					MN	BNMN	Distribution of cells according to number of nuclei				BN (%)	CBPI
		0	1	2	3	>3			1	2	3	4		
3h (+S9)	DMSO (1%)	990	10	0	0	0	10	10	81	270	58	91	54.0	2.14
	1	989	11	0	0	0	11	11	57	327	44	72	65.4	2.02**
	5	990	10	0	0	0	10	10	90	310	40	60	62.0	2.02***
	10	984	16	0	0	0	16	16	168	299	9	24	59.8	1.73***
	15	993	6	1	0	0	8	7	361	138	1	0	27.6	1.28***
	CP (28)	882	103	11	4	0	137	118***	331	156	4	9	31.2	1.36***
3h (-S9)	DMSO (1%)	993	6	1	0	0	8	7	83	321	32	64	64.2	2.03
	<1	989	11	0	0	0	11	11	88	307	44	61	61.4	2.03
	5	990	8	2	0	0	12	10	101	316	35	48	63.2	1.96
	10	986	13	1	0	0	15	14	161	324	4	11	64.8	1.70***
	15	Cytotoxicity					–	–	Cytotoxicity					
	MMC (0.67)	876	115	8	1	0	134	124***	162	281	19	38	56.2	1.79***

^a MN, total MN; BN, binucleated; BNMN, binucleated cells with one or more micronuclei; BN (%), percentage of BN cells; CBPI, cytokinesis-block proliferation index.

** $P \leq 0.01$ (one-tailed Fisher's exact test for BNMN and Chi-square test for CBPI).

*** $P \leq 0.001$ (one-tailed Fisher's exact test for BNMN and Chi-square test for CBPI).

effects of the test agent on the lymphocyte cultures were observed, the values of CBPI decreased with increasing concentrations of G-0, attaining statistical significance at several concentrations. Besides, in the case of cultures without S9 mix and 48 h of treatment, the dose of 15 µg/ml was impossible to evaluate in any of the three donors studied, because there were no BN cells and a high degree of necrotic cells was observed. These cytotoxic effects remained in the cultures without S9 treated for 3 h, therefore the dose of 15 µg/ml was impossible to score either.

On the other hand, in the cultures with metabolic activation, a reduction of the cytotoxic effects of the compound was observed. Thus, although the CBPI decreased in these cultures, the dose of 15 µg/ml was possible to score. This would indicate a possible mechanism of detoxification by which the enzymes of the S9 fraction might lead to the formation of species with lower cytotoxic effects, when compared with the parent compound.

Tables 4 and 5 show the frequencies of SCE and the PRI values obtained after the treatment of human lymphocyte cultures with the test agent G-0. The results obtained from the different experimental conditions are presented, indicating that the compound G-0 has a

moderate genotoxic potential. In the treatments lasting for 48 h without metabolic activation, G-0 induces a slight increase in the frequency of SCE in both donors, reaching statistical significance mainly at the higher concentration tested (10 µg/ml) in donor A, and at the two highest concentrations evaluated (5, 10 µg/ml) in donor B. Similarly, in the case of the treatments for 3 h without S9, a slight increase in the frequency of SCE at the highest doses was also observed in both donors.

In the experiments with S9 fraction, after treatment for 3 h, we observed that the increase in the SCE frequency is lower, because the increase found at the doses of 5 and 10 µg/ml, without microsomal fraction, did not appear when the S9 mix was added. As only a significant increase in SCE was found in one donor (A) and at the higher dose (15 µg/ml), we consider that the presence of S9 reduces and/or eliminates the genotoxicity of this furylethylene derivative. Moreover, it should be indicated that, whatever the statistical approach used to analyze the SCE data, it is agreed that a two-fold increase in SCE over that of the control should be required for considering a positive response as an indication of clear genotoxic effects [16]. As consequence, the genotoxicity of the G-0 compound can be considered as weak.

Table 4

Frequencies of sister-chromatid exchanges (SCEs) and proliferative rate indices (PRI) in cultured human lymphocytes treated with 2-furyl-1-nitroethene, donor A

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	SCE per cell \pm S.E.	PRI
48 h (-S9)	DMSO (1%)	7.62 \pm 0.46	2.05
	1	7.92 \pm 0.50	1.89
	5	8.80 \pm 0.58	1.44***
	10 ^a	10.00 \pm 0.84**	1.17***
	MMC (0.033)	22.94 \pm 0.70***	1.72***
3 h (-S9)	DMSO (1%)	7.34 \pm 0.42	2.05
	1	7.86 \pm 0.47	2.01
	5	8.70 \pm 0.41**	1.64***
	10	10.84 \pm 0.55***	1.40***
	MMC (0.17)	22.56 \pm 0.70***	1.81
3 h (+S9)	DMSO (1%)	8.44 \pm 0.46	2.03
	1	7.86 \pm 0.49	1.84
	5	9.08 \pm 0.41	1.80*
	10	9.18 \pm 0.53	1.58***
	15	10.50 \pm 0.52**	1.28***
	CP (1.4)	23.92 \pm 1.47***	1.87

^a A total of 50 metaphases were scored for each concentration, except 10 $\mu\text{g/ml}$.

* $P \leq 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test for SCE; Chi-square test for PRI).

** $P \leq 0.01$ (Mann-Whitney *U*-test for SCE; Chi-square test for PRI).

*** $P \leq 0.001$ (Mann-Whitney *U*-test for SCE; Chi-square test for PRI).

With respect to the cytotoxic effects of the compound, measured as cell cycle delay (PRI), a reduction in cell proliferation was observed in both donors. In the study without metabolic activation, several concentrations showed statistical significance for the treatments lasting for 48 and 3 h. Moreover, at the highest dose tested (10 $\mu\text{g/ml}$) in the 48 h treatments, it was only possible to score 26 and 28 metaphases of second division in donors A and B, respectively. When the two methods for measuring cytotoxicity (CBPI and PRI) are compared, a general trend can be observed where cytotoxicity is found after the threshold of 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$.

In both assays, when the product was tested in the presence of S9 mix, a reduction in the cytotoxicity was found. Another fact that evidences that S9 reduces cytotoxicity is that we were able to evaluate the SCE frequency at the dose of 15 $\mu\text{g/ml}$, which was not possible in either of the treatments

Table 5

Frequencies of sister-chromatid exchanges (SCEs) and proliferative rate indices (PRI) in cultured human lymphocytes treated with 2-furyl-1-nitroethene, donor B

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	SCE per cell \pm S.E.	PRI
48 h (-S9)	DMSO (1%)	6.10 \pm 0.33	2.11
	1	6.64 \pm 0.45	1.91**
	5	7.42 \pm 0.46**	1.46***
	10 ^a	10.32 \pm 0.86***	1.10***
	MMC (0.033)	9.48 \pm 0.48***	2.07**
3 h (-S9)	DMSO (1%)	7.12 \pm 0.47	1.89
	1	7.22 \pm 0.53	1.69
	5	7.88 \pm 0.57	1.82
	10	9.70 \pm 0.58**	1.53**
	15	12.84 \pm 0.68***	1.21***
	MMC (0.17)	16.28 \pm 0.62***	1.82
3 h (+S9)	DMSO (1%)	7.86 \pm 0.45	2.00
	1	7.48 \pm 0.44	1.90
	5	7.24 \pm 0.51	1.77*
	10	8.36 \pm 0.52	1.81
	15	8.74 \pm 0.51	1.28
	CP (1.4)	17.82 \pm 1.15***	1.82

^a A total of 50 metaphases were scored for each concentration, except 10 $\mu\text{g/ml}$.

* $P \leq 0.05$; (Mann-Whitney *U*-test for SCE; Chi-square test for PRI).

** $P \leq 0.01$ (Mann-Whitney *U*-test for SCE; Chi-square test for PRI).

*** $P \leq 0.001$ (Mann-Whitney *U*-test for SCE; Chi-square test for PRI).

without metabolic activation. These results indicate the possible detoxification of the compound by the metabolism of S9 mix enzymes. Moreover, we have detected that the decrease in the cytotoxic effects was accompanied by a reduction in the genotoxic potential of 2-furyl-1-nitroethene, as measured through the frequency of SCE.

4. Discussion

Nitrofurans are an important group of chemicals used as antimicrobial agents in human and veterinary medicine, even though mutagenic and carcinogenic properties have been shown for several of these compounds [4,6]. Nevertheless, as occurs with many other chemicals, contradictory results have been published on the mutagenic properties of different nitrofurans and their possible detoxification when evaluated in presence of activating metabolic systems.

On the other hand, it must be pointed out that there are differences between the behavior of the nitrofurans and other nitroaromatic compounds. One of the main differences is the unusual ring opening that occurs in nitrofurans when they are susceptible to reduction, which can lead to an alternative reaction of elimination, forming an inactive saturated nitrile. As is known, nitrofurans cause mutagenicity via a nitrenium ion, which could form from the hydroxylamine or one of its esters, during the reduction of the nitro group. A low electron density on carbon atom 2 of the furan ring (C2) would promote loss of potential nitrenium ion [17].

The furylethylene derivatives, with the nitro group located outside the furan ring, may have different biological properties from the 5-nitrofurylethylene derivatives. Thus, although they are isomers of position, this structural difference can produce significant changes in the physico-chemical, chemical and biological properties of these two types of compounds, mainly in genotoxicity [18]. In this context, Sturdik et al. [19] when studying the structure–mutagenicity relationship in a series of furylethylenic derivatives, reported that only those derivatives with the nitro group in position 5 of the furanic ring were mutagenic, and that the substitution of this functional group results in the loss of mutagenic activity. In particular, one of the derivatives studied by these authors had a chemical structure similar to that of our compound, and did not show mutagenic activity when studied by SOS-inducing in bacteria, nor by the Ames test in *Salmonella typhimurium* TA98. Our results, indicating a very weak genotoxicity of the G-0 compound, are in agreement with other data published for 2-furylethylene derivatives [4,20]. Ramos et al. investigated the mutagenicity of a substituted nitroalkene 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (BNF) in the *Salmonella*/microsome assay and in the mouse bone marrow micronucleus test [21]. They found that BNF was a direct mutagen in bacteria and that the response was lowered when exogenous metabolic activation (S9) was used. A remarkable decrease in mutagenicity was observed in a nitroreductase deficient strain (TA100NR) showing the involvement of the nitro group in the genotoxic response. The MN assay, after a single intraperitoneal dose of 10–17.5 mg/kg, did not show any response in the first sampling (24 h) although a weak effect was found in

the second sampling (48 h). These results may indicate the involvement of a detoxification process. At a higher dose (20 mg/kg), a clear positive response was found in both sampling times. It should be reminded that the 2-furylethylene derivative BNF has the nitro group at position β of the exocyclic double bond, and has a great structural similarity with our test agent.

The main conclusion from a study on the analysis of the electronic molecular structure of 2-furylethylene derivatives performed by using a molecular orbital method was concerned to the marked electronic differences that exist among nitro groups at different positions of the 2-furylethylene framework. The nitro groups at position 5 of the furan ring are more sensitive to reduction in biological media than those at position β of the exocyclic double bond. Due to this fact, some compounds of this series of derivatives with the nitro group at the ethylenic chain were classified as non-mutagenic with over 90% probabilities [18].

Our results, indicating a reduction/elimination of the genotoxic properties by enzymatic metabolic deactivation, agree with other experimental data that show a diminished response of some nitrofurans in the Ames test with metabolic activation [22]. In this study, the preincubation with S9 under anaerobic conditions resulted in a greater and sometimes complete loss of mutagenic activity, being dependent on both the incubation time and the quantity of S9 fraction. Similar results showing the relevance of metabolic activation on the genotoxicity of a 5-nitrofur derivative were previously reported [23]. On the other hand, the deactivation of furyl furamide (AF-2) by incubation with S9 mix is another evidence that the enzymes of the S9 fraction may lead to the formation of metabolites that are neither mutagenic nor capable of being converted into mutagenic species. This could be due to the loss of the nitro group and the formation of inactive agents [24].

Recently, Quillardet et al. carried out a study on the mutagenic properties of a nitrofur derivative 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-*b*]furan (R7000) in *lacI* transgenic mice [25]. From these results, R7000 appears to be considerably less mutagenic in mice than in bacteria, on the basis of the number of induced mutants per unit mass, when compared with other known mutagenic chemicals. This would support the important role of the metabolism in reducing the genotoxic potential of nitrofurans.

Acknowledgements

Jorge I. González was supported during this work by a fellowship from the MUTIS program of the Spanish Agency of International Co-operation. We thank G. Umbert for her expert technical collaboration and M. McCarthy for her secretarial assistance. We also want to thank Dr. Nilo Castañedo (CBQ, Villa Clara, Cuba) for kindly supplying the G-0 compound.

References

- [1] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Some Anti-Thyroid and Related Substances, Vol. 7, Nitrofurans and Industrial Chemicals, IARC, Lyon, France, 1974.
- [2] J. Jurado, C. Pueyo, Role of classical nitroreductase and O-acetyltransferase on the mutagenicity of nifurtimox and eight derivatives in *Salmonella typhimurium*, *Environ. Mol. Mutagen.* 26 (1995) 86–93.
- [3] J. Gajewska, M. Szczypka, B. Tudek, T. Szymczyk, Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone, *Mutat. Res.* 232 (1990) 191–197.
- [4] D.R. McCalla, Mutagenicity of nitrofurans derivatives: review, *Environ. Mutagen.* 5 (1983) 745–765.
- [5] N. Yi-Chang, R.H. Heflich, F.F. Kadlubar, P.P. Fu, Mutagenicity of nitrofurans in *Salmonella typhimurium* TA98, TA98NR and TA98/1,8-DNP₆, *Mutat. Res.* 192 (1987) 15–22.
- [6] J.M.T. Hamilton-Miller, Nitrofurans, in: F. O'Grady, H.P. Lambert, R.G. Finch, D. Greenwood (Eds.), *Antibiotic and Chemotherapy*, 7th Edition, Churchill Livingstone, London, 1997, pp. 396–403.
- [7] S.M. Townson, P.F. Boreham, P. Upcroft, J.A. Upcroft, Resistance to the nitroheterocyclic drugs, *Acta Trop.* 56 (1994) 173–194.
- [8] M. Fenech, The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutat. Res.* 285 (1993) 35–44.
- [9] P. Perry, S. Wolf, New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature* 251 (1974) 156–158.
- [10] M. Kirsch-Volders, T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate Jr., E. Lorge, H. Norppa, J. Surrallés, W. von der Hude, A. Wakata, Report from the in vitro micronucleus assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 167–172.
- [11] J. Surrallés, N. Xamena, A. Creus, J. Catalán, H. Norppa, R. Marcos, Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* 341 (1995) 169–184.
- [12] G. Ribas, J. Surrallés, E. Carbonell, A. Creus, N. Xamena, R. Marcos, Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes, *Mutat. Res.* 416 (1998) 93–99.
- [13] M. Fenech, A.A. Morley, Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* 147 (1985) 29–36.
- [14] P. Van Hummelen, M. Kirsch-Volders, Analysis of eight known or suspected aneugens by the in vitro human lymphocyte micronucleus test, *Mutagenesis* 7 (1992) 447–455.
- [15] J. Surrallés, A.T. Natarajan, Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey, *Mutat. Res.* 392 (1997) 165–174.
- [16] P. Perry, L. Henderson, D. Kirkland, Sister-chromatid exchange in cultured cells, in: B.J. Dean (Ed.), *UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing*, Part II, UKEMS, 1984, pp. 89–109.
- [17] A.K. Debnath, C. Hansch, K.H. Kim, Y.C. Martin, Mechanistic interpretation of the genotoxicity of nitrofurans antibacterial agents using quantitative structure–activity relationships and comparative molecular field analysis, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 1007–1016.
- [18] E. Estrada, Structure–mutagenicity relationships in 2-furylethylene derivatives. A molecular orbital study of the role of nitro groups, *Mutat. Res.* 420 (1998) 67–75.
- [19] E. Sturdik, M. Rosenberg, L. Stibranyi, S. Balaz, O. Chreno, L. Ebringer, D. Ilavsky, D. Vegh, Structure–mutagenicity relationships of 5-nitro-2-furylethylenes in *Salmonella typhimurium* TA98, *Chem. Biol. Interact.* 53 (1985) 145–153.
- [20] E. Sturdik, M. Benova, S. Miertus, S. Balaz, M. Rosenberg, M. Sturdikova, L. Ebringer, L. Stibranyi, D. Ilavsky, D. Vegh, Relationships between structure of 5-nitro-2-furylethylenes and their SOS-function-inducing activities in *Escherichia coli*, *Chem. Biol. Interact.* 58 (1986) 69–78.
- [21] A. Ramos, A. Vizoso, A. Edreira, J. Betancourt, M. Decalo, Activity of nitroalkene derivative, 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene, in *Salmonella* microsome assay and the mouse bone marrow micronucleus test, *Mutat. Res.* 390 (1997) 233–238.
- [22] H.R. Skeggs, R.M. Berglund, W.J.A. VandenHeuvel, H. Mrozik, P.G. Wislocki, F.J. Wolf, Effect of liver enzymes on the mutagenicity of nitroheterocyclic compounds: activation of 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-3-(1-methyl-5-nitro-1-H-imidazol-2-yl)-1,2-benzisoxazole and deactivation of nitrofurans and nitroimidazoles in the Ames test, *Mutat. Res.* 136 (1984) 1–8.
- [23] S. Arnaise, H. Boeuf, J.P. Buisson, N. Cantat, P. Demerseman, J. Einhorn, G. Lamotte, M. Lemelin, P.A. Briener, S.W. Perdue, A.W. Hsie, R. Royer, F. Kelly, M. Hofnung, Genotoxic activity of 2-nitronaphthofurans and related molecules, *Mutagenesis* 3 (1986) 217–229.
- [24] M.S.S. Murthy, K.B. Najaria, Deactivation of furyl furamide (AF-2) by rat-liver microsomes and its implication in short-term test for mutagenicity/carcinogenicity, *Mutat. Res.* 77 (1980) 127–134.
- [25] P. Quillardet, V. Michel, X. Arrault, M. Hofnung, E. Touati, Mutagenic properties of a nitrofurans, 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-*b*]furan (R7000), in *lacI* transgenic mice, *Mutat. Res.* 470 (2000) 177–188.

3.1. ARTÍCULO N° 2

Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene in cultured human lymphocytes

Jorge I. González Borroto, Amadeu Creus, Ricard Marcos

Mutation Research 519 (2002) 179–185



Mutation Research 519 (2002) 179–185

Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis

www.elsevier.com/locate/gentox

Community address: www.elsevier.com/locate/mutres

Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene in cultured human lymphocytes

Jorge I. González Borroto, Amadeu Creus, Ricard Marcos*

*Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain*

Received 8 March 2002; received in revised form 21 May 2002; accepted 29 May 2002

Abstract

The genotoxicity of the 2-furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (2- β NF) has been evaluated in cultured human peripheral blood lymphocytes at concentrations ranging from 0.5 to 15 μ g/ml. The frequencies of micronuclei (MN) and sister-chromatid exchanges (SCEs) were used and scored as indicators of genetic damage. To assess the role of the metabolism mediated by the enzymes present in the S9 mix, over the possible genotoxic potential of the test agent, the cultures for MN and SCE demonstrations were treated for 3 h in presence and in absence of rat liver microsomal fraction. The results indicate that, under the experimental conditions used, the test agent does not induce significant increases in the frequency of micronucleated cells, irrespective of the presence/absence of metabolic fraction. Nevertheless, a slight increase in the SCE frequency was observed in those cultures treated without the S9 mix; although this slight increase disappeared in the experiments carried out with the microsomal fraction. In addition, cytotoxic/cytostatic effects of (2- β NF) were observed mainly in the cultures treated without the S9 fraction.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: 5-Nitrofurans; 2-Furylethylenes; Human lymphocytes; Micronuclei; Sister-chromatid exchanges

1. Introduction

The 5-nitrofurans have demonstrated genotoxicity in bacterial and mammalian cells, as well as tumorigenic capacity in experimental animals. In spite of that, there are several of them still in use [1–4].

The interest in the study of 2-furylethylene compounds has increased in the recent years as a consequence of the discoveries of potent microcidal compounds having this chemical structure. Subsequent

studies have shown that the presence of a nitro group, at position 5 of the furan ring, is not a necessary condition for the development of the antimicrobial activity of 2-furylethylenes. This finding opened a novel opportunity for this class of compounds [1].

Our group has been studying the genotoxicity of different 2-furylethylene derivatives, which have shown interesting biological properties. In this novel group of derivatives the nitro group is not attached to the furan ring, but it is placed at the double bond present in the ethylenic chain at the β -carbon atom. On the other hand, several studies have demonstrated that only the 5-nitrofurans are mutagenic, and that the derivatives with the nitro group outside the furan ring did not show mutagenic activity [5,6].

* Corresponding author. Tel.: +34-3-5812052;
fax: +34-3-5812387.
E-mail address: ricard.marcos@uab.es (R. Marcos).

To gain a deeper understanding about the role of the genotoxic potential associated with the nitro group attachment at the position β of the exocyclic double bond, in this novel group of 2-furylethylene derivatives, we have conducted a series of experiments in cultured human lymphocytes. Thus, to determine the genotoxic potential of the compound 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (2- β NF), two well-known cytogenetic assays were used: the *in vitro* micronucleus (MN) test by using the cytokinesis-block technique and the sister-chromatid exchanges (SCEs) assay.

2. Materials and methods

2.1. Donors and collection of blood samples

The study was carried out by using blood samples from two healthy, non-smoking male donors, aged 28 and 31 years. Approximately, 20 ml of blood was collected, by venipuncture, into syringes containing sodium heparin as anticoagulant. Blood was taken the same day of the initiation of the experiment between 9:00 and 9:30 a.m. to minimize possible confounding effects of dietary factors.

2.2. Test chemicals

The test chemical 2- β NF (Fig. 1) used in the study was synthesized at the Centro de Bioactivos Químicos (CBQ, Villa Clara, Cuba). A range of concentrations of the test agent (from 0.5 to 15 μ g/ml) was used for the MN assay. For the SCE assays the range of doses used was from 1 to 20 μ g/ml. These ranges were chosen by taking into account the survival and the general cytotoxic/cytostatic effects found in previous dose-range studies. The test agent was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, CAS No. 67-68-5, Panreac, Barcelona, Spain) at a final volume in culture of 1% of the total. DMSO was also tested as a solvent control.

In the cultures without metabolic activation, the positive control for testing MN was mitomycin C (MMC,

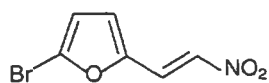


Fig. 1. Structure of 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (2- β NF).

CAS No. 50-07-7, Sigma) at 0.67 and 0.067 μ g/ml for treatments lasting 3 and 48 h, respectively. For cultures with metabolic activation, cyclophosphamide (CP, CAS No. 6055-19-2, Sigma), at 28 μ g/ml was used. For SCE demonstration without metabolic activation, MMC at 0.17 and 0.033 μ g/ml were used for treatments lasting 3 and 48 h, respectively, whilst in cultures with metabolic activation 1.4 μ g/ml of CP was used.

2.3. Metabolic activation

S9 from (CRIFFA, Barcelona, Spain) was used as metabolic activation system. The S9 mix freshly prepared, consisted of 1 ml of S9, 0.33 ml of 1 M KCl, 0.32 ml of 0.25 M $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, 0.25 ml of 0.2 M glucose-6-phosphate, 1 ml of 0.04 M NADP, 2.10 ml of distilled water and 5 ml of phosphate buffer (pH 7.4).

2.4. Lymphocyte cultures: MN and SCE assays

Two blood cultures were established for each genetic endpoint and concentration. A whole blood sample (0.5 ml) was added to 4.5 ml culture medium composed of 3.69 ml (82%) RPMI 1640 medium supplemented with 0.675 ml (15%) heat-inactivated fetal calf serum, 0.045 ml (1%) phytohaemagglutinin (PHA), 0.045 ml (1%) L-glutamine and 0.045 ml (1%) antibiotics (5000 IU penicillin and 5000 μ g/ml streptomycin). All compounds were obtained from Gibco (Barcelona, Spain).

The cytokinesis-block micronucleus assay (CBNM) was carried out using the standard technique proposed by Fenech [7] with slight modifications following the methodology established in our laboratory and described in detail in previous works [8–10]. The experiments for SCE demonstration were conducted similarly as we recently reported [10]. Staining of SCE was conducted following the fluorescence plus Giemsa method [11].

In general, the same procedures were used for the assays conducted with and without metabolic activation. Nevertheless, in the case of cultures with metabolic activation, 24 h after the initiation of cultures 0.5 ml of S9 mix were added together with the test agent. After an incubation period of 3 h at 37 °C, the test chemical and S9 mix were removed from the culture. Concurrent cultures, treated for 3 h without

the activating system, were also set up. The pellet of lymphocytes was washed twice with 5 ml of RPMI 1640 medium and resuspended in complete medium and, after that, the cultures were incubated until the entire period of 72 h at 37 °C.

2.5. Microscopic observation

All slides were coded prior to scoring. MN and SCE scoring was carried out by the same person (JIG) using a Leitz-Leica light microscope at 1000× magnification under oil immersion. The criteria for scoring micronuclei (MN) was as described by Fenech [7] and recently reviewed by Kirsch-Volders et al. [12].

Five hundred cells were scored to determine the percentage of cells with one to four nuclei. The number of MN in 1000 binucleated (BN) cells was scored for each treatment and the number of BN cells with MN were also recorded. A cytokinesis-block proliferation index (CBPI) was calculated according to the following formula:

$CBPI = (M_I + 2M_{II} + 3(M_{III} + M_{IV}))/N$, where M_I to M_{IV} represent the number of cells with one to four nuclei, respectively, and N is the number of cells scored [13].

For the SCE analysis, 50 metaphases of second division were examined for each treatment and donor. A further 100 metaphases for each concentration were also scored to evaluate the proportion of cells that had undergone one to three divisions. The proliferative rate index (PRI) was calculated following the expression:

$PRI = (M_1 + 2M_2 + 3M_3)/N$, where M_1 , M_2 and M_3 indicate those metaphases corresponding to first to third division and N is the total number of metaphases scored [14].

2.6. Statistical analysis

The analysis of the BN cells with MN was performed for each treatment using the one-tailed Fisher's exact test. The χ^2 -test was used for the analysis of CBPI and PRI among each treatment. For the statistical analysis of SCE, the data were transformed using the square roots of the original values plus 1 ($\sqrt{x+1}$), this transformation is effective in stabilizing the dispersion and makes the variances independent of the means. Then, an one-way ANOVA was performed. The comparisons between groups were made using a

post-hoc test, the Fisher's least significant difference test. Statistical decisions were made with a significance level of 0.05.

3. Results

The data obtained in the study measuring the induction of MN in cultured human lymphocytes using cytochalasin B, with and without S9 fraction, are summarized in Tables 1–3. The results indicate that, after the treatment of the cultures with the compound 2- β NF, no induction of MN was observed in any of the assay conditions. Thus, the frequency of BN cells with micronuclei (BNMN) never reaches values with statistical significance when the treatment groups are compared with the vehicle control.

In addition, cytotoxic/cytostatic effects of the test agent on the lymphocyte cultures were observed and, as can be seen in the tables, the CBPI values decreased with increasing doses of 2- β NF. The cytotoxic/cytostatic effects were mainly observed in those cultures treated in absence of S9 fraction, and principally at the higher dose tested (15 μ g/ml). Thus, this dose was impossible to evaluate in the cultures treated for 3 h without the S9 fraction, in any of the

Table 1
Induction of micronuclei (MN) and CBPI values in human lymphocyte cultures treated with 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene for 48 h^a

Donor	Concentration (μ g/ml)	MN	BNMN	%BN	CBPI
A	DMSO (1%)	11	11	55.4	1.79
	0.5	6	6	58.8	1.77
	1	11	10	58.8	1.76
	5	7	7	53.8	1.62***
	10	12	11	37.6	1.38***
	MMC (0.067)	87	84***	38.2	1.44***
B	DMSO (1%)	13	12	60.4	1.81
	0.5	15	14	59.4	1.82
	1	9	8	56.8	1.84
	5	14	13	53.8	1.65***
	10	15	13	48.4	1.52***
	MMC (0.067)	48	47***	52.0	1.63***

One-tailed Fisher's exact test for BNMN and χ^2 -test for CBPI.

^a MN, total MN; BNMN, binucleated cells with one or more micronuclei; %BN, percentage of BN cells; CBPI, cytokinesis-block proliferation index.

*** $P \leq 0.001$.

Table 2

Induction of micronuclei (MN) and CBPI values in human lymphocyte cultures treated with 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene for 3 h with and without S9 fraction (donor A)^a

Treatment	Concentration (µg/ml)	MN	BNMN	%BN	CBPI
3 h (-S9)	DMSO (1%)	18	14	53.4	1.81
	1	13	12	53.0	1.74
	5	11	11	56.6	1.78
	10	19	15	44.6	1.50***
	15	_b	_b	_b	_b
	MMC (0.67)	119	113***	48.8	1.61***
3 h (+S9)	DMSO (1%)	13	12	51.4	1.74
	1	11	9	48.6	1.68
	5	10	5	53.0	1.74
	10	13	11	50.0	1.65
	15	17	13	39.8	1.44***
	CP (28)	97	90***	19.0	1.19***

One-tailed Fisher's exact test for BNMN and χ^2 -test for CBPI.

^a MN, total MN; BNMN, binucleated cells with one or more micronuclei; %BN, percentage of BN cells; CBPI, cytokinesis-block proliferation index.

^b Cytotoxic/cytostatic.

*** $P \leq 0.001$.

Table 3

Induction of micronuclei (MN) and CBPI values in human lymphocyte cultures treated with 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene for 3 h with and without S9 fraction (donor B)^a

Treatment	Concentration (µg/ml)	MN	BNMN	%BN	CBPI
3 h (-S9)	DMSO (1%)	8	8	57.6	1.86
	1	15	12	55.6	1.88
	5	8	8	53.4	1.67***
	10	14	14	25.0	1.28***
	15	_b	_b	_b	_b
	MMC (0.67)	119	113***	48.8	1.61***
3 h (+S9)	DMSO (1%)	14	11	54.2	1.99
	1	13	13	54.0	1.98
	5	12	12	50.8	1.86**
	10	9	9	51.2	1.71***
	15	15	13	34.2	1.41***
	CP (28)	77	72***	34.8	1.45***

One-tailed Fisher's exact test for BNMN and χ^2 -test for CBPI.

^a MN, total MN; BNMN, binucleated cells with one or more micronuclei; %BN, percentage of BN cells; CBPI, cytokinesis-block proliferation index.

^b Cytotoxic/cytostatic.

** $P \leq 0.01$.

*** $P \leq 0.001$.

two donors studied. This would indicate a possible mechanism of detoxification, or the possibility that the enzymes of the S9 fraction exert a deactivation over this furylethylene derivative, leading to the formation of a metabolite with lower cytotoxic/cytostatic effects.

The results obtained for the SCE assay in the different experimental conditions carried out are showed in Tables 4 and 5. The frequencies of SCE indicate that the chemical compound 2-βNF has a moderate genotoxic potential. In the treatments lasting for 48 h without metabolic activation, 2-βNF induced a slight increase in the frequency of SCE in both donors, reaching statistical significance mainly at the higher dose that was possible to score (15 µg/ml). For treatments lasting for 3 h, a slight increase in the frequency of SCE at the higher dose scored (10 µg/ml) was observed, but only in donor B. This increase

Table 4

Frequencies of sister-chromatid exchanges (SCEs) and proliferative rate indices (PRI) in cultured human lymphocytes treated with 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (donor A)^a

Treatment	Concentration (µg/ml)	SCE/cell ± S.E.	PRI
48 h (-S9)	DMSO (1%)	7.00 ± 0.46	2.10
	1	6.96 ± 0.43	2.26
	5	6.20 ± 0.39	1.75***
	10	8.54 ± 0.45*	1.67***
	15	8.68 ± 0.42**	1.57***
	20	_b	_b
	MMC (0.033)	28.30 ± 0.97***	1.83***
3 h (-S9)	DMSO (1%)	6.82 ± 0.48	1.47
	1	6.82 ± 0.41	1.93
	5	7.62 ± 0.47	1.74
	10	7.14 ± 0.49	1.47
	15	_b	_b
	MMC (0.17)	17.62 ± 0.69***	1.95
3 h (+S9)	DMSO (1%)	7.22 ± 0.44	1.97
	1	6.90 ± 0.44	1.98
	5	7.56 ± 0.46	1.91
	10	7.52 ± 0.38	1.43
	15	7.22 ± 0.47	1.75
	CP (1.4)	16.36 ± 0.95***	1.85

One-way ANOVA and Fisher's least significant difference test for SCE; χ^2 -test for PRI.

^a A total of 50 second-division metaphases were scored for each concentration.

^b Cytotoxic/cytostatic.

* $P \leq 0.05$.

** $P \leq 0.01$.

*** $P \leq 0.001$.

Table 5
Frequencies of sister-chromatid exchanges (SCEs) and proliferative rate indices (PRI) in cultured human lymphocytes treated with 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (donor B)^a

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	SCE/cell \pm S.E.	PRI
48 h (-S9)	DMSO (1%)	6.38 \pm 0.41	1.94
	1	5.80 \pm 0.36	1.88
	5	7.74 \pm 0.44*	1.79***
	10	7.06 \pm 0.42	1.42***
	15	8.88 \pm 0.41***	1.31***
	20	- ^b	- ^b
	MMC (0.033)	17.66 \pm 0.62***	1.89**
3 h (-S9)	DMSO (1%)	6.16 \pm 0.37	2.34
	1	7.26 \pm 0.44	2.33
	5	6.88 \pm 0.47	2.11
	10	7.80 \pm 0.49*	1.52***
	15	- ^b	- ^b
	MMC (0.17)	14.44 \pm 0.60***	2.41
	3 h (+ S9)	DMSO (1%)	6.38 \pm 0.38
1		6.34 \pm 0.38	2.41
5		6.92 \pm 0.45	2.43
10		6.98 \pm 0.47	2.26
15		7.74 \pm 0.50*	1.74**
CP (1.4)		17.62 \pm 0.79***	2.28

One-way ANOVA and Fisher's least significant difference test for SCE; χ^2 -test for PRI.

^a A total of 50 second-division metaphases were scored for each concentration.

^b Cytotoxic/cytostatic.

* $P \leq 0.05$.

** $P \leq 0.01$.

*** $P \leq 0.001$.

was observed both in presence and absence of S9 fraction.

With respect to the cytotoxic/cytostatic effects of the test compound, measured as a cell cycle delay (PRI), a reduction in cell proliferation was observed in both donors, mainly in the study without S9 fraction. Due to the high toxicity of the doses of 15 and 20 $\mu\text{g/ml}$, in the two donors, we were unable to evaluate the PRI for such levels of exposure. These results would confirm the possible detoxification of the compound mediated by the metabolism of the S9 enzymes, as indicated for the MN study.

4. Discussion

Nitrofurans constitute an important group of chemicals used as antimicrobial agents in human and

veterinary medicine. Even though mutagenic and carcinogenic properties have been shown for several of these compounds, many of them still are in use [2–4]. Although nitroreduction has been proposed as an important metabolic activation pathway, many aspects on the action of the genotoxic mechanisms of nitrofurans derivatives still remain unclear [15].

Significant differences between the behavior of nitrofurans and other nitroaromatic compounds had been shown. One of these differences is the unusual ring opening that occurs in nitrofurans when they are susceptible to reduction, which can lead to an alternative reaction of elimination, forming an inactive saturated nitrile. As it is known, nitrofurans may cause mutagenicity via a nitrenium ion, which could be formed from hydroxylamine, or one of its esters, during the reduction of the nitro group. A low electron density on carbon atom (C₂) of the furan ring would promote loss of potential nitrenium ion [16].

As it has been stated previously, the 5-nitrofurylethylenes and the β -nitrofurylethylenes derivatives are isomers of position, but the structural difference due to the attachment of the nitro group can produce significant changes in the chemical and biological properties of such compounds, mainly in their genotoxic ability [1,10].

The analysis of the electronic molecular structure of 2-furylethylene derivatives, carried out using a molecular orbital method [1], showed the marked electronic differences that exist among nitro groups at different positions of the 2-furylethylene framework. The nitro groups at position 5 of the furan ring are more sensitive to reduction in biological media than those at position β of the exocyclic double bond. Due to this fact, some compounds of this series of derivatives with the nitro group at the ethylenic chain were classified as non-mutagenic with over 90% probability. In this context, Sturdik et al. [5,6] concluded that only those derivatives with the nitro group in position 5 of the furanic ring were mutagenic, and that the substitution of this functional group results in the loss of mutagenicity when assayed by SOS-inducing in bacteria, and by the Ames test in *Salmonella typhimurium* TA 98.

On the other hand, many experimental evidences support the possible detoxification of nitrofurans and furylethylene when they are tested in vitro with

metabolic activation systems or in vivo studies. Ramos et al. [17] investigated the mutagenicity of a substituted nitroalkene 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (BNF) in the *Salmonella*/microsome assay and in the mouse bone marrow micronucleus test. They found that BNF was a direct mutagen in bacteria, but the response was lowered when the S9 metabolic activation fraction was used. A remarkable decrease in mutagenicity was detected in a nitroreductase deficient strain (TA 100NR), showing the involvement of the nitro group in their genotoxic response. The MN assay in the mouse bone marrow, after a single intraperitoneal dose of 10–17.5 mg/kg, did not show any response in the first sampling (24 h) although a weak effect was found in the second sampling (48 h). These results may suggest the involvement of a detoxification process.

Our results agree with other experimental data that show a diminished response of some nitrofurans and its metabolites reduction in *Salmonella* TA 100 [18]. Skeggs et al. [19] studied the activity of the liver enzymes on the mutagenicity of different nitroheterocyclic compounds, among them the nitrofurans, and found that the preincubation with S9 under anaerobic conditions resulted in a greater and sometimes complete loss of mutagenic activity, being dependent on both the incubation time and the quantity of S9 fraction.

The present results with the 2-βNF derivative also agree with our recent reported data on the genotoxicity of 2-furyl-1-nitroethene, where this derivative was classified as slightly genotoxic [10].

Thus, our results with the compound 2-βNF confirm the low genotoxicity of these kind of furylethylene derivatives and the reduction/elimination of the possible genotoxic properties of these types of chemicals, with the nitro group at position β of the exocyclic double bond, by enzymatic metabolic deactivation.

Taking into account the lack of genotoxic effects of some nitrofurans derivatives and many β-nitro-furylethylenes, the results reported here with 2-βNF, our previous data with two other 2-furylethylene derivatives, and the interesting biological properties showed by this class of compounds, it seems that they would be an alternative to obtain novel pharmaceutical molecules with lower genotoxic risk. Nevertheless, further genotoxicity studies measuring different levels of DNA damage are still necessary.

Acknowledgements

Jorge I. González was supported during this work by a fellowship from the MUTIS program of the Spanish Agency of International Co-operation. We thank Glòria Umbert for her expert technical help. We also want to thank Dr. Nilo Castañedo from CBQ (Villa Clara, Cuba) for kindly supplying the 2-βNF compound.

References

- [1] E. Estrada, Structure–mutagenicity relationships in 2-furylethylene derivatives. A molecular orbital study of the role of nitro groups, *Mutat. Res.* 420 (1998) 67–75.
- [2] D.R. McCalla, Mutagenicity of nitrofurans derivatives: review, *Environ. Mutagen.* 5 (1983) 745–765.
- [3] Y.C. Ni, R.H. Heflich, F.F. Kadlubar, P.P. Fu, Mutagenicity of nitrofurans in *Salmonella typhimurium* TA98, TA98NR and TA98/18-DNP6, *Mutat. Res.* 192 (1987) 15–22.
- [4] J.M.T. Hamilton-Miller, Nitrofurans, in: F. O'Grady, H.P. Lambert, R.G. Finch, D. Greenwood (Eds.), *Antibiotic and Chemotherapy*, 7th Edition, Churchill Livingstone, London, 1997, pp. 396–403.
- [5] E. Sturdik, M. Rosenberg, L. Stibranyi, S. Balaz, O. Chreno, L. Ebringer, D. Ilavsky, D. Vegh, Structure–mutagenicity relationships of 5-nitro-2-furylethylenes in *Salmonella typhimurium* TA 98, *Chem. Biol. Interact.* 53 (1985) 145–153.
- [6] E. Sturdik, M. Benova, S. Miertus, S. Balaz, M. Rosenberg, M. Sturdikova, L. Ebringer, L. Stibranyi, D. Ilavsky, D. Vegh, Relationships between structure of 5-nitro-2-furylethylenes and their SOS-function-inducing activities in *Escherichia coli*, *Chem. Biol. Interact.* 58 (1986) 69–78.
- [7] M. Fenech, The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutat. Res.* 285 (1993) 35–44.
- [8] J. Surrallés, E. Carbonell, R. Marcos, F. Degrassi, A. Antoccia, C. Tanzarella, A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes, *Mutagenesis* 7 (1992) 407–410.
- [9] J. Surrallés, A. Antoccia, A. Creus, F. Degrassi, F. Peris, C. Tanzarella, N. Xamena, R. Marcos, The effect of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. Results from two laboratories, *Mutagenesis* 9 (1994) 347–353.
- [10] J.I. González Borroto, A. Creus, R. Marcos, Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in cultured human lymphocytes, *Mutat. Res.* 497 (2001) 177–184.
- [11] P. Perry, S. Wolf, New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature* 251 (1974) 156–158.
- [12] M. Kirsch-Volders, T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate Jr., E. Lorge, H. Norppa,

- J. Surrallés, W. von der Hude, A. Wakata, Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 167–172.
- [13] J. Surrallés, N. Xamena, A. Creus, J. Catalán, H. Norppa, R. Marcos, Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* 341 (1995) 169–184.
- [14] G. Ribas, J. Surrallés, E. Carbonell, A. Creus, N. Xamena, R. Marcos, Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes, *Mutat. Res.* 416 (1998) 93–99.
- [15] J. Jurado, C. Pueyo, Role of classical nitroreductase and *O*-acetyltransferase on the mutagenicity of nifurtimox and eight derivatives in *Salmonella typhimurium*, *Environ. Mol. Mutagen.* 26 (1995) 86–93.
- [16] A.K. Debnath, C. Hansch, K.H. Kim, Y.C. Martin, Mechanistic interpretation of the genotoxicity of nitrofurans (antibacterial agents) using quantitative structure–activity relationships and comparative molecular field analysis, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 1007–1016.
- [17] A. Ramos, A. Vizoso, A. Edreira, J. Betancourt, M. Decalo, Activity of nitroalkene derivative, 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene, in *Salmonella*/microsome assay and the mouse bone marrow micronucleous test, *Mutat. Res.* 390 (1997) 233–238.
- [18] J.F. Hatcher, K. Yamamoto, M. Ichikawa, G.T. Bryan, S. Swaminathan, Metabolic reduction of novel 3,4-dichloro-5-nitrofurans in *Salmonella typhimurium*, *Environ. Mol. Mutagen.* 25 (1995) 58–66.
- [19] H.R. Skeggs, R.M. Berglund, W.J.A. VandenHeuvel, H. Mrozik, P.G. Wislocki, F.J. Wolf, Effect of liver enzymes on the mutagenicity of nitroheterocyclic compounds: activation of 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-3-(1-methyl-5-nitro-1-H-imidazol-2-yl)-1,2-benzisoxazole and deactivation of nitrofurans and nitroimidazoles in the Ames test, *Mutat. Res.* 136 (1984) 1–8.

3.2. ARTÍCULO N° 3

Genotoxicity testing of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene in cultured human lymphocytes

Jorge I. González Borroto, Giselle Pérez, Amadeu Creus, Ricard Marcos

Food and Chemical Toxicology 42 (2004) 187–193



Genotoxicity testing of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene in cultured human lymphocytes

Jorge I. González Borroto, Giselle Pérez¹, Amadeu Creus, Ricard Marcos*

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Received 26 May 2003; accepted 11 August 2003

Abstract

The genotoxic potential of the compound 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (G-1) was evaluated in peripheral blood lymphocytes cultured *in vitro*, at concentrations ranging from 1 to 20 $\mu\text{g/ml}$. Micronuclei (MN) and sister-chromatid exchanges (SCE) were scored as biomarkers of genotoxic effects. To detect the role of metabolic enzymes on the genotoxicity of this furylethylene derivative, cultures for MN and SCE demonstrations were treated for 3 h with and without the S9 microsomal fraction as well as for 48 h without S9. Under the conditions of the study, the test agent did not induce significant increases in the frequency of micronucleated cells, irrespective of the presence/absence of the metabolic fraction. Nevertheless, a slight/moderate increase in the SCE frequency was observed in those cultures treated without the S9 mix. In addition, cytotoxic/cytostatic effects of the G-1 compound were observed mainly in cultures without S9 fraction, as indicated by the reduction of cell proliferation measured by the cytokinesis block proliferation index (CBPI) and the proliferative rate index (PRI).

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nitrofurans; 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene; Human lymphocytes; Micronucleus; Sister-chromatid exchanges

1. Introduction

Different 2-substituted 5-nitrofurans derivatives have been widely used in human and veterinary medicine as antimicrobial agents, as well as in food preservatives and additives (IARC, 1974; Gajewska et al., 1990; Jurado and Pueyo, 1995). Several of these compounds have proved to be genotoxic in bacteria and mammalian cells and to present tumorigenic capacity in experimental animals. Nevertheless, and in spite of this proved genotoxic potential, several nitrofurans are still in use, as i.e.: nifuratel, nifuroxime, nifurtimox and nitrofurantoin (McCalla, 1983; Ni et al., 1987; Hamilton-Miller, 1997).

The mutagenic and carcinogenic properties shown by several aromatic nitro compounds in general, and by

some nitrofurans in particular, limited the extensive use of furylethylene compounds, mainly the group of 5-nitrofurans. Nevertheless, further studies demonstrated that the presence of a nitro group at position 5 of the furan ring is not a necessary condition for the development of the antimicrobial activity of 2-furylethylenes. Thus, other derivatives can be synthesised to prove whether or not genotoxicity can be avoided without loss of their biological properties (Estrada, 1998).

We have studied the genotoxicity of different furylethylene derivatives where the main structural characteristic is that the nitro group is not attached to the furan ring. In these novel compounds the nitro group is situated at the exocyclic double bond present in the ethylenic chain, and many of them present interesting biological properties. The furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (G-1) is one of the novel synthesised 2-furylethylene compounds having the nitro group at position β of the exocyclic double bond. This compound has shown

* Corresponding author. Tel.: +34-93-5812052; fax: +34-93-5812387.

E-mail address: ricard.marcos@uab.es (R. Marcos).

¹ Present address: Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba.

to have important antibacterial and antifungal activities, both in vitro and in vivo (Castañedo, 1993).

Previous genotoxicity studies carried out with the G-1 compound by Ramos et al. (1997) demonstrated that it is a direct mutagen in TA 98 and TA100 strains in the Ames test. The response was lowered in presence of metabolic activation, and a further decrease in the mutagenicity was observed in strain TA 100NR (nitroreductase deficient) when compared to the parental TA 100. The in vivo micronucleus assay in male mice showed a weak response at doses ranging from 10 to 17.5 mg/kg at the second sampling (48 h). A significant rise in the micronuclei count was obtained at 20 mg/kg, which is higher than the 60% of LD₅₀, causing severe toxic signs and inducing mortality in the treated animals.

To obtain more data about the genotoxic potential associated with the nitro group attachment in these types of 2-furylethylene derivatives, we have conducted the in vitro micronucleus and sister chromatid exchanges tests in human lymphocytes with the compound G-1. Both these parameters have proved to be good indicators of genotoxic effects (Fenech and Morley, 1985; Van Hummelen and Kirsch-Volders, 1992; Fenech, 1993; Surrallés and Natarajan, 1997; Kirsch-Volders et al., 2000).

2. Materials and methods

2.1. Donors and collection of blood samples

The study was carried out using blood samples from two healthy, non-smoking male donors, aged 28 and 30 years. Approximately, 20 ml of blood was collected, by venipuncture, into syringes containing sodium heparin as anticoagulant. Blood was taken the same day of the initiation of the experiment between 09:00 and 09:30 to minimise possible confounding effects of dietary factors.

2.2. Test chemicals

The test chemical 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (G-1) (Fig. 1) used in the study was synthesised at the Centro de Bioactivos Químicos (CBQ, Villa Clara, Cuba). Purity (99.53%) was established by high-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis. The same range of concentrations of the test agent (1, 5, 10, 15 and 20 µg/ml) was used for both the MN and SCE assays, with and without metabolic activation. This range was chosen by taking into account the survival

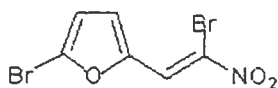


Fig. 1. Structure of 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (G-1).

and the general cytotoxic/cytostatic effects found in a previous dose-range study. The test agent was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, CAS No. 67-68-5, Panreac, Barcelona, Spain) at a final volume in culture of 1% of the total, which was also tested as solvent control. In the cultures without metabolic activation, the positive control for testing MN was mitomycin C (MMC, CAS No. 50-07-7, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA), at 0.67 and 0.067 µg/ml for treatments lasting 3 and 48 h, respectively. For cultures with metabolic activation, cyclophosphamide (CP, CAS No. 6055-19-2, Sigma), at 28 µg/ml was used. For SCE in cultures without metabolic activation, MMC at 0.17 and 0.033 µg/ml was used for treatments of 3 and 48 h, respectively, whilst in cultures with metabolic activation 1.4 µg/ml CP was used.

2.3. Metabolic activation

The metabolic activation fraction used was S9 from male Sprague–Dawley rat treated with phenobarbital–BNF mixture (protein 34.82 mg/ml) and was obtained from CRIFFA (Barcelona, Spain). The S9 mix freshly prepared, consisted of 1 ml of S9, 0.33 ml of 1 M KCl, 0.32 ml of 0.25 M MgCl₂ · 6 H₂O, 0.25 ml of 0.2 M glucose-6-phosphate, 1 ml of 0.04 M NADP, 2.10 ml of distilled water and 5 ml of phosphate buffer (pH 7.4).

2.4. Lymphocyte cultures

2.4.1. MN and SCE assays

Two blood cultures were established for each genetic endpoint and concentration. Cultures were established following the methodology standardised in our laboratory (Surrallés et al., 1992; González Borroto et al., 2001).

The cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) was carried out using the standard technique proposed by Fenech (1993) with slight modifications following the methodology established in our laboratory and described in previous works (Surrallés et al., 1994; González Borroto et al., 2001). For SCE demonstration, the experiments were conducted in the same manner as we recently reported (González Borroto et al., 2001, 2002). Staining was performed according to the fluorescence plus Giemsa method (Perry and Wolf, 1974).

The same procedures were used for the assays conducted in presence/absence of metabolic activation. In the case of cultures with metabolic activation, 24 h after the initiation of cultures, 0.5 ml of S9 mix was added together with the test agent. After an incubation period of 3 h at 37 °C, the test chemical and S9 mix were removed from the culture. Concurrent cultures, treated 3 h without activating system, were set up. The pellet of lymphocytes was washed twice with 5 ml of RPMI 1640 medium and resuspended in complete medium and the cultures were incubated for 72 h at 37 °C.

2.5. Microscopic observation

All slides were coded prior to scoring. MN and SCE scoring was carried out by the same person using a Leitz–Leica light microscope at 1000× magnification under oil immersion. The criteria for scoring micronuclei (MN) was as described by Fenech (1993) and recently reviewed by Kirsch-Volders et al. (2000).

Five-hundred cells were scored to evaluate the percentage of cells with 1, 2, 3 and 4 nuclei. The number of MN in 1000 binucleated (BN) cells was scored for each treatment and the number of BN cells with MN was also recorded. A cytokinesis block proliferation index (CBPI) was calculated according to the formula:

$$CBPI = (M_I + 2 M_{II} + 3(M_{III} + M_{IV}))/N,$$

where M_I to M_{IV} represent the number of cells with one to four nuclei, respectively, and N is the number of cells scored (Surrallés et al., 1995).

For the SCE analysis, 50 metaphases of second division were examined for each treatment and donor. A further 100 metaphases for each concentration were also scored to determine the proportion of cells that had undergone one, two and three divisions. The proliferative rate index (PRI) was calculated following the expression:

$$PRI = (M_1 + 2M_2 + 3M_3)/N,$$

where M_1 , M_2 and M_3 indicate those metaphases corresponding to first, second and third division and N the total number of metaphases scored (Lamberti et al., 1983).

2.6. Statistical analyses

Data for the BN cells with MN were compared for each treatment using the one-tailed Fisher's exact test. The Chi-square test was used for the analysis of CBPI and PRI among each treatment. For the statistical analysis of SCE, the normality of the distribution of SCE scores was assessed by means of the Kolmogorov–Smirnov test of goodness of fit; in cases where the SCE data departed from normality, they were transformed using a logarithmic transformation of the variable SCE. Then the parametric t -test for independent samples was used. The equality of variances was verified with the Levene's test. Statistical decisions were made with a significance level of 0.05.

3. Results

The results obtained in the study on the induction of MN by using the cytokinesis-block micronucleus

technique, with and without S9 fraction, are shown in Tables 1 and 2. The results obtained, both with and without metabolic activation, after the treatment of cultures with the compound G-1, indicate that this furylethylene derivative does not induce MN formation under the current assay conditions. The frequency of binucleated cells with micronuclei (BNMN) never reached significantly different values when the treatment groups were compared with the vehicle control.

It must be indicated that clear cytotoxic/cytostatic effects of the test agent were observed. As can be seen in the tables, the CBPI values decreased with increasing doses of G-1, attaining statistical significance at several concentrations. In cultures without S9 mix and treated with the test compound for 3 and 48 h, clear cytotoxic/cytostatic dose-related effects, mainly at higher doses, were observed. The concentration of 20 µg/ml was impossible to score in the 48 h treatment in donor (B); and in the treatment lasting 3 h in donor (A) the doses of 15 and 20 µg/ml were impossible to score due to the cytotoxic/cytostatic effects of the G-1 compound.

Table 1
Induction of micronuclei (MN) and CBPI values in human lymphocyte cultures treated with G-1 for 48 h, and for 3 h with and without S9 fraction. Donor A^a

Treatment	Concentration (µg/ml)	MN	BNMN	%BN	CBPI
48 h	DMSO (1%)	11	11	55.4	1.79
	1	13	13	50.8	1.65***
	5	13	11	54.8	1.69*
	10	9	9	47.6	1.57***
	20	13	13	41.2	1.48***
	MMC (0.067)	87	84***	38.2	1.44***
	3 h (–S9)	DMSO (1%)	8	8	57.6
1		9	8	54.4	1.91
5		9	9	55.2	1.78
10		7	7	43.6	1.52***
15		– ^b	– ^b	– ^b	– ^b
20		– ^b	– ^b	– ^b	– ^b
MMC (0.67)		119	113***	48.8	1.61***
3 h (+S9)	DMSO (1%)	14	11	54.2	1.99
	1	6	6	62.4	1.95*
	5	10	9	57.6	1.89*
	10	13	13	55.2	1.86**
	15	10	8	47.6	1.71***
	20	14	14	49.2	1.63***
	CP (28)	77	72***	34.8	1.45***

One-tailed Fisher's exact test for BNMN and Chi-square test for CBPI.

^a MN, total MN; BN, binucleated; BNMN, binucleated cells with one or more micronuclei; %BN, percentage of BN cells; CBPI, cytokinesis-block proliferation index.

^b Cytotoxic/cytostatic.

* $P \leq 0.05$.

** $P \leq 0.01$.

*** $P \leq 0.001$.

Table 2
Induction of micronuclei (MN) and CBPI values in human lymphocyte cultures treated with G-1 for 48 h, and for 3 h with and without S9 fraction. Donor B^a*

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	MN	BNMN	%BN	CBPI
48 h	DMSO (1%)	13	12	60.4	1.81
	1	16	13	59.6	1.78
	5	12	12	47.0	1.56***
	10	16	13	46.4	1.50***
	20	_b	_b	_b	_b
	MMC (0.067)	48	47***	52.0	1.63***
3 h (-S9)	DMSO (1%)	7	6	57.8	1.84
	1	10	10	62.8	1.86
	5	13	9	61.4	1.74***
	10	10	8	54.4	1.64***
	15	4	4	53.4	1.57***
	20	9	9	44.0	1.48***
MMC (0.67)	76	74***	55.8	1.63***	
3 h (+S9)	DMSO (1%)	8	8	66.2	1.92
	1	7	7	60.4	1.86
	5	7	6	59.6	1.80**
	10	10	9	54.8	1.79***
	15	10	8	60.0	1.88
	20	5	5	53.8	1.64***
CP (28)	69	65***	26.0	1.28***	

One-tailed Fisher's exact test for BNMN and Chi-square test for CBPI.

^a MN, total MN; BN, binucleated; BNMN, binucleated cells with one or more micronuclei; %BN, percentage of BN cells; CBPI, cytotoxicity-block proliferation index.

^b Cytotoxic/cytostatic.

* $P \leq 0.05$.

** $P \leq 0.01$.

*** $P \leq 0.001$.

On the other hand, in cultures with S9 mix, a reduction of the cytotoxic/cytostatic effects of the test agent was observed. Although the CBPI values decreased with the treatment, the doses of 15 and 20 $\mu\text{g/ml}$ could be evaluated in the two donors studied. This would indicate a possible detoxification mechanism or the possibility that the metabolic enzymes present in the S9 fraction exert a deactivation over this furylethylene derivative, by which these enzymes lead to the formation of species with lower cytotoxic/cytostatic effects, as well as with lower genotoxic effects.

Tables 3 and 4 show the frequencies of SCE and the PRI values obtained after the treatment with the G-1 compound. The analysis of the results obtained from the different experimental conditions indicates that this compound has a slight/moderate SCE inducing capacity. The test agent produced an increase in the frequencies of SCE, both with and without metabolic activation, although, in general, the increases were observed in the treatments without S9. It must be indicated that the highest SCE increases were mainly observed at the highest concentrations tested, in which a significant reduction in the PRI values was obtained.

Table 3
Frequencies of sister-chromatid exchanges (SCE) and proliferative rate indices (PRI) in cultured human lymphocytes treated with G-1. Donor A^a

Treatment	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	SCE/cell \pm SE	PRI
48 h (-S9)	DMSO (1%)	7.00 \pm 0.46	2.10
	1	7.48 \pm 0.43	2.05
	5	7.78 \pm 0.52	1.88***
	10	8.38 \pm 0.49*	1.79***
	15	7.94 \pm 0.43	1.75***
	20	7.80 \pm 0.50	1.37***
MMC (0.033)		28.30 \pm 0.97***	1.83***
3 h (-S9)	DMSO (1%)	6.82 \pm 0.48	1.47
	5	7.86 \pm 0.45	1.98
	10	6.98 \pm 0.47	1.78
	15	8.30 \pm 0.51*	1.33**
	20	_b	_b
	MMC (0.17)		17.62 \pm 0.69***
3 h (+S9)	DMSO (1%)	7.22 \pm 0.44	1.97
	5	7.48 \pm 0.50	1.97
	10	7.38 \pm 0.44	1.83
	15	8.34 \pm 0.45	1.87
	20	9.20 \pm 0.60**	1.49***
	CP (1.4)		16.36 \pm 0.95***

t-test with Levene's test for SCE; Chi-square test for PRI.

^a A total of 50 second division metaphases were scored for each concentration.

^b Cytotoxic/cytostatic.

* $P \leq 0.05$.

** $P \leq 0.01$.

*** $P \leq 0.001$.

In the experiments with S9 mix, a slight tendency to reduce the SCE values was observed. It can therefore be considered that the presence of S9 mix reduces and/or eliminates the possible genotoxicity of this furylethylene derivative.

With respect to the cytotoxic/cytostatic effects of the compound, when the two methods for measuring these effects (CBPI and PRI) were compared, a general trend could be seen. The cytotoxic/cytostatic effects were mainly found at doses higher than 15 $\mu\text{g/ml}$; however, in both assays when the test agent was tested in the presence of S9 fraction, a reduction in the cytostatic effects was found. All these results indicate the possible detoxification of the test agent by the metabolism of S9 mix enzymes. This decrease in the cytotoxic/cytostatic effects is accompanied by a reduction in the genotoxic potential of the test agent G-1, as can be seen by the increase in SCE frequencies.

4. Discussion

A large number of aromatic amines and nitro-compounds are still used in industrial processes (Haack et al., 2001). As indicated before, nitrofurans are an

Table 4
Frequencies of sister-chromatid exchanges (SCE) and proliferative rate indices (PRI) in cultured human lymphocytes treated with G-I. Donor B^a

Treatment	Concentration (µg/ml)	SCE/cell ± SE	PRI
48 h (-S9)	DMSO (1%)	6.38 ± 0.41	1.94
	1	5.60 ± 0.37	1.84
	5	6.52 ± 0.40	1.71*
	10	6.84 ± 0.38	1.68***
	15	7.02 ± 0.39	1.71**
	20	— ^b	— ^b
	MMC (0.033)	17.66 ± 0.62***	1.89
3 h (-S9)	DMSO (1%)	6.16 ± 0.37	2.34
	5	7.60 ± 0.49*	2.28
	10	7.42 ± 0.49*	1.93***
	15	7.52 ± 0.37*	1.64***
	20	9.20 ± 0.50***	1.40***
	MMC (0.17)	14.44 ± 0.60***	2.41
3 h (+S9)	DMSO (1%)	6.38 ± 0.40	2.26
	5	6.66 ± 0.42	2.31
	10	6.86 ± 0.39	2.24
	15	7.90 ± 0.38****	2.07*
	20	7.02 ± 0.38	2.03**
	CP (1.4)	17.62 ± 0.79***	2.28

t-test with Levene's test for SCE; Chi-square test for PRI.

^a A total of 50 second division metaphases were scored for each concentration.

^b Cytotoxic/cytostatic.

* $P \leq 0.05$.

** $P \leq 0.01$.

*** $P \leq 0.001$.

important group of chemicals used today as antimicrobial agents in human and veterinary medicine, even though mutagenic and carcinogenic properties have been shown for several of these compounds (McCalla, 1983; Ni et al., 1987; Hamilton-Miller, 1997). Due to the fact that the presence of a nitro group at position 5 of the furan ring is not a necessary condition to reach antimicrobial activity of 2-furylethylenes, some derivatives with the nitro group outside the furan ring have been synthesised. Among them, the G-I derivative tested in our work has shown interesting biological properties. Nevertheless, the genotoxic evaluation of this class of chemicals and the assessment of their genotoxic risk is still important.

There is clear evidence for the possible detoxification of nitrofurans when they are evaluated in presence of activating metabolic systems or in in vivo studies (Murthy and Najaria, 1980; McCalla, 1983; Skeggs et al., 1984; Gajewska et al., 1990; González Borroto et al., 2001–2003; Suter et al., 2002). Differences between the behaviour of nitrofurans and other nitroaromatic compounds have been reported, such as the unusual ring opening that occurs in nitrofurans when they are susceptible to reduction, forming an inactive saturated nitrile (Debnath et al., 1993). Although the genotoxic

mechanism of action of some 5-nitrofurans still remains unelucidated (Rahden-Staron et al., 2001), the mutagenicity of several aromatic nitrocompounds is thought to be induced by chemical modification of deoxyribonucleic acid (DNA), resulting from an electrophilic attack of an activated nitrogen intermediate, at the purine bases of DNA. The reactive electrophilics are supposed to be generated by two reduction steps from a nitroarene leading first to the corresponding nitroso compound and subsequently to the hydroxylamine, which is further activated by *O*-acetylation, *O*-sulfatation or *O*-protonation (Haack et al., 2001). At the same time, it should be pointed out that a low electronic density on carbon atom 2 of the furan ring (C2) could promote the loss of potential nitrenium ion formation and, therefore, reduce the genotoxicity of some nitro-furan derivatives (Debnath et al., 1993).

Although the furylethylene derivatives with the nitro group coupled outside the furan ring are isomers of the 5-nitrofurylethylene derivatives, their structural differences can produce significant changes in the physico-chemical, chemical and biological properties and thus in their genotoxicity (Estrada, 1998; González Borroto et al., 2001–2003). There are several experimental data showing that only those derivatives with the nitro group in position 5 of the furan ring are mutagenic, and the substitution of this functional group results in the loss of mutagenic activity (McCalla, 1983; Sturdik et al., 1985). Besides, studies on the analysis of the electronic molecular structure of 2-furylethylene derivatives, using a molecular orbital method, showed marked electronic differences among nitro groups at different positions from the 2-furylethylene framework. The nitro group at position 5 of the furan ring is more sensitive to reduction in biological media than those groups at position β of the exocyclic double bond. Due to this fact, some compounds with the nitro group at the exocyclic double bond were classified as non-mutagenic with over 90% probability (Estrada, 1998). Hatcher et al. (1995) studying the metabolic reduction of novel 3,4-dichloro-5-nitrofurans in *Salmonella typhimurium* found that some compounds could produce oxime and amine derivatives which were non-mutagenic at doses up to about 100 µg/ml.

The results obtained with the G-I compound also agree with our recently reported data on the in vitro and the in vivo genotoxicity of two other furylethylene derivatives chemically related [2-furyl-1-nitroethene (G-0)] and [1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (2- β NF)]. These derivatives were considered slightly genotoxic in the in vitro SCE assay and the weak increase obtained in the frequency of SCE disappeared in presence of S9 mix. On the other hand, the in vivo micronucleus study in mouse bone marrow of mice with the G-0 compound showed negative results at the doses assayed, and at both sampling times (González Borroto et al., 2001–2003).

Other studies with the G-1 compound using the *Salmonella*/microsome assay and the micronucleus test in bone marrow of mice produced comparable results with our data (Ramos et al., 1997). A direct mutagenic activity of the product was observed in *Salmonella* TA98 and TA100 strains in absence of the S9 mix. The mutagenic response was lowered when exogenous metabolic activation (S9) was used, and it was necessary to increase the dose of the G-1 compound up to almost 10-fold in the assay with S9 fraction to obtain a positive response. In the MN assay, when the compound was administered twice with an interval of 24 h between administrations at a dose of 16 mg/kg, a strong cytotoxicity was seen in the bone marrow of mice, but no effect on the frequency of micronuclei was detected. When this nitroalkene derivative was given in a single administration to male mice in a dose range of 10–20 mg/kg, and two samplings 24 and 48 h later were done, the results of the micronucleus test showed a weak response at the 48 h sampling, with MN being elevated by a factor of 2.6 at doses of 15 and 17.5 mg/kg, although the frequency obtained was within the normal range reported for CD-1 mice (Krishna et al., 2000). At the higher dose of 20 mg/kg a sudden rise in MN was observed for both sampling times, but at this dose the compound showed a high toxicity: one dead animal was registered and other signs of toxicity were observed in the treated animals.

Recently, Slapsyte et al. (2002) reported the results of cytogenetic testing of the classic 5-nitrofurantoin in vitro in human lymphocytes, at concentrations of 20 and 40 μ M, showing the induction of both chromosome aberrations and SCE. In addition, these authors studied the effects of nitrofurantoin, used for a long-term (1–12 months) antimicrobial prophylaxis of urinary tract infection in children, and no statistically significant increases in chromosome aberrations and SCE frequencies were detected in the treated children, indicating a possible in vivo detoxification.

Taking into account our results together with the data previously mentioned, it might be expected that the genotoxicity of the furylethylene derivative G-1 is related mainly with cytotoxic effects. According to our data, we conclude that the G-1 compound could be considered as a slight/moderate SCE inducer agent, mainly at cytotoxic doses and in the absence of metabolic activating systems. Low genotoxic effects would be expected for this kind of 2-furylethylene derivatives and, therefore, it may be possible to determine a safe dose range for therapeutical use. Taking into account that in our study it was not possible to evaluate concentrations leading to a reduction of near 50% in the CBPI (MN data) and in the PRI (SCE data), a genotoxic potential of G-1 cannot be excluded. On the other hand, further genotoxicity studies measuring other types of DNA damage, both in vitro and in vivo, are still necessary.

Acknowledgements

This investigation was partially funded by the Generalitat de Catalunya (2002 SGR-00197). Jorge I. González was supported during this work by a fellowship from the MUTIS program of the Spanish Agency of International Co-operation. We thank G. Umbert for her expert technical help and M. McCarthy for her secretarial assistance. We also want to thank Dr. Nilo Castañedo from CBQ (Villa Clara, Cuba) for kindly supplying the G-1 compound.

References

- Castañedo, N., 1993. Registro del Queratofural 211 (93).
- Debnath, A.K., Hansch, C., Kim, K.H., Marti, Y.C., 1993. Mechanistic interpretation of the genotoxicity of nitrofurans (antibacterial agents) using quantitative structure–activity relationships and comparative molecular field analysis. *Journal of Medicinal Chemistry* 36, 1007–1016.
- Estrada, E., 1998. Structure–mutagenicity relationships in 2-furylethylene derivatives. A molecular orbital study of the role of nitro groups. *Mutation Research* 420, 67–75.
- Fenech, M., 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research* 285, 35–44.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* 147, 29–36.
- Gajewska, J., Szczypka, M., Tudek, B., Szymczyk, T., 1990. Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone. *Mutation Research* 232, 191–197.
- González Borroto, J.I., Creus, A., Marcos, R., 2001. Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in cultured human lymphocytes. *Mutation Research* 497, 177–184.
- González Borroto, J.I., Creus, A., Marcos, R., 2002. Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene in cultured human lymphocytes. *Mutation Research* 519, 179–185.
- González Borroto, J.I., Creus, A., Marcos, R., Mollà, R., Zapatero, J., 2003. The mutagenic potential of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in the mouse bone marrow micronucleus test. *Toxicological Sciences* 72, 359–362.
- Haack, T., Erdinger, L., Boche, G., 2001. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA100 of nitroso and respective hydroxylamine compounds. *Mutation Research* 491, 183–193.
- Hamilton-Miller, J.M.T., 1997. Nitrofurans. In: O'Grady, F., Lambert, H.P., Finch, R.G., Greenwood, D. (Eds.), *Antibiotic and Chemotherapy*, seventh ed. Churchill Livingstone, London, pp. 396–403.
- Hatcher, J.F., Yamamoto, K., Ichikawa, M., Bryan, G.T., Swaminathan, S., 1995. Metabolic reduction of novel 3,4-dichloro-5-nitrofurans in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 25, 58–66.
- IARC Monographs, 1974. Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man: Some Anti-Thyroid and Related Substances. Vol. 7, Nitrofurans and Industrial Chemicals. IARC, Lyon, France.
- Jurado, J., Pueyo, C., 1995. Role of classical nitroreductase and O-acetyltransferase on the mutagenicity of nifurtimox and eight derivatives in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 26, 86–93.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W., Wakata, A., 2000. Report from the

- in vitro micronucleus assay working group. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 167–172.
- Krishna, G., Urda, G., Paulissen, J., 2000. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutation Research* 453, 45–50.
- Lamberti, L., Bigatti Ponzetto, P., Ardito, G., 1983. Cell kinetics and sister-chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Mutation Research* 120, 193–199.
- McCalla, D.R., 1983. Mutagenicity of nitrofurans derivatives: review. *Environmental Mutagenesis* 5, 745–765.
- Murthy, M.S.S., Najaria, K.B., 1980. Deactivation of furyl furamide (AF-2) by rat-liver microsomes and its implication in short-term test for mutagenicity/carcinogenicity. *Mutation Research* 77, 127–134.
- Ni, Y.-C., Heflich, R.H., Kadlubar, F.F., Fu, P.P., 1987. Mutagenicity of nitrofurans in *Salmonella typhimurium* TA98, TA98NR and TA98/1,8-DNP₆. *Mutation Research* 192, 15–22.
- Perry, P., Wolf, S., 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156–158.
- Rahden-Staron, I., Czebot, H., Szumilo, M., 2001. Induction of rat liver cytochrome P450 isoenzymes CYP1A and CYP2B by different fungicides, nitrofurans, and quercetin. *Mutation Research* 498, 57–66.
- Ramos, A., Vizoso, A., Edreira, A., Betancourt, J., Décalo, M., 1997. Activity of nitroalkene derivative, 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene, in *Salmonella*/microsome assay and the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutation Research* 390, 233–238.
- Skeggs, H.R., Berglund, R.M., VandenHeuvel, W.J.A., Mrozik, H., Wislocki, P.G., Wolf, F.J., 1984. Effect of liver enzymes on the mutagenicity of nitroheterocyclic compounds: activation of 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-3-(1-methyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-1,2-benzisoxazole and deactivation of nitrofurans and nitroimidazoles in the Ames test. *Mutation Research* 136, 1–8.
- Slapsyte, G., Jankauskiene, A., Mierauskienė, J., Lazutka, J.R., 2002. Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of children treated with nitrofurantoin for recurrent urinary tract infection. *Mutagenesis* 17, 31–35.
- Sturdik, E., Rosenberg, M., Stibranyi, L., Balaz, S., Chreno, O., Ebringer, L., Ilavsky, D., Vegh, D., 1985. Structure–mutagenicity relationships of 5-nitro-2-furylethylenes in *Salmonella typhimurium* TA 98. *Chemico-Biological Interactions* 53, 145–153.
- Surrallés, J., Natarajan, A.T., 1997. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutation Research* 392, 165–174.
- Surrallés, J., Antocchia, A., Creus, A., Degraffi, F., Peris, F., Tanzarella, C., Xamena, N., Marcos, R., 1994. The effect of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. Results from two laboratories. *Mutagenesis* 9, 347–353.
- Surrallés, J., Carbonell, E., Marcos, R., Degraffi, F., Antocchia, A., Tanzarella, C., 1992. A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 7, 407–410.
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalán, J., Norppa, H., Marcos, R., 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated lymphocytes cultures. *Mutation Research* 341, 169–184.
- Suter, W., Hartmann, A., Poetter, F., Sugeldorff, P., Hoffmann, P., Murtus, H.-J., 2002. Genotoxicity assessment of the antiepileptic drug AMP397, and Ames-positive aromatic nitro compound. *Mutation Research* 518, 181–194.
- Van Hummelen, P., Kirsch-Volders, M., 1992. Analysis of eight known or suspected aneugens by the *in vitro* human lymphocyte micronucleus test. *Mutagenesis* 7, 447–455.

3.3. ARTÍCULO N° 4

Comparative genotoxic evaluation of 2-furylethylenes and 5-nitrofurans by using the comet assay in TK6 cells

Jorge I. González Borroto, Giselle Pérez Machado, Amadeu Creus, Ricard Marcos

Mutagenesis vol. 20 no. 3 pp. 193–197, 2005

Comparative genotoxic evaluation of 2-furylethylenes and 5-nitrofurans by using the comet assay in TK6 cells

Jorge I. González Borroto, Giselle Pérez Machado, Amadeu Creus and Ricard Marcos*

Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

The genotoxicity of three 2-furylethylene derivatives and four 5-nitrofurans was evaluated by using the comet assay in human lymphoblastoid cultured TK6 cells. The 2-furylethylene derivatives were 2-furyl-1-nitroethene, 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene and 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene, while the 5-nitrofurans were nitrofurantoin, nitrofurazone, furazolidone and 5-nitro-2-furanacrolein. The treatments lasted for 3 h in the absence of metabolic activation. No genotoxic effects were observed for two of the 2-furylethylene compounds, while the derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene showed a statistically significant response mainly at the highest concentration tested; this effect was considered biologically relevant and the compound was classified as slightly genotoxic. On the other hand, for the classical 5-nitrofurans tested there is a tendency towards a dose-related increase of the DNA damage in the comet assay and the observed increases for the parameters analysed (Olive tail moment, tail % DNA and tail length) were significant for all compounds. Then, the four 5-nitrofurans tested were considered genotoxic. These results show that the position of the nitro group influences the genotoxicity of the assayed compounds. Thus, in this comet assay, the 2-furylethylene derivatives having the nitro group attached outside the furan ring appear to be much less genotoxic than the 5-nitrofurans.

Introduction

It has been shown that different 2-furylethylene derivatives possess interesting biological properties and potent microbicidal activity (1,2). Thus, these novel synthetic compounds have been proposed for their possible use in human and veterinary medicine.

Although these derivatives are not properly nitrofurans, the 2-furylethylene compounds with the nitro group located outside the furan ring are isomers of position of the classical 5-nitrofurans derivatives. Nevertheless, and contrary to the well-known genotoxicity of the 5-nitrofurans, the 2-furylethylene derivatives are considered not genotoxic (3). To test this hypothesis, our group has focused its efforts on the genotoxic evaluation of several 2-furylethylene derivatives by using different well-known *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays (4–8). The results of our studies showed the lack of genotoxicity in the *in vitro* and *in vivo* assays evaluating the induction of micronuclei. Nevertheless, slight increases in the

sister chromatid exchanges (SCE) frequencies have been found mainly in the absence of the S9 microsomal fraction in the *in vitro* assays (4,5,7).

To confirm the different genotoxic potential of 2-furylethylene and 5-nitrofurans compounds, and bearing in mind their structural differences, mainly due to the position of the nitro group, we have measured the induction of DNA breakage by several compounds belonging to both families of chemicals.

DNA damage induction has been evaluated by means of the single cell gel electrophoresis assay, also called the comet test. This assay is considered a rapid, simple and sensitive technique for measuring DNA damage (9). In *in vitro* studies, it has emerged as a very sensitive method for detecting the genetic damage induced by different genotoxic agents such as radiation (10), pesticides (11) and arsenic compounds (12), as well as for examining DNA repair under a variety of experimental conditions (13). With the alkaline (pH > 13) version of the assay, effects such as DNA single-strand breaks (SSB), alkali-labile sites and SSB associated with incomplete excision repair sites can be easily analysed by the DNA that migrates out of the cell nucleus (9).

Materials and methods

Cells used

The study was carried out using an established human lymphoblastoid cell line (TK6). This is a standard cell line with a stable karyotype, usually used in mutagenicity studies. The cells were maintained in suspension culture in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1 mM pyruvate, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 2.5 IU/ml amphotericin B. The cultures were incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator at 95% humidity.

Chemicals

The 2-furylethylene derivatives, 2-furyl-1-nitroethene (G-0, purity 96.38%), 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (2-βNF, purity >96%) and 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (G-1, purity 99.53%) used in the study were synthesized at the Centro de Bioactivos Químicos (CBQ, Villa Clara, Cuba). The 5-nitrofurans used in the study were nitrofurantoin (NFT, purity >99%), nitrofurazone (NFA, purity >99%), furazolidone (FZ, purity 98%) and 5-nitro-2-furanacrolein (5-FAC, purity 97%) and were obtained from Sigma (Barcelona, Spain) (Figure 1).

Treatments

Preliminary cytotoxicity assays were conducted using similar conditions to those used in the main study. They were carried out to determine the toxicity of the selected chemicals and to choose the concentrations to be used in the genotoxicity experiments.

Aliquots of 1 ml of cell suspension (10⁶ TK6 cells) in RPMI 1640 medium were dispensed into eppendorf tubes. Two replicate cultures for concentration in each of the two experiments were established. All tested compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Panreac, Barcelona, Spain) just prior to treatment at the correct concentrations. DMSO was also tested as solvent control.

Aliquots of 10 µl of each treatment solution were added to the cultures and cells were incubated for 3 h at 37°C. The positive control group was treated with 10 µl of hydrogen peroxide (H₂O₂, Sigma, Barcelona, Spain) at a concentration of 2000 µM. After treatment, the cells were pelleted and

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 93 581 2052; Fax: +34 93 581 2387; Email: ricard.marcos@uab.es

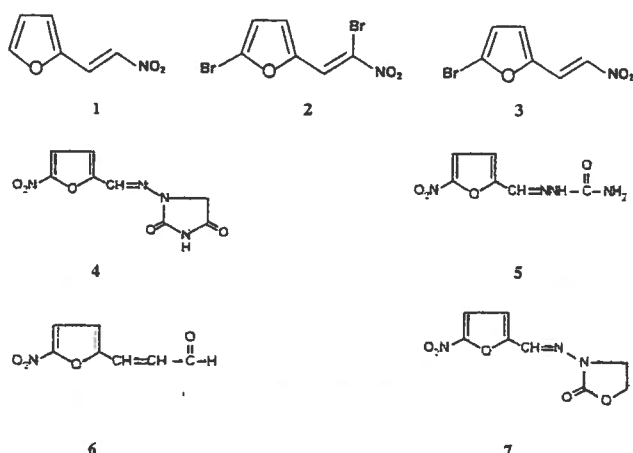
J.I.González Borroto *et al.*

Fig. 1. Chemical structures of the tested compounds. 1: G-0; 2: G-1; 3: 2- β NF; 4: NFT; 5: NFA; 6: 5-FAC; and 7: FZ.

washed twice in fresh RPMI 1640 medium and, finally, resuspended in 0.25 ml of fresh medium for the comet assay.

Cell viability was assessed, as soon as possible, after the treatments with a mix of fluorescein diacetate and ethidium bromide (EtBr) (14). Two hundred cells were scored for each concentration. The viability at the highest selected dose was >70%, which agrees with the usual testing conditions used and recommended for the comet assay (9,15).

Comet assay

The comet assay was performed, as previously described (16), with minor modifications. The cell samples (~40 000 cells in 20 μ l) were carefully resuspended in 75 μ l of 0.5% low melting point agarose (LMA), layered onto microscope slides pre-coated with 150 μ l of 0.5% normal melting point agarose (dried for 10 min at 65°C) and spread with a coverslip. After solidification (for 10 min at 4°C) and removal of the coverslip, 75 μ l of 0.5% LMA was again added to the slides, covered and kept for 15–20 min at 4°C. Then the coverslips were removed and the slides were immersed in cold fresh lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100 and 1% lauroylsarcosinate, pH 10) for 2 h at 4°C in a dark chamber. To avoid additional DNA damage, the following steps were performed under dim light. The slides were placed for 40 min in a horizontal gel electrophoresis tank filled with cold electrophoretic buffer (1 mM Na₂EDTA and 300 mM NaOH, pH 13.5) to allow DNA unwinding. Electrophoresis was performed in the same buffer for 20 min at 0.73 V/cm and 300 mA. Unwinding and electrophoresis were done in an ice bath. After electrophoresis, the slides were neutralized twice for 5 min with 0.4 M Tris (pH 7.5) and fixed with 3 ml of absolute ethanol for 3 min. The slides were stained with 50 μ l of EtBr (0.4 μ g/ml) just before the analysis. Finally, the images were examined at 400 \times magnification with a Komet 3.1 Image Analysis System (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK) fitted with an Olympus BX50 fluorescence microscope equipped with a 480–550 nm wide band excitation filter and a 590 nm barrier filter. One hundred randomly selected cells (50 cells from each of the two replicate slides) were analysed per sample. The Olive tail moment, the tail percentage DNA and the tail length were used as measures of DNA damage and computed using the Komet version 3.1 software.

Statistical analysis

Only cells with a defined head were scored. The statistical analysis of the three parameters was done using the one-tailed Dunnett's test with the SPSS 11.5 program. Positive response was considered taking into account both biological and statistical relevance and a positive result was considered significant when $P < 0.05$. The mean, mean range and 95% confidence limits for the mean of the historical negative control from our laboratory were also considered in the interpretation of the results.

Results

The results obtained in the induction of DNA damage following treatments with each of the selected chemicals are presented in Table I. TK6 cell treatments lasted for 3 h and

were carried out without S9 metabolic fraction because, in previous studies, the 2-furylethylene compounds tested only increased the SCE frequency in these treatment conditions. To obtain comparable data, the same treatment conditions were used with both sets of compounds, 2-furylethylenes and 5-nitrofurans. Table I indicates the mean values for the Olive tail moment, tail % DNA and tail length from two different experiments for each evaluated concentration.

The cell survival was assessed in preliminary experiments. For each compound and concentration tested, the viability was higher than 70% (data not showed). In general, the results for the three 2-furylethylene derivatives showed no excessive increase in DNA damage. The derivatives G-0 and G-1 were unable to induce DNA damage after the 3-h treatment at any of the assayed concentrations, when compared with the concurrent and historical vehicle controls. In both cases, positive controls showed clear and significant increases in the genetic damage measured.

For the compound 2- β NF, statistically significant differences were observed after the treatment with the highest concentration tested for the tail % DNA and the Olive tail moment. For the tail length, significant increases were found for the three concentrations evaluated. The results obtained with the four classical 5-nitrofurans showed, in general, a tendency towards a dose-related increase and significant increases in the induction of genetic damage taking into account the three parameters analysed.

NFT and 5-FAC induced DNA damage at the concentrations assayed, after treatments lasting for 3 h. Although in both cases, and at some concentrations, no statistically significant increases were found with respect to the mean values obtained in the controls, the results were considered biologically relevant when compared with the historical negative control data from our laboratory.

The results obtained with the two other 5-nitrofurans evaluated showed clear positive responses when compared with the concurrent and historical controls, for all the concentrations tested.

Discussion

In previous experiments carried out in our laboratory with the derivatives G-0, G-1 and 2- β NF, only slight increases in the frequency of SCE were observed in cultured human lymphocytes after treatments without metabolic activation (4,5,7). Nevertheless, no induction of micronuclei was detected in such studies and, consequently, the tested compounds were considered as not genotoxic or very weakly genotoxic. To provide more data about the eventual genotoxic potential of these derivatives and to demonstrate a possible structure-activity relationship, we have performed the genotoxic evaluation of these compounds by using the comet assay and comparing the results with those obtained in the testing of classical 5-nitrofurans. Treatments were carried out without metabolic activation and, in the case of the 2-furylethylenes, whenever possible, the same range of concentrations applied in the previous SCE assays were used. The concentrations used for the 5-nitrofurans were established taking into account data reported in previous genotoxicity studies (17–20).

Two of the three 2-furylethylene derivatives assayed (G-0 and G-1) have been unable to induce DNA damage as expressed by a significant increase in the parameters analysed and, as a consequence, they were considered non-genotoxic

Table I. DNA damage in the TK6 cells after the exposure to the test compounds analysed with the comet assay

Treatment ($\mu\text{g/ml}$)	Tail % DNA (mean \pm SD) ^a	Olive tail moment (mean \pm SD) ^a	Tail length (mean \pm SD) ^a
G-0			
Control	16.48 \pm 9.49	1.90 \pm 1.32	27.90 \pm 9.19
1	15.18 \pm 9.18	1.77 \pm 1.26	27.89 \pm 10.01
5	15.07 \pm 10.10	2.02 \pm 1.44	30.50 \pm 10.37*
10	16.19 \pm 10.23	2.23 \pm 1.48	31.97 \pm 11.97***
H ₂ O ₂ (2000 μM)	43.96 \pm 18.12***	6.98 \pm 4.06***	43.03 \pm 10.27***
G-1			
Control	6.34 \pm 5.02	1.06 \pm 0.98	28.38 \pm 10.26
0.25	6.95 \pm 5.39	1.20 \pm 1.02	27.61 \pm 10.02
0.5	9.80 \pm 7.08***	1.20 \pm 1.02	26.81 \pm 10.98
1	7.86 \pm 6.59*	1.42 \pm 1.25	27.39 \pm 10.00
H ₂ O ₂ (2000 μM)	15.30 \pm 8.36***	6.98 \pm 4.06***	30.64 \pm 9.62*
2-βNF			
Control	13.84 \pm 8.29	1.60 \pm 1.07	25.82 \pm 8.97
1	13.78 \pm 8.96	1.81 \pm 1.30	31.25 \pm 11.25***
5	14.06 \pm 9.34	1.85 \pm 1.26	31.11 \pm 11.63***
10	17.58 \pm 10.27**	2.32 \pm 1.41**	31.86 \pm 10.36***
H ₂ O ₂ (2000 μM)	41.24 \pm 19.63***	6.96 \pm 4.34***	49.59 \pm 9.84***
NFT			
Control	27.57 \pm 11.57	2.78 \pm 1.17	36.25 \pm 9.71
2	32.81 \pm 11.01***	3.73 \pm 1.59***	49.23 \pm 15.25***
5	24.66 \pm 12.58	2.47 \pm 1.27	42.23 \pm 16.07***
10	31.95 \pm 10.19***	3.21 \pm 1.38*	43.95 \pm 9.14***
15	29.12 \pm 10.51	2.97 \pm 1.28	41.76 \pm 11.14***
H ₂ O ₂ (2000 μM)	53.78 \pm 12.23***	7.39 \pm 2.76***	51.11 \pm 9.36***
5-FAC			
Control	16.00 \pm 8.04	1.95 \pm 1.13	25.85 \pm 7.95
0.5	15.13 \pm 9.78	1.96 \pm 1.41	38.20 \pm 13.41***
1	16.53 \pm 10.76	2.23 \pm 1.44	38.65 \pm 12.96***
2	21.74 \pm 13.28***	2.98 \pm 2.09***	39.44 \pm 12.25***
H ₂ O ₂ (2000 μM)	27.97 \pm 13.43***	4.30 \pm 2.20***	41.51 \pm 10.36***
NFA			
Control	14.25 \pm 7.58	2.50 \pm 1.36	28.86 \pm 7.80
5	17.31 \pm 9.87*	4.01 \pm 2.33***	40.11 \pm 11.18***
10	22.66 \pm 10.99***	4.01 \pm 2.33***	44.75 \pm 11.60***
20	16.99 \pm 9.40*	3.36 \pm 2.08**	43.44 \pm 11.93***
30	20.47 \pm 11.00***	4.15 \pm 2.37***	42.87 \pm 10.14***
H ₂ O ₂ (2000 μM)	29.51 \pm 16.55***	6.78 \pm 4.42***	48.06 \pm 12.89***
FZ			
Control	16.96 \pm 9.06	2.16 \pm 1.27	32.35 \pm 8.93
20	26.00 \pm 11.43***	3.45 \pm 1.90***	41.39 \pm 12.34***
30	20.45 \pm 12.06*	2.88 \pm 1.88**	39.17 \pm 13.65***
60	39.48 \pm 17.07***	5.77 \pm 3.14***	42.54 \pm 10.98***
H ₂ O ₂ (2000 μM)	45.68 \pm 16.48***	8.16 \pm 3.90***	48.31 \pm 9.81***

^a200 cells were analysed for each concentration from two experiments. Two replicate cultures and 100 cells analysed in each experiment.

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ when compared with the control. One-tailed Dunnett's test.

under the experimental conditions used in the comet assay. Although the G-1 compound showed a statistically significant increase in the tail % DNA at the two higher concentrations assayed, this was not considered biologically relevant since the values are between the 95% confidence limits of historical control data and are significantly fewer when compared with the mean observed for the historical negative control (Table II).

In the case of the G-0 derivative, only a clear increase in the tail length was observed at the highest concentration tested, but it was lower than the top of the historical control range for the mean and the reached increase is only slightly higher when compared with the mean for the historical control and the top of the 95% confidence limits (Table II). Thus, the increase was considered to be without biological relevance.

The derivative (2- β NF) showed a slight but statistically significant increase mainly at the highest concentration evaluated, and was considered slightly genotoxic in the present assay. The genotoxic effects were observed in all the parameters evaluated to determine a positive response in the DNA

Table II. Historical negative control data from our laboratory for the comet assay in TK6 cells

Tail % DNA	Olive tail moment	Tail length
Mean range (6.34–27.57)	Mean range (1.06–2.78)	Mean range (25.82–36.25)
Mean \pm SD (15.92 \pm 10.39)	Mean \pm SD (1.99 \pm 1.30)	Mean \pm SD (29.35 \pm 9.64)
95% Confidence limits for mean (15.38–16.47)	95% Confidence limits for mean (1.93–2.06)	95% Confidence limits for mean (28.84–29.85)

damage. Nevertheless, the increases were slightly higher when compared with the mean obtained in the historical control regarding the parameters analysed for the present comet assay (Table II).

With G-0 and 2- β NF, we have used the same range of concentrations in the current comet study as in the previous

SCE assays. Nevertheless, G-1 has proved to be more toxic in TK6 cells than in lymphocytes, hence the concentrations used in this work were lower.

The four 5-nitrofurans studied were considered genotoxic, including NFA and FZ, and they induced the highest increases in the DNA damage when compared with both concurrent and historical controls. These positive results are in concordance with the reported genotoxicity for the different 5-nitrofurans, including NFA and FZ. Thus, Anderson *et al.* (18) reported positive results in the incidence of chromosome aberrations for NFA and high increases in the percentage of aberrant cells in the absence of S9 mix at the concentration range 23–40 µg/ml. In addition, NFA caused a marked increase in the frequency of SCE at the concentration range 10–15 µg/ml that is close to the range used in the current study (5–30 µg/ml).

NFA and FZ were reported as strong mutagens on TA97 and TA102 strains of *Salmonella typhimurium* and induced the SOS-repair system in the PQ37 strain of *Escherichia coli* (21). Moreover, NFA showed clear evidence of carcinogenicity in female rats (mammary glands) and in female mice (ovary). NFA induced point mutations in *Salmonella typhimurium* and in mouse lymphoma L5178Y cells and also induced SCE and chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells (22).

FZ was reported as the most potent mutagen among eight nitrofurans tested in strains of *S.typhimurium* TA98, TA98NR and TA98/1,8-DNP₆ (17). Significant increases in the frequency of SCE in cultures of human lymphocytes at the concentrations of 4–10 µg/ml were observed in an *in-vitro* study with FZ, as well as in *in-vivo* experiments (23).

The other two 5-nitrofurans studied, NFT and 5-FAC, were considered to be genotoxic in the present comet experiments at the concentrations assayed. Although, for both compounds, at some concentrations the increase observed for the tail % DNA and Olive tail moment was not statistically significant when compared with their concurrent control treatments, the values obtained for these parameters were significantly higher when compared with the mean for the historical control. On the other hand, the compounds showed significant increases in the tail length for all the concentrations evaluated. NFT has been reported to induce slight increases in the percentage of chromosome aberrations and SCE, in the absence of metabolic fractions, at concentrations of 25 and 50 µg/ml (18), as well as in the presence/absence of a metabolic fraction (22). In addition, NFT showed some evidence of carcinogenicity in male rats (kidney) and, in female mice, it showed clear evidence of carcinogenicity (ovary), as well as positive results in the induction of mutations in *S.typhimurium* and in the mouse lymphoma assay without metabolic activation.

Slapsyte *et al.* (19,20) published positive chromosome aberrations and SCE induction in *in-vitro* studies with human lymphocytes for NFT and furagin, a compound chemically and structurally similar to NFT. Both chromosome aberrations and SCE increases were observed in continuous 24-h treatments at concentrations of 20–40 µM, although high concentrations of furagin were required to induce chromosome aberrations in treatments lasting for 3 h.

The compound 5-FAC is a highly cytotoxic agent in the TK6 cultures showing the highest cytotoxicity among the 5-nitrofurans tested. 5-FAC was considered a potent mutagen in TA98, TA98NR and TA98/1,8-DNP₆ *S.typhimurium* strains (17). Taking into account the present results in the comet assay, together with data from our previous studies, it seems that the compounds belonging to the series of 2-furylethylene

derivatives, with the nitro group attached outside the furan ring, show lower genotoxic effects than the classical 5-nitrofurans compounds.

These results reinforce the view that the position of the nitro group gives to these two classes of nitro-compounds important differences in their genotoxicity. Thus, 2-furylethylene derivatives with the nitro group coupled outside the furan ring appear to be lower genotoxic agents when compared with the 5-nitrofurans. This would agree with several experimental data showing that only those derivatives with the nitro group in position 5 of the furan ring are mutagenic and the substitution of this functional group leads to the loss of mutagenic activity (3,24,25).

On the other hand, there is evidence for the possible detoxification or lower genotoxic effects of nitrofurans and 2-furylethylene derivatives in the presence of activating metabolic systems or in *in vivo* studies (4–7,20,21,24,26–28). For that reason, it may be possible to determine a safe dose range for this kind of 2-furylethylene derivatives for their therapeutic use. However, further *in vivo* genotoxicity studies are needed to elucidate the genetic safety of these chemicals.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Nilo Castañedo from CBQ (Villa Clara, Cuba) for kindly supplying the G-0, G-1 and 2-βNF compounds. This investigation was supported in part by the Generalitat de Catalunya (2002SGR-00197).

References

- Blondeau,J.M., Castañedo,N., González,O., Medina,R. and Silveira,E. (1999) *In vitro* evaluation of G1: a novel antimicrobial compound. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **11**, 163–166.
- Monzote,L., Sifontes,S. and Montalvo,A.M. (1999) Evaluación de la actividad terapéutica de dos principios activos frente a Leishmaniasis cutánea experimental. Tesis de Grado de Farmacia (FAL), Universidad de La Habana.
- Estrada,E. (1998) Structure–mutagenicity relationships in 2-furylethylene derivatives. A molecular orbital study of the role of nitro groups. *Mutat. Res.*, **420**, 67–75.
- González Borroto,J.I., Creus,A. and Marcos,R. (2001) Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.*, **497**, 177–184.
- González Borroto,J.I., Creus,A. and Marcos,R. (2002) Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.*, **519**, 179–185.
- González Borroto,J.I., Creus,A., Marcos,R., Mollà,R. and Zapatero,J. (2003) The mutagenic potential of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in the mouse bone marrow micronucleus test. *Toxicol. Sci.*, **72**, 359–362.
- González Borroto,J.I., Pérez,G., Creus,A. and Marcos,R. (2004) Genotoxicity testing of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene in cultured human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 187–193.
- Pérez Machado,G., González Borroto,J.I., Castañedo,N., Creus,A. and Marcos,R. (2004) *In vitro* genotoxicity testing of the furylethylene derivative (UC-245) in human cells. *Mutagenesis*, **19**, 75–80.
- Tice,R.R., Agurell,E., Anderson,D., Burlinson,B., Hartmann,A., Kobayashi,H., Miyamae,Y., Rojas,E., Ryu,J.-C. and Sasaki,Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, **35**, 206–221.
- Tice,R.R., Andrews,P.W. and Singh,N.P. (1990) The single cell gel assay. A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In Suntherland,B.M. and Wordhead,A.D. (eds), *DNA Damage and Repair in Human Tissues*. Plenum, New York, pp. 291–301.
- Ribas,G., Frenzilli,G., Barale,R. and Marcos,R. (1995) Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat. Res.*, **344**, 41–54.
- Guillamet,E., Creus,A., Ponti,J., Sabbioni,E., Fortaner,S. and Marcos,R. (2004) *In vitro* DNA damage by arsenic compounds in a human

- lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 19, 129–135.
13. Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339, 37–59.
 14. Strauss, G.H. (1991) Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT). I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res.*, 252, 1–15.
 15. Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C. and Windebank, S. (1998) The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13, 89–94.
 16. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Brant, L. and Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184–191.
 17. Ni, Y.-C., Heflich, R.H., Kadlubar, F.F. and Fu, P.P. (1987) Mutagenicity of nitrofurans in *Salmonella typhimurium* TA98, TA98NR and TA98/1,8-DNP₆. *Mutat. Res.*, 192, 15–22.
 18. Anderson, B.E., Zeiger, E., Shelby, M.D., Resnick, M.A., Gulati, D.K., Ivett, J.L. and Loveday, K.S. (1990) Chromosome aberration and sister chromatid exchange test results with 42 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16(suppl. 18), 55–137.
 19. Slapsyte, G., Jankauskiene, A., Mierauskiene, J. and Lazutka, J.R. (2001) Cytogenetic analysis of children under long-term antibacterial therapy with nitroheterocyclic compound furagin. *Mutat. Res.*, 491, 25–30.
 20. Slapsyte, G., Jankauskiene, A., Mierauskiene, J. and Lazutka, J.R. (2002) Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of children treated with nitrofurantoin for recurrent urinary tract infection. *Mutagenesis*, 17, 31–35.
 21. Gajewska, J., Szczypka, M., Tudek, B. and Szymczyk, T. (1990) Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone. *Mutat. Res.*, 232, 191–197.
 22. Zeiger, E., Haseman, J.K., Shelby, M.D., Margolin, B.H. and Tennant, R.W. (1990) Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16(suppl. 18), 1–14.
 23. Madrigal-Bujaidar, E., Ibanez, J.C., Cassani, M. and Chamorro, G. (1997) Effect of furazolidone on sister-chromatid exchanges, cell proliferation kinetics, and mitotic index *in vivo* and *in vitro*. *J. Toxicol. Environ. Health*, 51, 89–96.
 24. McCalla, D.R. (1983) Mutagenicity of nitrofurans derivatives: review. *Environ. Mutagen.*, 5, 745–765.
 25. Sturdik, E., Rosenberg, M., Stibranyi, L., Balaz, S., Chreno, O., Ebringer, L., Ilavsky, D. and Vegh, D. (1985) Structure–mutagenicity relationships of 5-nitro-2-furylethylenes in *Salmonella typhimurium* TA 98. *Chem. Biol. Interact.*, 53, 145–153.
 26. Murthy, M.S.S. and Najaria, K.B. (1980). Deactivation of furyl furamide (AF-2) by rat-liver microsomes and its implication in short-term test for mutagenicity/carcinogenicity. *Mutat. Res.*, 77, 127–134.
 27. Skeggs, H.R., Berglund, R.M., VandenHeuvel, W.J.A., Mrozik, H., Wislocki, P.G. and Wolf, F.J. (1984) Effect of liver enzymes on the mutagenicity of nitroheterocyclic compounds: activation of 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-3-(1-methyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-1,2-benzisoxazole and deactivation of nitrofurans and nitroimidazoles in the Ames test. *Mutat. Res.*, 136, 1–8.
 28. Suter, W., Hartmann, A., Poetter, F., Sageldorff, P., Hoffmann, P. and Martus, H.-J. (2002) Genotoxicity assessment of the antiepileptic drug AMP397, and Ames-positive aromatic nitro compound. *Mutat. Res.*, 518, 181–194.

Received on August 5, 2004; revised on September 27, 2004;
accepted on March 15, 2005

3.4. ARTÍCULO N° 5

The Mutagenic Potential of the Furylethylene Derivative 2-Furyl-1-nitroethene in the Mouse Bone Marrow micronucleus Test

Jorge I. González Borroto, Amadeu Creus, Ricard Marcos, Ricard Mollà, Jorge Zapatero

TOXICOLOGICAL SCIENCES 72, 359–362 (2003)

The Mutagenic Potential of the Furylethylene Derivative 2-Furyl-1-nitroethene in the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test

Jorge I. González Borroto,*† Amadeu Creus,* Ricard Marcos,*¹ Ricard Mollà,† and Jorge Zapatero†

*Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; and †Centro de Investigación y Desarrollo Aplicado, Cida s.a.l., 08130 Santa Perpètua de Mogoda, Barcelona, Spain

Received November 7, 2002; accepted December 31, 2002

The compound 2-furyl-1-nitroethene (G-0) has been tested to determine its ability to induce clastogenic or aneugenic effects *in vivo*, through the induction of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in mouse bone marrow. Groups of five CD-1 male mice were administered once intraperitoneally at a dose range of 5–20 mg/kg and bone marrow was sampled at 24 and 48 h after the treatment. G-0 was dissolved in corn oil, thus a vehicle control group received only corn oil at 10 ml/kg. The positive control group was administered with cyclophosphamide (40 mg/kg). All animals dosed with the highest concentration of the test agent (20 mg/kg) showed evident clinical symptoms of toxicity. Although evidences of bone marrow toxicity were observed, no statistically significant increases in the incidence of MNPCE over the vehicle control group were observed at any sampling time with any of the assayed doses of the G-0 compound. Cyclophosphamide treatment increased the incidence of MNPCE in all treated animals, demonstrating the sensitivity of the assay conditions in which it was carried out. From the results obtained, it is concluded that the test agent G-0 is neither clastogenic nor aneugenic in the erythrocytes from the bone marrow of treated mice at the doses tested.

Key Words: micronucleus assay; mice; furylethylenes; polychromatic erythrocytes; bone marrow.

Genetic toxicology studies have given rise to a number of testing procedures, both *in vitro* and *in vivo*. They have been designed to assess the effects of chemicals on the genetic material and, consequently, to assess the risk to living organisms including humans. To provide a broad coverage of the mutagenic and presumably carcinogenic potential of a chemical, information on different levels of genotoxic effects, e.g., gene, chromosomal, and cellular apparatus necessary for chromosome segregation, is required. Thus, the micronucleus assay has been widely used to measure genotoxicity, both *in vivo* and *in vitro*. The assay, when performed appropriately, detects clastogenicity due to chromosome breakage, and also aneugenicity, due to chromosome lagging resulting from dysfunction of mitotic apparatus (Krishna and Hayashi, 2000).

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: + 34-93-5812387. E-mail: ricard.marcos@uab.es.

Some nitro-compounds, among them the 5 nitrofurans, have showed genotoxicity and carcinogenicity in different experimental systems. Although there is also evidence that the furylethylene derivatives with the nitro group outside the furan ring do not show genotoxic effects (IARC, 1974; Jurado and Pueyo, 1995; McCalla, 1983; Ni *et al.*, 1987; Sturdik *et al.*, 1985). We have been studying a novel group of furylethylene derivatives, which have like common characteristic that the nitro group is attached in the exocyclic double bond of the ethylenic chain. *In vitro* studies, by using both the micronucleus (MN) and the sister chromatid-exchanges (SCE) test in cultured human lymphocytes, have been performed previously. These studies showed negative response in the micronucleus assay, with and without metabolic activation, and a slight increase in the SCE frequency has been observed, mainly in the absence of the S9 fraction. The slight effect disappears in the presence of the metabolic activation system (González Borroto *et al.*, 2001).

To obtain more insight into the genotoxic potential of this group of furylethylene derivatives, and to confirm the results obtained in the *in vitro* studies, an *in vivo* mutagenicity study has been carried out by using the mouse bone marrow-micronucleus test. In this study 2-furyl-1-nitroethene was selected as an example to assess the possible *in vivo* genotoxic potential of this chemical class, by measuring its effects on the formation of micronuclei in polychromatic erythrocytes (PCE) from the bone marrow of treated mice.

MATERIAL AND METHODS

Test compound. The test agent 2-furyl-1-nitroethene (G-0) was synthesized and kindly supplied by the Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de Las Villas, Cuba. Purity was 96.38%, as established by using high-pressure liquid chromatography (HPLC). Its chemical structure is indicated in Figure 1.

Mouse bone marrow micronucleus test. CD-1 male mice, supplied by Charles River France, were maintained on A04C diet (Usine d'Alimentation Rationnelle, UAR, France) and water *ad libitum*, and kept under controlled conditions (22 ± 2°C, 30–70% relative humidity, and a 12-h light/dark cycle).

Animals were 6–7 weeks old when used for the determination of the doses in a preliminary dose-range-finding study; as well as in the main study for the micronucleus test. The test agent was dissolved in corn oil (Sigma-Aldrich,

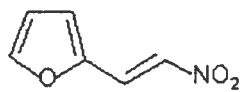


FIG. 1. Chemical structure of the 2-furyl-1-nitroethene (G-0).

Spain) and the solution was administered intraperitoneally at the volume of 10 ml/kg of body weight. The negative control group received corn oil-only, while the positive control group was treated with cyclophosphamide (CP) at the concentration of 40 mg/kg, dissolved in physiologic solution.

In the preliminary dose-range finding experiment, animals were treated with G-0 in doses ranging from 10 to 100 mg/kg, and clinical signs of toxicity and deaths were recorded 24 h later. According to the symptoms of systemic toxicity elicited by G-0 and exhibited by animals, a series of three doses from 5 to 20 mg/kg was chosen to assess the micronuclei induction.

The micronucleus assay was conducted using a method based on the OECD and European Union guidelines (European Union, 1992; OECD, 1997). Briefly, groups of five males were treated with G-0 (5, 10, or 20 mg/kg body weight). Only male mice were used, because in a previous study there was no marked sex-related difference in toxicity for this class of furylethylene derivatives (Ramos *et al.*, 1997). Separated groups of animals were killed at 24 and 48 h after dosing, by cervical dislocation. In the first sample time-period, animals dosed with the three doses (5, 10, or 20 mg/kg) were used; in the second sampling time, only animals treated with the high dose (20 mg/kg) were used. Femurs were removed and bone marrow collected in tubes containing 2 ml of fetal calf serum and centrifuged 5 min at $180 \times g$. Two smears were prepared and allowed to air dry, prior to fixation and staining with acridine orange solution. One drop of 0.04 mM acridine orange solution in Sørensen's phosphate buffer is placed on the fixed cells under a coverslip. Observations were made within a day by using an Olympus fluorescent microscope equipped with blue excitation and 515–530 nm barrier filter (Krishna and Hayashi, 2000).

Slides were coded and scored blind; 2000 polychromatic erythrocytes (PCEs) by animal were examined for the presence of micronuclei, which means 10,000 PCEs scored per dose-group. Due to the fact that normochromatic erythrocytes (NCE) have a lack of fluorescence or are viewed opaquely when the fluorescence stain was used, one slide more per animal was stained with May-Grünwald and Giemsa solutions. The ratio PCE/NCE was calculated by counting a total of 500 erythrocytes.

Statistical analysis. The normality of the distribution of the frequency of micronucleated PCE (MNPCE/1000) scores was assessed by means of the Kolmogorov-Smirnov test of goodness of fit. The incidences of micronuclei in control and treated groups were then compared by using the Student's *t*-test for

independent samples. The equality of variances was verified with Levene's test. The PCE/NCE ratio in control and treated groups was compared by the Student's *t*-test. Statistical decisions were made with a significance level of 0.05 (Crebelli *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2001).

RESULTS

During a preliminary dose range-finding experiment, animal dosed with 20 mg/kg exhibited clinical signs of toxicity (including irritation, slight ataxia, palpebral ptosis and hunched posture). Animals dosed above this dose exhibited the same toxic signs but in a severe manner and, consequently a dose of 20 mg/kg was chosen as the highest dose for the main study.

In the main study, animals treated with the high dose (20 mg/kg), showed clinical signs of systemic toxicity, such as piloerection, palpebral ptosis, dyspnoea, and hunched posture. The symptoms confirmed the absorption of the test compound. Taking into account that bone marrow is a well-perfused tissue, and that levels of test substance in blood or plasma will be similar to those observed in bone marrow, we assumed that the test compound reached the target cells. Although, during the preliminary study, slides from animals dosed over the highest selected dose (20 mg/kg) were stained and observed, a reduction in the number of fluorescent PCEs was detected, indicating bone marrow toxicity. Besides, a decrease in the PCE/NCE ratio was obtained in a dose-dependent manner when the treatment and control groups were compared. The reduction is observed in both sampling times, and the values for doses of 10 and 20 mg/kg reached statistical significance.

The results of the micronucleus test with the furylethylene derivative selected for this study are summarized in Table 1. The incidence of MNPCE in each treatment group, the PCE/NCE ratio, as well as the number of micronucleated PCEs/scored PCEs are shown. Only one scorer analysed all the slides.

Despite the evident signs of acute toxicity shown by the animals, mainly at the high dose, and the reduction in the

TABLE 1
Mouse Bone Marrow Micronucleus Test: Summary of Results with the Test Agent G-0

Sample time (h)	Treatment	Dose (mg/kg)	Micronucleated PCEs (MNPCE)		
			MNPCE/1000 PCE (mean \pm SD)	MNPCE/scored PCEs (individual data)	PCE/NCE (mean \pm SD)
24	Corn oil	0*	1.6 \pm 0.4	16/10,000 (3,4,2,4,3)	0.77 \pm 0.13
	G-0	5	2.1 \pm 0.6	21/10,000 (6,4,3,3,5)	0.66 \pm 0.12
		10	1.9 \pm 1.4	19/10,000 (4,7,0,2,6)	0.62 \pm 0.07*
		20	1.7 \pm 0.7	17/10,000 (1,4,3,4,5)	0.62 \pm 0.14*
		CP ^b	40	17.6 \pm 5.0**	176/10,000 (38,23,38,28,49)
48	Corn oil	0*	1.6 \pm 0.8	16/10,000 (4,5,4,2,1)	0.72 \pm 0.08
	G-0	20	1.1 \pm 0.6	11/10,000 (0,3,3,3,2)	0.55 \pm 0.11*

*Vehicle control, 10 ml/kg.

^bPositive control, cyclophosphamide 40 mg/kg.

p* < 0.05; *p* < 0.001, Student's *t*-test.

TABLE 2
Summary of *in Vitro* Genotoxic Evaluation of the Furylethylene Derivatives: Results of MN and SCE Assays

Chemical	<i>In vitro</i> MN assays results		<i>In vitro</i> SCE assays results	
	Human lymphocytes		Human lymphocytes	
2-Furyl-1-nitroethene ^a	Negative (\pm S9)		Positive (-S9); negative (+S9)	
1-(5-Bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene ^b	Negative (\pm S9)		Positive (-S9); negative (+S9)	
1-(5-Bromofur-2-yl)-2-nitroethene ^c	Negative (\pm S9)		Positive (-S9); negative (+S9)	

^aGonzález Borroto *et al.*, 2001; ^bGonzález Borroto *et al.*, unpublished data; ^cGonzález Borroto *et al.*, 2002.

PCE/NCE ratio, the results show that the MNPCE frequency in male mice bone marrow was not affected by treatment with any of the selected doses of the test agent G-0, in either of the sampling times, 24 and 48 h.

The incidence of MNPCE in vehicle-treated mice (1.6 MNPCE/1000 PCEs) in both sampling times was within the accepted spontaneous range for this mouse strain (Krishna *et al.*, 2000; Salamone and Mavourmin, 1994).

A statistically significant increase in the incidence of MNPCE over the control value was observed following treatment with the positive control substance cyclophosphamide (17.6 MNPCE/1000 PCE, $P \leq 0.001$). This data confirmed the sensitivity of the experimental protocol followed in the detection of genotoxic effects.

DISCUSSION

Nowadays, some nitrofurans continue being used as antimicrobial agents in human and veterinary medicine, even though mutagenic and carcinogenic properties have been shown for several of these compounds (Hamilton-Miller, 1997; IARC, 1974; Jurado and Pueyo, 1995; McCalla, 1983; Ni *et al.*, 1987).

The G-0 compound is not properly a nitrofur, but the furylethylene derivatives, with the nitro group located outside the furan ring, are isomers of position of the 5-nitrofurylethylene derivatives, and it has been indicated that such structural differences can produce changes in their genotoxic behaviour (Estrada, 1998). It has also been reported that only those derivatives with the nitro group coupled in position 5 of the furan ring are mutagenic, and that the substitution of this functional group results in the loss of mutagenic activity (Estrada, 1998; González Borroto *et al.*, 2001; McCalla, 1983; Sturdik *et al.*, 1985). In addition, several studies confirm the possible detoxification of nitrofurans when they are evaluated in the presence of activating metabolic systems or in *in vivo* studies (Gajewska *et al.*, 1990; Hatcher *et al.*, 1995; Murthy and Najaria, 1980; Skeggs *et al.*, 1984).

In a previous study carried out in our laboratory, the *in vitro* genotoxicity of the G-0 was evaluated in cultured human lymphocytes. This derivative did not demonstrate any capacity to induce micronuclei, with and without S9 mix, by using the cytokinesis-block micronucleus technique, although it was

considered slightly genotoxic in the sister-chromatid exchanges (SCE) assay without S9 (González Borroto *et al.*, 2001). We have obtained similar results when the *in vitro* genotoxic effects of other two furylethylene derivatives, with very similar chemical structure [1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (G-1) and 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (2-bNF)], have been evaluated (González Borroto *et al.*, 2002). The results of these studies are summarized in Table 2.

Recently, Slapsyte *et al.* (2002) reported the results of cytogenetic testing of a classical 5-nitrofur, the nitrofurantoin, in human lymphocytes *in vitro* at concentrations of 20 and 40 [μ]M; in this study chromosome aberrations and SCE were observed. At the same time, these authors studied the effects of the therapy with nitrofurantoin used for a long-term antimicrobial prophylaxis of urinary tract infection in children treated for a period of 1–12 months. No statistically significant increases in chromosome aberrations and SCE frequencies were found in the treated children, indicating a possible *in vivo* detoxification.

In the present study, no effects on the induction of MNPCE were observed with the test agent in a range of doses from 5 to 20 mg/kg in treated mice. Our previous *in vitro* results and the *in vivo* results reported here, as well as the other data mentioned above, would indicate/confirm the detoxification exerted by the metabolism on the possible genotoxicity of this class of chemicals. On the other hand, the global results of *in vitro* and *in vivo* studies with the test agent G-0, and other related derivatives, indicate the possibility that there is a safety margin for the use of these novel compounds in human and veterinary medicine. Nevertheless, additional mutagenicity studies measuring different levels of DNA damage are still necessary.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Nilo Castañedo from CBQ (Villa Clara, Cuba) for kindly supplying the G-0 compound. This investigation was supported in part by the Generalitat de Catalunya (2002SGR-00197).

REFERENCES

- Crebelli, R., Carere, A., Leopardi, P., Conti, L., Fassio, F., Raiteri, F., Barone, D., Ciliutti, P., Cinelli, S., and Vericat, J. A. (1999). Evaluation of 10 aliphatic halogenated hydrocarbons in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Mutagenesis* 2, 207–215.

- Estrada, E. (1998). Structure-mutagenicity relationships in 2-furylethylene derivatives. A molecular orbital study of the role of nitro groups. *Mutat. Res.* **420**, 67–75.
- European Union (1992). Commission Directive 92/69/EEC, Annex V B12. *Off. J. Eur. Community* **35**, 154–156.
- Gajewska, J., Szczypka, M., Tudek, B., and Szymczyk, T. (1990). Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans: Nitrofurazone and furazolidone. *Mutat. Res.* **232**, 191–197.
- González Borroto, J. G., Creus, A., and Marcos, R. (2001). Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* **497**, 177–184.
- González Borroto, J. G., Creus, A., and Marcos, R. (2002). Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* **519**, 179–185.
- Hamilton-Miller, J. M. T. (1997). Nitrofurans. In *Antibiotic and Chemotherapy*, 7th ed. (F. O'Grady, H. P. Lambert, R. G. Finch, and D. Greenwood, Eds.), pp. 396–403. Churchill Livingstone, London.
- Hatcher, J. F., Yamamoto, K., Ichikawa, M., Bryan, G. T., and Swaminathan, S. (1995). Metabolic reduction of novel 3,4-dichloro-5-nitrofurans in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutagen.* **25**, 58–66.
- IARC (1974). International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol. 7, *Some Anti-Thyroid and Related Substances, Nitrofurans and Industrial Chemicals*. IARC, Lyon, France.
- Jones, E., Fox, V., Elliott, B. M., and Moore, N. P. (2001). The mutagenic potential of acetonitrile in the bone marrow and peripheral blood of the mouse. *Mutagenesis* **2**, 151–154.
- Jurado, J., and Pueyo, C. (1995). Role of classical nitroreductase and O-acetyltransferase on the mutagenicity of nifurtimox and eight derivatives in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutagen.* **26**, 86–93.
- Krishna, G., and Hayashi, M. (2000). *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* **455**, 155–166.
- Krishna, G., Urda, G., and Paulissen, J. (2000). Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutat. Res.* **453**, 45–50.
- McCalla, D. R. (1983). Mutagenicity of nitrofurans derivatives: Review. *Environ. Mutagen.* **5**, 745–765.
- Murthy, M. S. S., and Najaria, K. B. (1980). Deactivation of furyl furamide (AF-2) by rat-liver microsomes and its implication in short-term test for mutagenicity/carcinogenicity. *Mutat. Res.* **77**, 127–134.
- Ni, Y. C., Heflich, R. H., Kadlubar, F. F., and Fu, P. P. (1987). Mutagenicity of nitrofurans in *Salmonella typhimurium* TA98, TA98NR, and TA98/1,8-DNP6. *Mutat. Res.* **192**, 15–22.
- OECD (1997). Guideline 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, *OECD Guideline for the Testing of Chemicals*, pp. 1–10. OECD, Paris, France.
- Ramos, A., Vizoso, A., Edreira, A., Betancourt, J., and Decalo, M. (1997). Activity of nitroalkenederivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene in *Salmonella*/microsome assay and the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.* **390**, 233–238.
- Salamone, M. F., and Mavournin, K. H. (1994). Bone marrow micronucleus assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environ. Mol. Mutagen.* **23**, 239–273.
- Skeggs, H. R., Berglund, R. M., VandenHeuvel, W. J. A., Mrozek, H., Wislocki, P. G., and Wolf, F. J. (1984). Effect of liver enzymes on the mutagenicity of nitroheterocyclic compounds: Activation of 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-3-(1-methyl-5-nitro-1-H-imidazol-2-yl)-1,2-benzisoxazole and deactivation of nitrofurans and nitroimidazoles in the Ames test. *Mutat. Res.* **136**, 1–8.
- Slapsyte, G., Jankauskiene, A., Mierauskiene, J., and Lazutka, J. R. (2002). Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of children treated with nitrofurantoin for recurrent urinary tract infection. *Mutagenesis* **1**, 31–35.
- Sturdik, E., Rosenberg, M., Stibranyi, L., Balaz, S., Chreno, O., Ebringer, L., Ilavsky, D., and Vegh, D. (1985). Structure-mutagenicity relationships of 5-nitro-2-furylethylenes in *Salmonella typhimurium* TA 98. *Chem. Biol. Interact.* **53**, 145–153.

3.5. ARTÍCULO N° 6

In vivo genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene in mouse bone marrow

Jorge I. González Borroto, Amadeu Creus, Ricard Marcos, Jorge Zapatero

Environmental Toxicology and Pharmacology 20 (2005) 241–245



In vivo genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene in mouse bone marrow

Jorge I. González Borroto^{a,b}, Amadeu Creus^{a,*}, Ricard Marcos^a, Jorge Zapatero^b

^a Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain

^b Centro de Investigación y Desarrollo Aplicado, Cida s.a.l., 08130 Santa Perpètua de Mogoda, Barcelona, Spain

Received 9 September 2004; accepted 11 February 2005

Available online 16 March 2005

Abstract

The genotoxic potential of the compound 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (2-βNF) has been tested by using the in vivo mouse bone marrow micronucleus assay. Its ability to induce clastogenicity or aneugenicity, through the induction of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in the bone marrow cells has been evaluated. Treatment groups of five CD-1 male mice were administered once intraperitoneally at the doses of 10, 20, and 30 mg/kg, and their bone marrows were sampled at 24 and 48 h after the administration, at the first sampling time animals administered with the three doses were used, and in the second sampling time, only animals administered with the highest dose were used. All animals treated with the highest dose of the test compound (30 mg/kg) showed evident clinical symptoms of toxicity such as irritation, hunched posture, slight ataxia, dyspnoea, piloerection, and palpebral ptosis. However, no marked depression of bone marrow cell proliferation was observed, and no significant increases in the frequency of MNPCE were obtained in any of the concentrations tested at any sampling times. The positive control treated-animals were administered with cyclophosphamide at the dose of 40 mg/mL. The compound caused a significant increase in the number of MNPCE in all treated animals, demonstrating the sensitivity of the mouse strain used.

From the results obtained, it is concluded that the compound 2-βNF is neither clastogenic nor aneugenic in the erythrocytes from the bone marrow of treated mice at the doses tested.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: CD-1 mice; Bone marrow; Micronucleated erythrocytes; 1-(5-Bromofur-2-yl)-2-nitroethene

1. Introduction

Some nitrocompounds, among them the 5-nitrofurans, have shown genotoxic and carcinogenic potential in different experimental systems. However, several studies have demonstrated that only 5-nitrofurans act as mutagenic, since the furylethylene derivatives with the nitro group outside the furan ring do not show genotoxic properties (Estrada, 1998; McCalla, 1983; Sturdik et al., 1985).

Our group has been studying a novel series of furylethylene compounds that are isomers of position of the

5-nitrofurylethylene derivatives, which have like common characteristic that the nitro group is attached in the β-carbon of the exocyclic double bond of the ethylenic chain. These derivatives have shown interesting biological properties having potential uses in human and veterinary medicine as antimicrobial and antifungal agents (Blondeau et al., 1999; Castañedo et al., 1994; Monzote et al., 1999).

In vitro genotoxicity studies with the compound 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (2-βNF) in cultured human lymphocytes, using both the micronucleus (MN) and the sister-chromatid exchanges (SCE) test have been previously carried out in our laboratory. Negative responses were obtained in the MN assay and only a slight increase in the SCE frequency, only in the absence of metabolic fraction,

* Corresponding author. Tel.: +34 93 5812052; fax: +34 93 5812387.
E-mail address: amadeu.creus@uab.es (A. Creus).

was observed (González Borroto et al., 2002). These in vitro studies suggest a possible metabolic inactivation of the 2- β NF compound.

To confirm the in vitro results obtained with the compound 2- β NF and to obtain additional data on the possible genotoxic risk associated with the compound, an in vivo genotoxicity study has been carried out. In this paper, we describe the results obtained in the in vivo genotoxic evaluation of the derivative 2- β NF by measuring its effects on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes (PCE) from the bone marrow of treated mice.

2. Material and methods

2.1. Test compound

The test agent 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (2- β NF) was synthesised and kindly supplied by the Centro de Bioactivos Químicos (CBQ, Villa Clara, Cuba). Purity (>96%) was established by high-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis. Its chemical structure is indicated in Fig. 1.

2.2. Mouse bone marrow micronucleus test

CD-1 male mice, supplied by Charles River France, were maintained on A04C rodent diet (Usine d'Alimentation Rationnelle, UAR, France) and water ad libitum, and kept under controlled conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 30–70% relative humidity, and 12-h light/12-h dark cycle). Animal welfare was assured in accordance with the criteria established by the Animal Experimentation Ethics Committee of Cida s.a.l., where the assay was performed following standard bioethical principles.

Animals of 6–7-week-old were used for the determination of the doses in a preliminary dose range-finding study as well as in the main study for the micronucleus test. The test agent was dissolved in corn oil (Sigma–Aldrich, Spain) and the solution was administered intraperitoneally in a single dosing regimen at the volume of 10 mL/kg of body weight. The negative control group received corn oil only, while the positive control group was treated with cyclophosphamide (CP) at the concentration of 40 mg/kg, dissolved in saline physiologic solution.

The micronucleus assay was conducted using a method based on the OECD and European Union guidelines (European Union, 2000; OECD, 1997). Briefly, groups of five males were treated with 2- β NF (10, 20, and 30 mg/kg body weight). Only male mice were used because in a previous

study there was no marked sex-related difference in toxicity for this class of furylethylene derivatives (Ramos et al., 1997). Separated groups of animals were killed at 24 and 48 h after dosing by cervical dislocation. For the first sample time-period, animals from the three treatment groups administered with the doses (10, 20, and 30 mg/kg) were used, and in the second sampling time, only animals treated with the high dose (30 mg/kg) were used. Femurs were removed and bone marrow collected in tubes containing 2 mL of foetal calf serum and centrifuged 5 min at $180 \times g$. Two smears were prepared and allowed to air dry, prior to fixation with methanol, and staining with acridine orange solution. One drop of 0.04 mM acridine orange solution in phosphate buffer is placed on the fixed cells and covered with a coverslip. Observations were made within a day by using an Olympus fluorescent microscope equipped with blue excitation and 515–530 nm barrier filter (Krishna and Hayashi, 2000).

Slides were coded and scored blind by one expert scorer; 2000 polychromatic erythrocytes by animal were examined for the presence of micronuclei, which means 10,000 PCEs scored per dose group. Since normochromatic erythrocytes (NCE) are viewed opaquely, when the fluorescence stain was used, one slide more per animal was stained with May-Grünwald and Giemsa solutions. To evaluate bone marrow toxicity, the ratio PCE/NCE was calculated by counting a total of 500 erythrocytes using these slides.

2.3. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using a parametric approach and the SPSS 11.5 statistical program. The incidences of micronuclei and the PCE/NCE ratio in control, and the treated groups were compared using the Student's *t*-test for independent samples. Statistical decisions were made with a significance level of 0.05.

3. Results

In the preliminary dose range-finding experiment, all the animals dosed above 30 mg/kg showed clinical signs of toxicity in a severe manner (Table 1). Then, the highest selected dose for the main experiment of micronucleus test was of 30 mg/kg body weight. The animals administered with this dose exhibited evident signs of toxic effects, which confirm the absorption of the test compound.

The main toxic signs observed after the administration were irritation, hunched posture, slight ataxia, dyspnoea, piloerection, and palpebral ptosis. During the study, there was no mortality among the animal treated with the compound 2- β NF, and around 4 h after the administration, all animals recovered. Taking into account that the bone marrow is a well-perfused tissue, and that in general, the levels of the test substance in blood or plasma are similar to those observed in the bone marrow (ICH, 1995), we assume that the tested compound reached the target cells to demonstrate genotoxic

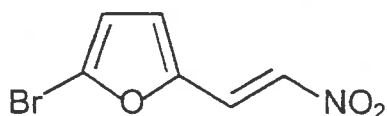


Fig. 1. Chemical structure of the 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene (2- β NF).

Table 1
Results of the preliminary dose range-finding experiment

Doses (mg/kg)	Animals/sex	Clinical signs of toxicity ^a
80	4/M	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ^b
30	5/M	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 ^c
20	4/M	1 ^d
10	3/M	–

M: Male.

^a (1) Piloerection, (2) irritation, (3) palpebral ptosis, (4) lacrimation, (5) vocalizations, (6) slight ataxia, (7) hunched posture, (8) decreased motor activity, (9) dyspnoea, and (10) struggling.

^b All animals showed the symptoms of toxicity in a severe manner when compared with the other doses tested.

^c The toxicity signs were registered in all animals in a less severe manner when compared with the highest dose.

^d The toxicity sign was registered only in one of the administered animals.

effects. Consequently, a tendency towards a reduction in the PCE/NCE ratio was observed when the values of the test agent-treated mice were compared with those obtained in the control group animals. This was mainly observed at the lower dose in the sampling time of 24 h after the administration. In the other doses, a reduction in the ratio was observed, but without attaining statistical significance.

The results obtained in the micronucleus test with the derivative 2-βNF are summarized in Table 2. Although evident signs of toxicity were observed in the treated animals, mainly at the highest dose (30 mg/kg), only slight decreases in the PCE/NCE ratio were seen. In addition, no increases in the frequency of MNPCE in the bone marrow were observed with any of the three selected doses of the test compound evaluated in the sampling time of 24 h, and with the high dose evaluated at the 48 h sampling time.

The frequency of MNPCE/1000 PCE obtained in vehicle-treated mice in both sampling times (2.2 and 1.2 MNPCE/1000 PCE, respectively) was within the usually accepted spontaneous range for the CD-1 mouse strain (Krishna et al., 2000; Salamone and Mavourmin, 1994).

A statistically significant increase in the incidence of MNPCE over the control was observed in the cyclophosphamide-treated mice (19.2 MNPCE/1000 PCE, $P < 0.001$). This

is in agreement with other data reported for cyclophosphamide treatment using CD-1 mice in the micronucleus assay (Krishna et al., 2000). On the other hand, the data confirmed the sensitivity of the mouse strain employed.

4. Discussion

Many organic compounds containing five-membered aromatic heterocyclic rings are widely distributed in nature, and often play an important role in various biochemical processes, the thiophenes and furans derivatives being included among them. As a result, they are incorporated into new chemical entities by medicinal chemists, and they are important structural fragments in many pharmaceutical and chemical compounds (Dalvie et al., 2002; Meotti et al., 2003). Thus, several nitrofurans are still used nowadays as antimicrobial and antifungal agents in human and veterinary medicine (Hamilton-Miller, 1997). As previously stated, some 2-furylethylene derivatives studied by our group have shown interesting biological properties, and it seems that they would become an alternative to obtain novel pharmaceutical molecules (Blondeau et al., 1999; Monzote et al., 1999).

On the other hand, it is known that 5-nitrofurylethylenes and the β-nitrofurylethylene derivatives studied in our laboratory are isomers of position, and the structural difference due to the different attachment position of the nitro group can produce significant changes in the chemical and biological properties of such compounds, mainly regarding their genotoxic ability (Estrada, 1998). In addition, it has also been reported that only those derivatives with the nitro group coupled in position 5 of the furan ring are mutagenic, and that the substitution of this functional group results in the loss of mutagenic potential (Estrada, 1998; González Borroto et al., 2001; McCalla, 1983; Sturdik et al., 1985).

Previous studies conducted in vitro with the 2-βNF compound (González Borroto et al., 2002) and two other 2-furylethylene derivatives; 2-furyl-1-nitroethene (González Borroto et al., 2001) and 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (González Borroto et al., 2004), with very similar

Table 2
Mouse bone marrow micronucleus test: summary of results with the test agent 2-βNF

Sample time (h)	Treatment	Dose (mg/kg)	Micronucleated PCEs (MNPCE)		PCE/NCE (mean ± S.D.)
			MNPCE/1000 PCE (mean ± S.D.)	MNPCE/scored PCEs (individual data)	
24	Corn oil	0 ^a	2.2 ± 0.7	22/10,000 (5, 3, 3, 6, 5)	1.29 ± 0.13
	2-βNF	10	1.9 ± 0.7	19/10,000 (6, 4, 4, 2, 3)	1.04 ± 0.20*
		20	1.6 ± 1.3	16/10,000 (2, 7, 0, 3, 4)	1.09 ± 0.16
		30	1.5 ± 0.5	15/10,000 (3, 4, 4, 2, 2)	1.10 ± 0.14
		Cp ^b	40	19.2 ± 1.7**	192/10,000 (38, 39, 33, 40, 42)
48	Corn oil	0 ^a	1.2 ± 1.2	12/10,000 (2, 6, 1, 3, 0)	0.93 ± 0.13
	2-βNF	30	1.6 ± 1.4	16/10,000 (3, 2, 2, 1, 8)	0.91 ± 0.15

Student's *t*-test.

^a Vehicle control, 10 mL/kg.

^b Positive control, cyclophosphamide 40 mg/kg.

* $P < 0.05$.

** $P < 0.001$.

243

structures, have demonstrated that any of them induce micronuclei formation in human lymphocytes by using the sister-chromatid exchange-block micronucleus technique. Nevertheless, they were considered slightly genotoxic in the sister-chromatid exchanges assay, only when they were tested in the presence of metabolic fraction.

Although nitroreduction has been proposed as an important metabolic pathway, many aspects on the action of genotoxic mechanisms of nitrofurans remain still unclear. As it is known, nitrofurans may cause mutagenicity via nitrenium ion which could be formed from hydroxylamine, or one of the intermediates, during the reduction of the nitro group. However, significant differences between the behaviour of nitrofurans and other nitroaromatic compounds have been found. One of the differences is the unusual ring opening that occurs with nitrofurans when they are susceptible to reduction, which could lead to an alternative reaction of elimination forming an unsaturated nitrile (Debnath et al., 1993). Several data support the possible detoxification of nitrofurans and other aromatic compounds when they are tested in vitro with an exogenous metabolic activation system or in vivo studies (González Borroto et al., 2004; Hatcher et al., 1995; Skeggs et al., 1984; Slapsyte et al., 2002).

The results presented in this paper indicate that the compound 2-βNF is unable to induce significant increases in the micronuclei frequency in bone marrow cells of CD-1 mice, when administered intraperitoneally. These data are in good agreement with recent results obtained by us, where no mutagenic effects were found in a previous in vivo micronucleus test experiment by using the same mouse strain for evaluating the genotoxic potential of the compound 2-furyl-1-nitroethene, a chemical precursor for the synthesis of 2-βNF derivative (González Borroto et al., 2003).

In conclusion, the results presented here together with other previous in vitro results obtained with the compound 2-βNF, and the in vitro and in vivo results found with the other two 2-furylethylene derivatives, indicate that this class of chemical could be an alternative to obtain new pharmaceutical entities due to their low genotoxic effects when compared to the classical 5-nitrofurans.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Nilo Castañedo from CBQ (Villa Clara, Cuba) for kindly supplying the 2-βNF compound and to the technical staff of Cida s.a.l, Barcelona for their assistance. This investigation was partially supported by the Generalitat de Catalunya (2002 SGR-00197).

References

- Blondeau, J.M., Castañedo, N., González, O., Medina, R., Silveira, E., 1999. In vitro evaluation of G1: a novel antimicrobial compound. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11, 163–166.
- Castañedo, N., Goizueta, R., Pérez, J., González, J., Silveira, E., Cuesta, M., Martínez, A., Lugo, E., Estrada, E., Carta, A.C., Navia, O., Delgado, M.S., 1994. Procedure for the Obtainment of 1-(5-Bromofur-2-yl)-2-Bromo-2-Nitroethene and its Microcide Action, Cuban Patent 22446. European Patent, Application Number 95500056.7. Canadian Patent, Application Number 2,147,594. Japanese Patent, Application Number 222002. U.S. Patent, Application Number 60008011.
- Dalvie, D.K., Kalgutkar, A.S., Khojasteh-Bakht, C.S., Scott Obach, R.S., O'Donnell, J.P., 2002. Biotransformation reactions of five-membered aromatic heterocyclic rings. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 269–299.
- Debnath, A.K., Hansch, C., Kim, K.H., Martin, Y.C., 1993. Mechanistic interpretation of the genotoxicity of nitrofurans (antibacterial agents) using quantitative structure-activity relationships and comparative molecular field analysis. *J. Med. Chem.* 36, 1007–1016.
- Estrada, E., 1998. Structure-mutagenicity relationships in 2-furylethylene derivatives. A molecular orbital study of the role of nitro groups. *Mutat. Res.* 420, 67–75.
- European Union, 2000. Commission Directive 2000/32/EC, Annex 4C, Off. J. Eur. Community 136, 50–56.
- González Borroto, J.I., Creus, A., Marcos, R., 2001. Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* 497, 177–184.
- González Borroto, J.I., Creus, A., Marcos, R., 2002. Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* 519, 179–185.
- González Borroto, J.I., Creus, A., Marcos, R., Mollà, R., Zapatero, J., 2003. Genotoxic potential of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in the mouse bone marrow micronucleus test. *Toxicol. Sci.* 72, 359–362.
- González Borroto, J.I., Pérez, G., Creus, A., Marcos, R., 2004. Genotoxicity testing of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene in cultured human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.* 42, 187–193.
- Hamilton-Miller, J.M.T., 1997. Nitrofurans. In: O'Grady, F., Lambert, H.P., Finch, R.G., Greenwood, D. (Eds.), *Antibiotic and Chemotherapy*, seventh ed. Churchill Livingstone, London, pp. 396–403.
- Hatcher, J.F., Yamamoto, K., Ichikawa, M., Bryan, G.T., Swaminathan, S., 1995. Metabolic reduction of novel 3,4-dichloro-5-nitrofurans in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutagen.* 25, 58–66.
- ICH, 1995. Topic S2A Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals. ICH, Harmonised Tripartite Guideline, pp. 1–12.
- Krishna, G., Hayashi, M., 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* 455, 155–166.
- Krishna, G., Urda, G., Paulissen, J., 2000. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutat. Res.* 453, 45–50.
- McCalla, D.R., 1983. Mutagenicity of nitrofurans derivatives: review. *Environ. Mutagen.* 5, 745–765.
- Meotti, F.C., Silva, D., dos Santos, A.R.S., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2003. Thiophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 37–44.
- Monzote, L., Sifontes, S., Montalvo, A.M., 1999. Evaluación de la actividad terapéutica de dos principios activos frente a Leishmaniasis cutánea experimental. Tesis de Grado de Farmacia (FAL), Universidad de La Habana.
- OECD, 1997. Guideline 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals. OECD, Paris, France, pp. 1–10.
- Ramos, A., Vizoso, A., Edreira, A., Betancourt, J., Decalo, M., 1997. Activity of nitroalkene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene in *Salmonella/microsome* assay and the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.* 390, 233–238.
- Salamone, M.F., Mavourmin, K.H., 1994. Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean

- spontaneous micronucleus frequencies. *Environ. Mol. Mutagen.* 23, 239–273.
- Skeggs, H.R., Berglund, R.M., VandenHeuvel, W.J.A., Mrozik, H., Wislocki, P.G., Wolf, F.J., 1984. Effect of liver enzymes on the mutagenicity of nitroheterocyclic compounds: activation of 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-3-(1-methyl-5-nitro-1-H-imidazol-2-yl)-1,2-benzisoxazole and deactivation of nitrofurans and nitroimidazoles in the Ames test. *Mutat. Res.* 136, 1–8.
- Slapsyte, G., Jankauskiene, A., Mierauskiene, J., Lazutka, J.R., 2002. Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of children treated with nitrofurantoin for recurrent urinary tract infection. *Mutagenesis* 1, 31–35.
- Sturdik, E., Rosenberg, M., Stibranyi, L., Balaz, S., Chreno, O., Ebringer, L., Ilavsky, D., Vegh, D., 1985. Structure-mutagenicity relationships of 5-nitro-2-furylethylenes in *Salmonella typhimurium* TA 98. *Chem. Biol. Interact.* 53, 145–153.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se han evaluado una serie de derivados 2-furiletilénicos empleando varios ensayos de genotoxicidad, *in vitro* e *in vivo*, con el objetivo de aportar nuevos datos sobre el potencial genotóxico de estos compuestos, de los que algunos derivados poseen características biológicas importantes que les confieren interés farmacéutico y posibles aplicaciones en medicina veterinaria y humana.

En la figura 8 se muestra la estructura química de los derivados 2-furiletilénicos evaluados:

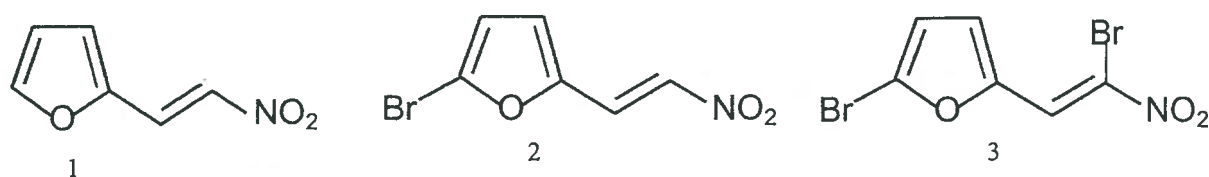


Figura 8: Estructura química de los derivados 2-furiletilénicos evaluados. 1: G-0, 2-Furil-1-nitroeteno; 2: 2-βNF, 1-(5-bromofur-2-il)-2-nitroeteno; 3: G-1, 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno.

Los ensayos de genotoxicidad que se han empleado en este trabajo de Tesis han sido los siguientes:

Ensayos de genotoxicidad *in vitro* en células de mamíferos

- Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis
- Ensayo de intercambios entre cromátidas hermanas
- Ensayo de electroforesis en células aisladas o ensayo del cometa

Ensayo de genotoxicidad *in vivo*

- Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratón

A continuación se discuten los resultados obtenidos para cada uno de los derivados evaluados en los distintos ensayos utilizados.

4.1. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS *IN VITRO*

Se utilizó el ensayo de micronúcleos *in vitro* con bloqueo de la citocinesis en cultivos de linfocitos humanos para evaluar el potencial genotóxico de los derivados 2-furiletilénicos.

Como ya se ha comentado anteriormente, desde su introducción en la década de los años 1980 hasta la actualidad, ha sido uno de los ensayos de genotoxicidad más ampliamente utilizado para la evaluación genotóxica de numerosos agentes tanto físicos como químicos (Fenech, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

La tabla 12 muestra un resumen general de los resultados obtenidos para los diferentes derivados evaluados en el ensayo de micronúcleos *in vitro* en cultivos de linfocitos humanos. Los resultados detallados para cada uno de los compuestos se presentan en los artículos n°: 1, 2 y 3 del apartado de Resultados de la Tesis.

Tabla 12: Resumen de resultados del ensayo de MN *in vitro* para los derivados 2-furiletilénicos.

Producto	Dosis µg/mL	Ensayo de micronúcleos <i>in vitro</i> en cultivos de linfocitos humanos					
		3h sin S9	CBPI ^a (%) ^b	3h con S9	CBPI ^a (%) ^b	48h sin S9	CBPI ^a (%) ^b
G-0	1	Negativo	1.95 (0)	Negativo	1.97(5)	Negativo	1.84 (1)
	5	Negativo	1.84 (6)	Negativo	1.92 (10)	Negativo	1.69 (19)
	10	Negativo	1.86 (38)	Negativo	1.76 (26)	Negativo	1.47 (45)
	15	-	- (100)	Negativo	1.37 (64)	-	-
2-βNF	0.5	-	-	-	-	Negativo	1.80 (0)
	1	Negativo	1.8 (4)	Negativo	1.83 (5)	Negativo	1.80 (0)
	5	Negativo	1.73 (13)	Negativo	1.80 (8)	Negativo	1.64 (44)
	10	Negativo	1.39 (54)	Negativo	1.68 (22)	Negativo	1.45 (44)
	15	-	- (100)	Negativo	1.43 (52)	-	-
G-1	1	Negativo	1.89 (0)	Negativo	1.91 (5)	Negativo	1.72 (10)
	5	Negativo	1.76 (11)	Negativo	1.85 (11)	Negativo	1.63 (21)
	10	Negativo	1.58 (32)	Negativo	1.83 (24)	Negativo	1.54 (33)
	15	Negativo	1.57 (33)	Negativo	1.80 (17)	-	-
	20	Negativo	1.48 (44)	Negativo	1.64 (33)	Negativo	1.48 (40)

G-0: 2-Furil-1-nitroetano; 2-βNF: 1-(5-bromofur-2-il)-2-nitroetano; G-1: 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroetano.

^a CBPI, índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis. Valor de la media para cada concentración. Datos combinados de todos los donantes usados en cada estudio.

^b Citotoxicidad expresada en (%) para cada concentración con respecto al grupo control. Cálculos según la fórmula recomendada en la normativa OECD 487 para el ensayo de micronúcleos *in vitro* (OECD, 2004).

Como puede observarse en la tabla, la genotoxicidad de los tres derivados 2-furiletilénicos fue estudiada usando tratamientos cortos de 3 horas, con y sin activación metabólica, y tratamientos continuados de 48 horas en ausencia de activación metabólica. Para todos los compuestos se realizaron los estudios empleando al menos dos donantes para cada una de las condiciones experimentales de tratamiento antes mencionadas.

En este ensayo *in vitro* se obtienen resultados negativos para los tres derivados estudiados y para todas las condiciones experimentales empleadas, tanto para los tratamientos de 3 horas como para los tratamientos de 48 horas.

Los derivados 2-furiletilénicos no inducen incrementos significativos en la frecuencia de células binucleadas micronucleadas con respecto a los valores obtenidos en los tratamientos controles con el vehículo utilizado para disolverlos (dimetilsulfóxido, DMSO). La frecuencia de MN en los cultivos tratados con las diferentes concentraciones de los derivados 2-furiletilénicos nunca alcanza significación ni biológica ni estadística al compararse con los controles con el solvente en ninguno de los donantes y para ninguna de las condiciones experimentales usadas.

Los resultados del ensayo de MN *in vitro* muestran que todos los derivados estudiados producen efectos citotóxicos en los cultivos de linfocitos humanos en el rango de concentraciones evaluadas. Para todos los compuestos se obtuvo una reducción en el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (CBPI) en relación al control. Esta reducción se observó en todos los experimentos realizados y para todos los donantes utilizados.

En la tabla 12 se muestran los valores de la media obtenida al combinar los datos de todos los donantes. Se observa una reducción del CBPI y que esta reducción muestra una relación dosis-respuesta. A medida que aumenta la concentración evaluada es mayor la reducción del CBPI, reflejando una mayor citotoxicidad en los cultivos de linfocitos para todas las condiciones experimentales: tratamientos de 3 horas, con y sin activación metabólica, y tratamientos de 48 horas sin activación metabólica.

En la tabla también se muestra la citotoxicidad expresada en (%) para cada uno de los derivados y para cada concentración y condición experimental. La citotoxicidad se calculó empleando la formula recomendada en la directriz de la OECD 487, que es la normativa referida al ensayo de micronúcleos *in vitro* y que ha sido recientemente publicada por este organismo (OECD, 2004). La formula es la siguiente:

$$\text{Citotoxicidad} = 100 - 100 [(CBPI_T - 1)/(CBPI_C - 1)]$$

en donde: $CBPI_T$ es el índice de proliferación celular del tratamiento, y $CBPI_C$ es el índice de proliferación celular del control.

Los valores obtenidos con los datos combinados de todos los donantes y todos los experimentos para cada uno de los compuestos muestran la citotoxicidad inducida en los cultivos de linfocitos humanos para cada una de las condiciones experimentales empleadas. Para los tratamientos de 3 horas sin activación metabólica se observa que para el producto G-0 el rango de los valores de citotoxicidad es de 0 al 100 %, para el producto 2-βNF es de 4 al 100 % y, para el G-1, de 0 al 44 %.

En los tratamientos de 3 horas con activación metabólica también se observan efectos citotóxicos. Ahora bien, al compararlos con los tratamientos sin activación metabólica, la citotoxicidad inducida por los tres compuestos es menor. El rango de los valores de citotoxicidad para el producto G-0 es de 5 al 64 %, en el derivado 2-βNF es de 5 al 52 % y, para el G-1, se obtiene un rango comprendido entre el 5 y el 33 %; para todos los derivados la citotoxicidad observada es menor en estos tratamientos con activación metabólica. En el caso de los compuestos G-0 y 2-βNF se pudieron evaluar los cultivos tratados con la concentración más alta utilizada (15 μg/mL), que provocó un 100 % de citotoxicidad en los tratamientos sin activación metabólica; en el caso del producto G-1 también se observó menor citotoxicidad a la concentración más alta evaluada.

En los tratamientos continuados de 48 horas sin activación metabólica, se obtienen resultados similares. Los tres derivados inducen efectos citotóxicos en los cultivos de linfocitos humanos, siendo los rangos de citotoxicidad obtenidos para cada uno los siguientes: para G-0 (1 a 45 %), para 2-βNF (0 a 44 %) y para G-1 (10 a 40 %).

Para todas las condiciones experimentales los derivados furiletilénicos estudiados inducen una citotoxicidad cercana o superior al 50 %, principalmente a la concentración más alta evaluada, que es lo que se recomienda en la mayoría de los ensayos de genotoxicidad *in vitro* y, en particular, en la directriz de la OECD para el ensayo de micronúcleos *in vitro*. Además, la citotoxicidad muestra una relación directa dosis-respuesta, que va incrementando a medida que aumenta la concentración evaluada de los distintos compuestos. Para todos los derivados puede establecerse un rango límite de concentraciones de 10 a 15 μg/mL, por encima del cual se induce una elevada citotoxicidad que impide el desarrollo del ensayo debido a la reducción de la proliferación de los linfocitos.

Varios nitrocompuestos son considerados como agentes genotóxicos. Se piensa que la acción mutagénica la llevan a cabo a través de los reactivos intermediarios que se generan en

el proceso de reducción del grupo nitro (NO₂). Estos intermediarios son agentes electrofílicos que atacan las bases del DNA a través del átomo de nitrógeno activado. Además, en la reacción de nitroreducción se generan otros intermediarios electrofílicos; en primer lugar, derivados nitro-arenos y derivados nitrosos y después se producen grupos nitro-hidroxilaminos. Todos ellos son capaces de provocar daños en la molécula de DNA (Haack *et al.*, 2001). Muchos otros compuestos nitrofuranos, especialmente los derivados pertenecientes al grupo de los 5-nitrofuranos, son considerados como agentes genotóxicos y mutagénicos en varios sistemas de ensayo (McCalla, 1983; Sturdik *et al.*, 1985; Anderson *et al.*, 1990). Como ya se ha explicado, son isómeros de posición en relación al grupo nitro con los derivados furiletilénicos evaluados en este trabajo.

Aunque hay varios resultados contradictorios, como suele suceder en la evaluación de muchos compuestos químicos, se ha demostrado que la sustitución del grupo NO₂ de la posición 5 del anillo furánico da como resultado la obtención de derivados no mutagénicos (McCalla, 1983; Sturdik *et al.*, 1985). Nuestros resultados coinciden con estas observaciones. Los derivados furiletilénicos evaluados poseen el grupo nitro situado como sustituyente en el enlace exocíclico de la cadena etilénica que está como sustituyente en la posición 2 del anillo furánico. Estos derivados han sido catalogados en estudios moleculares de relación estructura-actividad como compuestos no genotóxicos, con una probabilidad mayor del 90 % (Estrada, 1998). Nuestros resultados negativos en el ensayo de micronúcleos *in vitro* apoyan experimentalmente esta característica estructural y confirman que estos compuestos no son genotóxicos y que las diferencias estructurales que hacen que el grupo β-NO₂ de estos derivados 2-furiletilénicos tenga 4 veces mayor carga electrónica negativa que el grupo 5-NO₂ de los compuestos 5-nitrofuranos influyen en su genotoxicidad, de manera que el potencial genotóxico de estos compuestos es menor y no se comportan como genotóxicos cuando se utiliza el ensayo de micronúcleos *in vitro* para su evaluación.

En estos derivados 2-furiletilénicos la reducción del grupo nitro se produce de forma diferente a la de los nitrofuranos clásicos, o se produce de tal manera que no se generan productos intermediarios a concentraciones capaces de provocar daño en el DNA. Quizás, los sistemas celulares de defensa son capaces de modular el posible daño que se genera al producirse el metabolismo de estos compuestos y no se satura ni se sobrepasa la capacidad de los sistemas de defensa de respuesta al daño de las células. La citotoxicidad obtenida en los experimentos realizados se considera adecuada y suficiente para que, en caso de que estos derivados indujeran efectos genotóxicos, se hubiesen podido detectar.

Así pues, en este ensayo, los derivados 2-furiletilénicos evaluados no son genotóxicos y se comportan de manera diferente a los 5-nitrofuranos clásicos y a otros nitrocompuestos como, por ejemplo, los nitroimidazoles y las nitroisoquinolinas, entre otros. Varios compuestos pertenecientes a estos grupos químicos han sido evaluados y producen efectos genotóxicos en ensayos de mutación génica como el test de Ames y, además, inducen un aumento tanto de la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos como de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos (Menéndez *et al.*, 2001; Orsière *et al.*, 2003).

Slapsyte *et al.*, (2002) encontraron efectos genotóxicos en estudios *in vitro* al evaluar la genotoxicidad de la nitrofurantoína, que es el nitrofurano más utilizado en la práctica médica para el tratamiento de infecciones urinarias. La nitrofurantoína provocó aberraciones cromosómicas e intercambios entre cromátidas hermanas en cultivos de linfocitos humanos.

Los resultados negativos obtenidos en nuestro estudio indican que los derivados 2-furiletilénicos son compuestos que no inducen aneuploidía ni roturas en el DNA ya que no inducen la formación de micronúcleos ni un aumento significativo en la frecuencia de células binucleadas en los cultivos de linfocitos humanos a concentraciones a las que se produce citotoxicidad. Por lo tanto, son moléculas más seguras que los nitrofuranos clásicos y otros nitrocompuestos y existe la posibilidad de poder obtener moléculas con interés farmacológico.

4.2. ENSAYO *IN VITRO* DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMÁTIDAS HERMANAS (SCE)

La técnica de SCE es una metodología bien establecida que desde su aparición hasta nuestros días sigue empleándose para la evaluación genotóxica de diversos agentes, en especial de productos químicos. La técnica posee una elevada sensibilidad y se ha demostrado que la mayoría de los agentes carcinogénicos inducen incrementos significativos en la frecuencia de SCE (Kirkland *et al.*, 2005).

En la tabla 13 se resumen los resultados obtenidos en el ensayo de SCE para los tres derivados estudiados. La evaluación se llevó a cabo en cultivos de linfocitos humanos utilizando para la evaluación de cada derivado dos donantes distintos. Para cada producto se realizaron tratamientos cortos de 3 horas, en presencia y ausencia de activación metabólica, y tratamientos continuados de 48 horas sin activación metabólica.

Los derivados G-0 y 2-βNF fueron evaluados en un rango de concentraciones de 1 a 15 µg/mL. El derivado G-1 se pudo evaluar hasta la concentración de 20 µg/mL. Los tres derivados mostraron resultados negativos en la inducción de SCE a la concentración más baja evaluada, tanto en los tratamientos cortos de 3 horas con y sin activación metabólica, como en los tratamientos de 48 horas sin activación metabólica.

Tabla 13: Resumen de los resultados del ensayo de SCE para los derivados 2-furiletilénicos evaluados.

Producto	Dosis µg/mL	Ensayo de SCE <i>in vitro</i> en cultivos de linfocitos humanos					
		3h sin S9	PRÍ ^a	3h con S9	PRÍ ^a	48h sin S9	PRÍ ^a
Control			1.97		2.02		2.08
G-0	1	Negativo ^b	1.85	Negativo ^b	1.87	Negativo ^b	1.90
	5	Negativo/Positivo ^b	1.73	Negativo ^b	1.79	Negativo/Positivo ^b	1.45
	10	Positivo ^b	1.47	Negativo ^b	1.70	Positivo ^b	1.14
	15	-	-	Negativo/Positivo ^b	1.28	-	-
Control			1.91		2.12		2.02
2-βNF	1	Negativo ^b	2.13	Negativo ^b	2.20	Negativo ^b	2.07
	5	Negativo ^b	1.93	Negativo ^b	2.17	Negativo/Positivo ^b	1.77
	10	Negativo/Positivo ^b	1.50	Negativo ^b	1.85	Negativo/Positivo ^b	1.55
	15	Citotoxicidad	-	Negativo/Positivo ^b	1.75	Positivo ^b	1.44
	20	-	-	-	-	Citotoxicidad	-
Control			1.91		2.12		2.02
G-1	1	-	-	-	-	Negativo ^b	1.95
	5	Negativo/Positivo ^b	2.13	Negativo ^b	2.14	Negativo ^b	1.80
	10	Negativo/Positivo ^b	1.86	Negativo ^b	2.04	Negativo/Positivo ^b	1.74
	15	Positivo ^b	1.49	Negativo/Positivo ^b	1.97	Negativo ^b	1.73
	20	Positivo ^{b,c}	1.40	Negativo/Positivo ^b	1.76	Negativo ^{b,c}	1.37

G-0: 2-Furil-1-nitroeteno; 2-βNF: 1-(5-bromofur-2-il)-2-nitroeteno; G-1: 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno.

^a Índice de proliferación celular. Valor de la media con los datos combinados de los donantes empleados en el estudio. ^b Negativo: resultado negativo en los dos donantes; Negativo/Positivo: Resultado negativo en un donante y positivo en el otro donante; Positivo: Resultado positivo en los dos donantes.

^c Datos de un solo donante. Citotoxicidad en el otro donante.

A partir de la concentración de 5 µg/mL ya se obtienen resultados positivos en la inducción de SCE en los tratamientos de 3 horas sin activación metabólica, si bien en el caso del derivado 2-βNF el incremento no se observa hasta la concentración de 10 µg/mL. Los tres derivados inducen incrementos en la frecuencia de SCE en al menos uno de los donantes, en los experimentos con tratamientos de 3 horas sin activación metabólica. Estos resultados positivos en ausencia de activación metabólica se repiten en los experimentos correspondientes a los tratamientos de 48 horas. En estos tratamientos se obtienen incrementos en la frecuencia de SCE en al menos uno de los donantes. Los derivados G-0 y 2-βNF mostraron resultados positivos a partir de la concentración de 5 µg/mL, mientras que el derivado G-1 indujo un incremento en la frecuencia de SCE en uno de los donantes y sólo a la concentración de 10 µg/mL. Esta respuesta no se confirmó en las concentraciones superiores evaluadas, por lo que en los tratamientos continuos el derivado G-1 no parece ser un buen agente inductor de SCE.

Los resultados de los tratamientos de 3 horas con activación metabólica muestran un comportamiento distinto al de los tratamientos sin activación metabólica, ya que la presencia de activación metabólica hace que disminuya la inducción de SCE. Al comparar con los tratamientos de 3 y 48 horas sin activación metabólica, se observa claramente que desaparece la inducción de SCE o que sus niveles no son biológicamente significativos. En los tratamientos de 3 horas en presencia de activación metabólica ninguno de los derivados induce un aumento significativo en la frecuencia de SCE en el rango de concentraciones de 1 a 10 µg/mL. Además, a las concentraciones superiores evaluadas, 15 y 20 µg/mL, se obtienen resultados negativos en al menos uno de los donantes.

Todos los derivados estudiados inducen efectos citotóxicos en los cultivos de linfocitos humanos en todas las condiciones experimentales empleadas, tanto en los tratamientos cortos de 3 horas como en los de 48 horas. Se obtiene una reducción en los valores del índice de proliferación celular (PRI) en relación a los cultivos controles. Esta reducción del PRI presenta una relación dosis-respuesta, a medida que aumenta la concentración evaluada mayor es la citotoxicidad y mayor la reducción del PRI, alcanzando una alta significación estadística al comparar con los controles. Esto se cumple para los tres compuestos estudiados y para todas las condiciones experimentales usadas.

Como puede observarse en la tabla 13, la reducción en el PRI es muy evidente, sobre todo a las concentraciones más altas, lo que demuestra que los derivados inducen efectos citotóxicos en todas las concentraciones, principalmente en las más altas evaluadas. También

puede observarse que, en presencia de activación metabólica, la citotoxicidad disminuye. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo de micronúcleos *in vitro*. En el ensayo de SCE se observa que, en presencia de activación metabólica, pueden estudiarse concentraciones que no pudieron ser evaluadas en los tratamientos sin activación metabólica. En el caso de los derivados G-0 y 2-βNF, puede evaluarse la concentración de 15 µg/mL, imposible de evaluar en los tratamientos de 3 horas sin activación metabólica. En el caso del derivado G-1, pueden evaluarse los datos en los dos donantes a la concentración de 20 µg/mL, lo que demuestra también que la citotoxicidad disminuye como consecuencia del metabolismo, simulado por el sistema de activación metabólica utilizado. Aunque para todos los derivados se obtuvo una reducción estadísticamente significativa de los valores del PRI al comparar con los tratamientos controles, la reducción es menor si se compara con los tratamientos sin activación metabólica.

Además, la disminución de la citotoxicidad va acompañada de una disminución en la frecuencia de SCE. En todos los derivados se observa que, en presencia de activación metabólica, disminuye la inducción de SCE. Así, por ejemplo, a la concentración de 10 µg/mL, donde se obtuvieron resultados positivos para todos los derivados en al menos uno de los donantes en los tratamientos sin activación metabólica, en presencia de activación se obtienen resultados claramente negativos. Además, a las concentraciones superiores evaluadas se obtienen resultados negativos en la inducción de SCE, en al menos uno de los donantes, por lo que, al analizar los datos en su conjunto en los tratamientos con activación metabólica, se consideró que la frecuencia de SCE no alcanza valores biológicamente significativos. Ahora bien, basándonos en los resultados globales del ensayo de SCE, estos derivados se pueden considerar como ligeramente genotóxicos.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos para otros nitrocompuestos y nitrofuranos. Muchos de los productos que pertenecen a esta clase de compuestos químicos son considerados mutagénicos, genotóxicos y carcinogénicos (McCalla, 1983; Ni *et al.*, 1987; Gajewska *et al.*, 1990; Haack *et al.*, 2001; Suter *et al.*, 2002). Muchos 5-nitrofuranos son mutagénicos en bacterias, induciendo mutaciones génicas en varias cepas de *S. typhimurium* en el test de Ames (McCalla, 1983; Sturdik *et al.*, 1985). Los resultados positivos en la inducción de SCE para los derivados evaluados coinciden con los datos que muestran resultados positivos para los 5-nitrofuranos (nitrofurantoína y nitrofurazona). Ambos compuestos inducen tanto aberraciones cromosómicas como SCE en células de mamífero *in vitro* (Anderson *et al.*, 1990). En este trabajo ambos compuestos inducen una respuesta claramente positiva en los tratamientos sin activación metabólica, obteniéndose una respuesta

positiva más clara en la inducción de aberraciones cromosómicas. Como sucede en nuestros experimentos, estos autores pudieron evaluar concentraciones superiores de los nitrofuranos en presencia de activación metabólica, lo que confirma y coincide con nuestras observaciones, indicando la posibilidad de una posible detoxificación metabólica. Además, para la nitrofurantoína obtuvieron un resultado débil positivo tanto en la inducción de aberraciones cromosómicas como en la de SCE en presencia de activación metabólica. Este resultado también coincide con nuestros datos que ponen de manifiesto una disminución de la citotoxicidad y la genotoxicidad en los tratamientos con activación metabólica.

Slapsyte *et al.*, (2001, 2002) publicaron resultados positivos en estudios *in vitro* para la nitrofurantoína y el furagín, un análogo químico y estructural de la nitrofurantoína. Ambos compuestos inducen un incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas y de SCE en cultivos de linfocitos humanos a concentraciones de 20 y 40 μM en tratamientos continuados y en ausencia de activación metabólica, lo que coincide con las condiciones experimentales a las que hemos obtenido resultados positivos en el ensayo de SCE. Mientras que los resultados obtenidos por nosotros con los derivados furiletilénicos sólo son ligeramente positivos, los nitrofuranos evaluados por Slapsyte y colaboradores sí que mostraron resultados claramente positivos en la inducción de SCE.

Además, estos investigadores observaron que cuando se evalúa la inducción de SCE en linfocitos de pacientes (niños) tratados con nitrofurantoína o furagín por un período de hasta 12 meses, la respuesta ya no es tan evidente como en los ensayos realizados *in vitro*. En el tratamiento con furagín se obtienen incrementos en la frecuencia de SCE sólo en algunos pacientes. En el caso de la nitrofurantoína, no se obtienen incrementos estadísticamente significativos en la frecuencia de SCE en los pacientes tratados, pero los autores describen una posible relación entre la acumulación de dosis y el aumento en el número de SCE al mes de tratamiento.

La respuesta genotóxica es menos evidente en el caso de las aberraciones cromosómicas. El producto furagín induce incrementos en la frecuencia de roturas cromatídicas, pero al considerar la frecuencia total de aberraciones, tanto cromosómicas como cromatídicas, no se obtienen diferencias significativas en tratamientos de hasta 12 meses respecto de la frecuencia basal obtenida antes del inicio del tratamiento. La nitrofurantoína tampoco induce incrementos en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en tratamientos de hasta 12 meses de duración. Estos resultados negativos obtenidos *in vivo* en pacientes corroboran nuestros resultados que demuestran una disminución de la citotoxicidad y de la

genotoxicidad de los derivados 2-furiletilénicos al ser evaluados en presencia del sistema de activación metabólica que simula el metabolismo y que, al analizar los resultados globales de los experimentos de SCE, permitieron clasificar a estos derivados como ligeramente genotóxicos en las condiciones empleadas en este ensayo. Los efectos detectados pueden ser debidos a la formación de aductos y a posteriores roturas.

4.3. ENSAYO *IN VITRO* DE ELECTROFORESIS EN CÉLULAS AISLADAS

Como ya hemos comentado, el ensayo de electroforesis en células aisladas (ensayo del cometa) se ha convertido en la última década en un ensayo de genotoxicidad muy utilizado, tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que posee una serie de ventajas como la rapidez, sencillez y elevada sensibilidad, entre otras. Este ensayo permite detectar el daño genotóxico ocasionado por diversos agentes (Tice *et al.*, 2000; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005).

En nuestro trabajo hemos utilizado el ensayo del cometa en cultivos de células linfoblastoides humanas de la línea TK6. Además de obtener datos sobre la genotoxicidad de los derivados furiletilénicos, comparamos el potencial genotóxico de los mismos con el de varios 5-nitrofuranos, por tratarse de isómeros de posición con relación al grupo nitro, siendo una de las características químicas que los diferencia la diferente posición del grupo nitro. Hemos utilizado la versión alcalina del ensayo (pH > 13), que permite evaluar distintos daños en la molécula del DNA tales como roturas de cadena simple, sitios álcali-lábiles y roturas asociadas con sitios de reparación incompleta.

La tabla 14 muestra el resumen de los resultados obtenidos en el ensayo del cometa con los diferentes compuestos evaluados en las condiciones experimentales usadas.

Como se ha explicado anteriormente, el uso del ensayo del cometa tuvo como objetivos fundamentales obtener nuevos datos sobre la genotoxicidad de los derivados 2-furiletilénicos e investigar los efectos de la estructura química sobre la actividad genotóxica. Los tratamientos se realizaron durante 3 horas en ausencia de activación metabólica porque en los estudios previos con los derivados furiletilénicos solamente se observaron débiles incrementos en la frecuencia de SCE en los cultivos de linfocitos humanos tratados principalmente en ausencia de activación metabólica. Por otra parte, siempre que fue posible, las concentraciones empleadas en el ensayo del cometa para los derivados furiletilénicos fueron las mismas que las usadas en los ensayos *in vitro* de SCE. En el caso de las concentraciones de los 5-nitrofuranos, se establecieron en base a las concentraciones empleadas en otros estudios de genotoxicidad (Anderson *et al.*, 1990; Slapsyte *et al.*, 2001,

2002). Para todos los productos el rango final de concentraciones empleadas se estableció también de acuerdo a los ensayos preliminares de viabilidad celular y, para cada compuesto, se eligió un rango de concentraciones donde la viabilidad fuese superior al 70 %.

Los parámetros evaluados para estimar el potencial genotóxico de los compuestos en el ensayo del cometa fueron: el porcentaje de DNA en la cola, el momento de la cola y la longitud de la cola. Para cada compuesto y concentración se obtuvo el valor de la media de cada parámetro analizando 200 células y realizando dos experimentos independientes.

En la tabla 14 se presentan los resultados clasificados como negativos y positivos. Los resultados son considerados negativos cuando no se observaron diferencias significativas (ni biológicas ni estadísticas) entre el tratamiento y el control con el solvente. Los resultados son positivos cuando se han obtenido diferencias estadísticamente significativas al comparar los tratamientos y los controles, aunque hay resultados positivos con una significación estadística clara y otros donde la respuesta positiva es más débil. De manera general, los resultados obtenidos indican que los derivados 2-furiletilénicos evaluados no producen resultados positivos claros y no inducen un daño evidente en el DNA. Los derivados G-0 y G-1 son clasificados como negativos ya que no son capaces de inducir una respuesta positiva clara en los parámetros evaluados. Aunque en algunas concentraciones se llega a alcanzar significación estadística, la respuesta global no se considera biológicamente significativa. Al comparar los valores obtenidos para estos derivados con los datos del control histórico para los tratamientos con el solvente, sólo se observa efecto para el derivado G-1 en el porcentaje de DNA en la cola. Pero los incrementos, respecto a los datos del control histórico, no son superiores a la media del mismo y están comprendidos dentro del límite de confianza del 95% del valor medio del control histórico. Para ninguno de los otros parámetros evaluados se obtuvo una respuesta positiva, por lo que el derivado G-1 se consideró como no genotóxico en este ensayo. El derivado G-0 sólo provocó un incremento estadísticamente significativo de la longitud de la cola, a la dosis más alta evaluada. Este incremento es sólo ligeramente superior a la media de los controles históricos y al valor superior del intervalo de confianza del 95 % de la media. Al no observarse una respuesta positiva para ninguno de los demás parámetros evaluados, se consideró al derivado como no genotóxico. Por su parte, el derivado 2-βNF fue considerado como ligeramente genotóxico en el ensayo. Este compuesto provocó una respuesta positiva a la concentración más alta evaluada en los tres parámetros indicativos de daño genético, principalmente en la longitud de la cola.

Tabla 14: Resumen de los resultados del ensayo del cometa *in vitro* en células linfoblastoides TK6.

Producto	Dosis ($\mu\text{g/mL}$)	Ensayo del cometa en células TK6		
		% DNA en la cola	Momento de la cola	Longitud de la cola
G-0	1	Negativo	Negativo	Negativo
	5	Negativo	Negativo	Positivo
	10	Negativo	Negativo	Positivo
G-1	0.25	Negativo	Negativo	Negativo
	0.50	Positivo	Negativo	Negativo
	1	Positivo	Negativo	Negativo
2- β NF	1	Negativo	Negativo	Positivo
	5	Negativo	Negativo	Positivo
	10	Positivo	Positivo	Positivo
NFT	2	Positivo	Positivo	Positivo
	5	Negativo	Negativo	Positivo
	10	Positivo	Positivo	Positivo
	15	Negativo	Negativo	Positivo
5-FAC	0.50	Negativo	Negativo	Positivo
	1	Negativo	Negativo	Positivo
	2	Positivo	Positivo	Positivo
NFA	5	Positivo	Positivo	Positivo
	10	Positivo	Positivo	Positivo
	20	Positivo	Positivo	Positivo
	30	Positivo	Positivo	Positivo
FZ	20	Positivo	Positivo	Positivo
	30	Positivo	Positivo	Positivo
	60	Positivo	Positivo	Positivo

G-0: 2-furil-1-nitroetano; G-1: 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroetano; 2- β NF: 1-(5-bromofur-2-il)-2-nitroetano; NFT: nitrofurantoína; 5-FAC: 5-nitro-2-furanoacroleína; NFA: nitrofurazona; FZ: nitrofurazona.

Cabe señalar que nuestros resultados constituyen los primeros datos sobre la inducción de daño genético por estos derivados en el ensayo del cometa. Al comparar estos resultados con los de los ensayos de micronúcleos y de SCE *in vitro* obtenidos por nosotros, se obtiene cierta concordancia con los resultados del ensayo de SCE en los tratamientos sin

activación metabólica, en donde estos derivados mostraron una respuesta positiva. Al comparar el caso del derivado 2-βNF hay una coincidencia entre los ensayos de SCE y del cometa; en ambos ensayos se evaluaron concentraciones similares y se obtuvo respuesta positiva, por lo que se confirma que el producto 2-βNF es ligeramente genotóxico en los ensayos *in vitro* sin activación metabólica. En el caso de los derivados G-0 y G-1, los resultados del ensayo de SCE y del cometa no coinciden. En el ensayo de SCE los derivados muestran una respuesta positiva en los tratamientos sin activación, mientras que en el ensayo del cometa los dos derivados son considerados negativos. En el ensayo del cometa el derivado G-0 pudo evaluarse para el mismo rango de concentraciones que en el ensayo de SCE, pero el compuesto G-1 se tuvo que evaluar en un rango de concentraciones inferior, ya que resultó ser más citotóxico en los cultivos de células TK6.

Los resultados obtenidos para los 5-nitrofuranos constituyen los primeros datos publicados sobre compuestos de este grupo en el ensayo del cometa. Los resultados muestran que, de forma general, los cuatro 5-nitrofuranos clásicos evaluados presentan una tendencia a incrementar el daño en el DNA a medida que aumentan las concentraciones ensayadas. Estos compuestos inducen incrementos significativos en los tres parámetros indicativos de daño genético utilizados en el ensayo del cometa.

Los compuestos nitrofurantoína (NFT) y 5-nitro-2-furanoacroleína (5-FAC) mostraron una respuesta positiva, induciendo un incremento significativo en los parámetros evaluados. Aunque, en algunas concentraciones los incrementos no llegan a alcanzar significación estadística, de manera general los valores son superiores a los de los controles históricos. En las concentraciones altas, los valores obtenidos sobrepasan claramente para todos los parámetros los valores de la media del control histórico y el límite superior del intervalo de confiabilidad del 95 % de la media del control histórico. Por consiguiente, al analizar los datos obtenidos para todos los parámetros evaluados, estos compuestos son considerados genotóxicos. Para los otros dos derivados 5-nitrofuranos estudiados, la nitrofurazona (NFA) y la furazolidona (FZ), los resultados muestran una respuesta claramente positiva en la inducción de daño en el DNA. Se obtienen incrementos estadísticamente significativos en todas las concentraciones evaluadas y para los tres parámetros indicativos de daño genético analizados. Los incrementos son claramente superiores a los controles concurrentes e históricos, por lo que los dos productos son considerados genotóxicos en el ensayo del cometa. Considerando los daños genéticos que se detectan en este ensayo y el posible mecanismo de acción de los nitrofuranos, la respuesta positiva obtenida puede ser debida a la

inducción de roturas de cadena sencilla asociadas a sitios de reparación por escisión incompleta.

Nuestros resultados en el ensayo del cometa para los 5-nitrofuranos coinciden de manera general con la respuesta positiva obtenida con estos compuestos en otros sistemas de ensayo: tanto de mutación génica en bacterias, SCE y aberraciones cromosómicas en células de mamífero (McCalla, 1983; Anderson *et al.*, 1990; Madrigal-Bujaidar *et al.*, 1997; Slapsyte *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos también demuestran en este sistema de ensayo, ampliamente utilizado y con elevada sensibilidad, que las diferencias estructurales relativas a la posición del grupo nitro en estos dos grupos de compuestos, influyen en su potencial genotóxico. Dos de los derivados 2-furiletilénicos (G-0 y G-1) son considerados no genotóxicos y el otro derivado (2-βNF) es considerado como ligeramente genotóxico. Los compuestos 5-nitrofuranos clásicos evaluados muestran una respuesta positiva en la inducción de daño en el DNA y son considerados como genotóxicos. Por lo tanto, nuestros resultados coinciden con otros resultados previos donde se plantea que los derivados 2-furiletilénicos que poseen el grupo nitro como sustituyente fuera del anillo furánico tienen menor actividad genotóxica y mutagénica que los compuestos del grupo de los 5-nitrofuranos clásicos, que poseen el grupo nitro unido directamente al anillo furánico (McCalla, 1983; Sturdik *et al.*, 1985; Estrada, 1998).

4.4. ENSAYO *IN VIVO* DE MICRONÚCLEOS EN RATÓN

Este ensayo es uno de los más utilizados para la evaluación del potencial genotóxico *in vivo* en células somáticas y es recomendado por las agencias reguladoras en todo el mundo dentro de la batería de ensayos para determinar el potencial genotóxico de los productos químicos, y ha demostrado ser un ensayo sensible y útil para completar los resultados de los estudios *in vitro* (OECD, 1997; Krishna y Hayashi, 2000). Aunque el ensayo de micronúcleos *in vivo* se ha aplicado en una gran variedad de organismos, lo más habitual es usarlo en roedores y evaluar la inducción de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea o en sangre periférica (Hayashi *et al.*, 1994; OECD, 1997).

En el presente trabajo se utilizó el ensayo de micronúcleos *in vivo* y se evaluó el potencial genotóxico de dos derivados 2-furiletilénicos, G-0 y 2-βNF. Se utilizaron ratones de la cepa CD-1 procedentes de un suministrador acreditado (Charles River, Francia). Es una de las cepas más utilizadas en este ensayo, en el que se evaluó el incremento en la frecuencia de

micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de la médula ósea de los animales tratados. En la tabla 15 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 15: Resultados del ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón.

Producto	Tiempo de muestreo (h)	Dosis (mg/kg)	Resultado	
			MNPCE/1000 PCE	Clasificación
G-0	24	5	2.1	Negativo
		10	1.9	Negativo
		20	1.7	Negativo
	48	20	1.1	Negativo
2-βNF	24	10	1.9	Negativo
		20	1.6	Negativo
		30	1.5	Negativo
	48	30	1.6	Negativo

MNPCE/1000 PCE, eritrocitos policromáticos micronucleados por cada 1000 eritrocitos totales. G-0: 2-furil-1-nitroetano; 2-βNF: 1-(5-bromofur-2-il)-2-nitroetano.

El ensayo se desarrolló siguiendo las recomendaciones de la directriz de la OECD 474 y la normativa europea 2000/32/EC (OECD, 1997; EU, 2000). Se utilizaron ratones machos ya que datos previos mostraron que no había diferencias importantes en la toxicidad entre animales machos y hembras en un estudio realizado con el derivado G-1 (Ramos *et al.*, 1997). En nuestro trabajo se utilizaron cinco animales por cada grupo de tratamiento y para cada uno de los tiempos de muestreo.

Las dosis máximas para cada derivado se establecieron teniendo en cuenta los resultados de un ensayo preliminar de búsqueda de rango de dosis, en donde se utilizaron animales de la misma especie, edad, sexo y con el mismo régimen de tratamiento que el empleado en el ensayo principal de micronúcleos. Para los dos derivados se observaron, tanto en el ensayo preliminar como en el ensayo principal, signos clínicos de toxicidad a la dosis más alta evaluada en los animales tratados. Los signos de toxicidad registrados fueron los siguientes: piloerección, irritación, ataxia ligera, lomo encorvado y disnea. La aparición de estos síntomas en los animales pone claramente de manifiesto que los derivados se absorbieron tras su administración mediante inyección intraperitoneal y que se alcanzaron niveles en sangre que provocaron toxicidad sistémica. Por lo tanto, considerando los síntomas de toxicidad observados y sabiendo que la médula ósea es un tejido muy irrigado y que las concentraciones de un producto en sangre pueden ser similares a las concentraciones que se

alcanzan en la médula ósea (ICH, 1995), podemos concluir que en nuestros experimentos ambos derivados alcanzaron niveles plasmáticos suficientes para interactuar con las células dianas de la médula ósea y demostrar, en su caso, efectos genotóxicos en los eritrocitos policromáticos después del tratamiento administrado en los dos tiempos de muestreo, a las 24 y 48 horas posteriores a la administración.

Los resultados indican que, a pesar de que ambos derivados inducen signos clínicos de toxicidad sistémica y que en algunas dosis se observó una disminución en el índice de toxicidad, indicando toxicidad en la médula ósea de los animales tratados, ninguno de los dos derivados evaluados (G-0 y 2-βNF) provocó un aumento significativo en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE) de la médula ósea en ninguna de las dosis estudiadas y en ninguno de los tiempos de muestreo.

La frecuencia de MNPCE obtenida en ambos experimentos para los animales de los grupos controles, y para los dos tiempos de muestreo, coincide con los valores publicados como normales y están dentro del rango de los valores controles para la frecuencia de MNPCE en ratones de la cepa CD-1 (Salamone y Mavournin, 1994; Krishna *et al.*, 2000). Además, en nuestros experimentos, en los animales pertenecientes al control positivo que fueron tratados con ciclofosfamida (40 mg/kg) se observó un incremento significativo en la frecuencia de MNPCE en la médula ósea, lo que corrobora la sensibilidad de la metodología empleada y de la cepa utilizada. Los valores de la frecuencia de MNPCE en los animales del grupo control positivo también coinciden con los obtenidos por otros laboratorios (Krishna *et al.*, 2000).

Varios 5-nitrofuranos clásicos, además de mostrar resultados positivos en estudios de genotoxicidad *in vitro* (McCalla, 1983; Anderson *et al.*, 1990; Slapsyte *et al.*, 2001, 2002), también han mostrado actividad mutagénica en sistemas de ensayo *in vivo* (Fucic *et al.*, 2003). Otro nitrofurano denominado R-7000, con el grupo nitro unido en la posición 2 del anillo furánico, ha mostrado una actividad mutagénica *in vitro* muy potente. También ha sido capaz de inducir mutación génica, en varios órganos, en ratones transgénicos. Este compuesto es considerado como uno de los mutágenos más potentes *in vitro* en bacterias y también es mutagénico en células de mamífero. A pesar de ser un potente mutágeno *in vitro*, la respuesta *in vivo* en ratones no es tan elevada. En algunos órganos no aumenta la frecuencia de mutación, lo que posiblemente se deba a diferencias en el proceso de nitroreducción entre bacterias y mamíferos y también a diferencias en los sistemas de reparación de las lesiones del DNA (Quillardet *et al.*, 2000).

Recientemente, Fucic *et al.*, (2005) han confirmado que uno de los 5-nitrofuranos clásicos más utilizado en medicina humana, la nitrofurantoína, induce daños en el DNA y efectos genotóxicos *in vivo*. Fucic y colaboradores estudiaron la inducción de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica después de administrar la nitrofurantoína por vía intraperitoneal a las dosis de 5, 10 y 50 mg/kg, un rango de dosis bastante similar al usado en nuestros estudios *in vivo*. Utilizaron una cepa de ratón distinta a la usada por nosotros y utilizaron animales de dos edades distintas, 3 y 8 semanas, para comparar si había diferencia en la inducción de reticulocitos micronucleados en función con la edad de los animales.

La nitrofurantoína provocó un incremento en la frecuencia de micronúcleos en los ratones de ambas edades para todas las dosis y tiempos de muestreo. En los animales adultos (8 semanas), la frecuencia de micronúcleos retornó a los valores normales al cabo de dos semanas tras el tratamiento; mientras que, en los ratones jóvenes (3 semanas), la frecuencia de micronúcleos siempre fue mayor para todas las dosis y tiempos de muestreo, al comparar con los valores de los animales adultos. Además, en los ratones jóvenes, la frecuencia de micronúcleos permaneció elevada hasta las dos semanas posteriores a la administración.

Estos resultados confirman el potencial genotóxico de los compuestos 5-nitrofuranos en un sistema de ensayo *in vivo*. Además, demuestran que los ratones jóvenes son más sensibles al daño genotóxico causado por la nitrofurantoína que los ratones adultos, lo que sugiere que los sistemas de metabolismo, excreción y reparación del DNA en los animales jóvenes quizás no estén lo suficientemente desarrollados para evitar el daño genético y el efecto mutagénico del compuesto genotóxico administrado (Fucic *et al.*, 2005).

En cambio, nuestros resultados negativos con los derivados 2-furiletílicos evaluados en el ensayo de micronúcleos *in vivo* demuestran que estos compuestos poseen un potencial genotóxico menor que el de los 5-nitrofuranos clásicos. Además, confirman los resultados negativos obtenidos con los 2-furiletílicos en los ensayos de genotoxicidad *in vitro* realizados también en nuestro trabajo de Tesis. Nuestros resultados negativos concuerdan con los de los estudios de relación entre la estructura química y la actividad mutagénica realizados con derivados furiletílicos y que clasifican a estos compuestos como no mutagénicos (Estrada, 1998). Además, confirman que los derivados nitrofuranos que poseen el grupo nitro en la posición 5 del anillo furánico son genotóxicos y que la pérdida o sustitución de este grupo hace que disminuya el potencial genotóxico de estos compuestos químicos (McCalla, 1983; Sturdik *et al.*, 1985). Además, nuestros resultados en el ensayo de micronúcleos *in vivo* concuerdan con los resultados negativos de los estudios previos *in vitro*, donde se observó que

los derivados 2-furiletilénicos demostraban tener menor potencial genotóxico en presencia de activación metabólica y que el metabolismo parecía ejercer un efecto de desactivación en estos derivados.

4.5. EFICACIA ANTIMICROBIANA Y SEGURIDAD GENOTÓXICA

Los resultados de nuestro trabajo de Tesis, así como los datos que demuestran las diferencias entre la actividad de las enzimas nitroreductasas en las bacterias y en las células de los mamíferos, nos permiten afirmar que algunos de los derivados 2-furiletilénicos podrían presentar actividad antimicrobiana frente a determinados microorganismos, como pueden ser diversas cepas de bacterias, a concentraciones que no representarían un riesgo genotóxico para las células de los mamíferos. Se podrían, pues, alcanzar concentraciones con actividad farmacológica en humanos, que no presentasen riesgo genotóxico y que, por lo tanto, careciesen de actividad mutagénica en el ser humano. Por consiguiente, en un futuro más o menos próximo se podrían obtener moléculas y productos farmacéuticos pertenecientes al grupo de los 2-furiletilénicos más eficaces y más seguros para el tratamiento de enfermedades provocadas por cepas bacterianas sensibles a estos derivados químicos.

En la tabla 16 se muestran los datos obtenidos a la mínima concentración inhibitoria (MIC) en diversas cepas microbianas del derivado G-1, uno de los derivados 2-furiletilénicos con mayor actividad antibacteriana y antifúngica, así como los valores de la MIC para la nitrofurantoína, frente a las mismas cepas bacterianas.

Tabla 16: Actividad antimicrobiana, mínima concentración inhibitoria. Comparación entre G-1 y nitrofurantoína.

Microorganismo	Actividad antibacteriana ^a	
	G-1 Rango MIC (mg/L)	Nitrofurantoína Rango MIC (mg/L)
<i>Escherichia coli</i>	4 – 32	0.5 – R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8 – 32	32 – R
<i>Proteus mirabilis</i>	4 – 16	8 – R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.5 – 16	R
<i>Enterococcus sp.</i>	2 – 32	4 – 128
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 – 32	4 – 32
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.25 – 16	4 – 16
<i>B. fragilis</i>	0.5 – 16	8 – 16

MIC, mínima concentración inhibitoria; R, resistencia microbiana.

^a (Hamilton-Miller, 1997; Blondeau *et al.*, 1999).

Como puede observarse en la tabla, existen diferencias en la actividad antimicrobiana de ambos compuestos para las cepas frente a las cuales ambos productos han demostrado actividad antibacteriana. Los datos muestran que no hay resistencia bacteriana de ninguna de las especies frente al derivado G-1, mientras que algunas sí que muestran resistencia frente a la nitrofurantoína. En el caso de *P. aeruginosa* se observa una resistencia total frente a la nitrofurantoína, mientras que el derivado G-1 muestra una actividad antibacteriana apreciable frente a este microorganismo.

Por otra parte, otro dato importante a destacar es que el producto G-1, además de su actividad antibacteriana, ha mostrado también actividad frente a levaduras y hongos (Blondeau *et al.*, 1999). El hecho de que este compuesto presente tanto actividad antibacteriana como antifúngica convierte a los derivados 2-furiletílicos, y en especial al derivado G-1, en productos con una aplicación potencial en medicina humana y veterinaria.

Así, por ejemplo, los datos del derivado G-1 demuestran que este producto posee una actividad antimicrobiana frente a algunas especies bacterianas como *P. aeruginosa* (MIC₉₀: 4 mg/L), comparable a la de varios antibacterianos actualmente utilizados como, por ejemplo, aminoglucósidos (MIC₉₀: 8 - 16 mg/L), cefalosporinas (MIC₉₀: 8 - 16 mg/L) y piperacilina/tazobactam (MIC₉₀: 64 mg/L). Además, el G-1 muestra una actividad antifúngica *in vitro* comparable o que está dentro del rango de actividad que muestran algunos agentes antifúngicos actualmente utilizados como, por ejemplo, fluconazol (0,12 - >80 mg/L), la anfotericina (0,007 - >100 mg/L) y la terbinafina (0,0015 - 0,01 mg/L). El rango de actividad antifúngica del G-1 es de (1 - 40,6 mg/L) (Blondeau *et al.*, 1999).

Existen varios ejemplos experimentales que demuestran que para los efectos genotóxicos puede existir una concentración umbral, por debajo de la cual puede asumirse que no existe riesgo genotóxico o mutagénico. Aunque desde hace años se plantea la posibilidad de la existencia de estos valores umbrales, su establecimiento es difícil y cada compuesto químico puede comportarse de manera diferente. Ahora bien, existen pautas y razonamientos para analizar los resultados experimentales y establecer, en su caso, si existe o no un umbral para la genotoxicidad (Müller y Kasper, 2000; Speit *et al.*, 2000).

Existen datos que demuestran que muchos resultados positivos en ensayos de genotoxicidad *in vitro* se producen a concentraciones a las que se induce citotoxicidad. Al analizar los resultados de la batería de ensayos de genotoxicidad en su conjunto, puede concluirse, generalmente, que los resultados positivos *in vitro* asociados a una elevada

citotoxicidad no son relevantes biológicamente para el ser humano, sobre todo si se obtienen otros resultados negativos y si hay resultados *in vivo* también negativos. Esta información es útil para determinar concentraciones umbrales integrando todos los resultados de genotoxicidad (Müller y Kasper, 2000).

Considerando lo anteriormente expuesto y el conjunto de resultados *in vitro* e *in vivo* obtenidos en nuestro trabajo de Tesis, sugerimos que para los derivados 2-furiletilénicos evaluados puede existir un valor umbral por debajo del cual no se produzcan efectos genotóxicos. A estos niveles de exposición, los mecanismos fisiológicos de defensa frente a los posibles daños genotóxicos, como pueden ser los diferentes mecanismos de reparación del DNA, podrían actuar de manera eficiente y, por tanto, no se fijarían los daños en el DNA que pudiesen dar lugar a efectos mutagénicos y, eventualmente, carcinogénicos. Ahora bien, para tener la completa seguridad y poder establecer concentraciones umbrales para estos compuestos a las que se obtendrían los efectos farmacológicos deseados, sin que existiese riesgo genotóxico, es necesario continuar con las investigaciones para determinar niveles de exposición eficaces y a la vez seguros para el ser humano.



CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral, así como del análisis y discusión de los mismos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Ninguno de los derivados 2-furiletílicos evaluados G-0, G-1 y 2-βNF induce un aumento significativo en la frecuencia de células binucleadas micronucleadas en cultivos de linfocitos humanos, en ninguna de las condiciones experimentales ni en presencia ni en ausencia de activación metabólica.
2. Los tres derivados furiletílicos evaluados inducen un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de SCE en cultivos de linfocitos humanos *in vitro*. Se consideran como agentes débilmente genotóxicos, principalmente en los tratamientos sin activación metabólica.
3. Los resultados positivos en la inducción de SCE corresponden a concentraciones a las que se observa citotoxicidad en los cultivos celulares y una marcada reducción en el índice de proliferación celular.
4. La inducción de SCE disminuye hasta valores estadísticamente no significativos, o sin relevancia biológica, cuando se evalúan los derivados 2-furiletílicos en presencia de activación metabólica.
5. En el ensayo del cometa, los derivados G-0 y G-1 no inducen daño en el DNA en células TK6 en ausencia de activación metabólica. El derivado 2-βNF resultó ligeramente genotóxico a la concentración más alta evaluada (10 µg/mL).
6. Los compuestos 5-nitrofuranos evaluados inducen un claro efecto genotóxico en células TK6 en el ensayo del cometa. Estos resultados coinciden con los resultados positivos obtenidos para estos compuestos en otros ensayos de genotoxicidad.
7. Nuestros resultados confirman que los derivados 2-furiletílicos estudiados, que poseen el grupo nitro como sustituyente fuera del anillo furánico, poseen menor actividad genotóxica que los compuestos nitrofuranos que poseen el grupo nitro como sustituyente directo en el anillo furánico.
8. Los derivados G-0 y 2-βNF no inducen un aumento significativo, ni biológica ni estadísticamente, de la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en las células de la médula ósea de ratones en el estudio de micronúcleos *in vivo*.

9. En general, los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* e *in vivo* coinciden y confirman los resultados de los estudios de relación entre estructura química y actividad genotóxica que sirvieron para clasificar a estos derivados 2-furiletilénicos como no genotóxicos.
10. Los resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo* reflejan el papel de la biotransformación en la desactivación metabólica de estos derivados.
11. Los tres derivados evaluados G-0, G-1 y 2-βNF inducen una elevada citotoxicidad en los cultivos de células de mamífero, linfocitos humanos y células TK6 *in vitro*, principalmente en los tratamientos sin activación metabólica. Además, inducen signos clínicos de toxicidad sistémica en los ratones tratados en el estudio de micronúcleos *in vivo*.



BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aghamohammadi S.Z., Henderson L. y Cole R.J. (1984) The human lymphocyte micronucleus assay. Response of cord blood lymphocytes to gamma-irradiation and bleomycin. *Mutat. Res.*, 130: 395-401.
- Aksoy H., Yilmaz S., Celik M., Yuzbasioglu D. y Unal F. (2005) Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers. *J. Appl. Toxicol.*, 26: 10-15.
- Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A.T., Norppa H., Shuker D.E.G., Tice R., Waters M.D. y Aitio A. (2000) IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.*, 463: 111-172.
- Ames B.N. (1998) Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicol., Lett.*, 102/103: 5-18.
- Anderson B.E., Zeiger E., Shelby M.D., Resnick M.A., Gulati D.K., Ivett J.L. y Loveday K.S. (1990) Chromosome aberration and sister chromatid exchange test results with 42 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16, (Suppl 18): 55-137.
- Ashby J. y Tinwell H. (1990) The serial dosing rodent bone-marrow micronucleus assay test protocol: context, purpose and design of the collaborative study. *Mutat. Res.*, 234: 111-114.
- Auerbach C. y Robson J.M. (1946) Chemical production of mutation. *Nature*, 157: 302.
- Aust A.E. (1991) Mutation and cancer. En: Genetic Toxicology. A.P. Li, R.H. Heflich (Eds). CRC Press Inc., Boca Raton, pp 93-117.
- Bandow J.E., Brötz H., Leichert L.I., Labischinski H. y Hecker M. (2003) Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 948-955.
- Bhattacharya K., Dopp E., Kakkar P., Jaffery F.N., Schiffman D., Jaurand M.C. Rahman I. y Rahman Q. (2005) Biomarkers in risk assessment of asbestos exposure. *Mutat. Res.*, 579: 6-21.
- Blondeau J.M., Castañedo N., González O., Medina R. y Silveira E. (1999) In vitro evaluation of G1: a novel antimicrobial compound. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 11: 163-166.
- Boller K. y Schmid W. (1970) Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon. *Humangenetik*, 11: 35-54.
- Brendler-Schwaab S., Hartmann A., Pfuhrer S. y Speit G. (2005) The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 245-254.

Brumfitt W. y Hamilton-Miller J.M. (1998) Efficacy and safety profile of long-term nitrofurantoin in urinary infections: 18 years' experience. *J. Antimicrob. Chemother.*, 42: 363-371.

Butterworth B.E. y Slaga T.J. (1987) Nongenotoxic mechanisms of carcinogenesis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Carrano A.V. y Natarajan A.T. (1988) Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC). Publication No. 14 *Mutat. Res.*, 204: 379-406.

Carrano A.V., Thompson L.H., Lindl P.A. y Minkler J.L. (1978) Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. *Nature*, 271: 551-553.

Cebulska-Wasilewska A., Panek A., Zabinski Z., Moszczynski P. y Au W.W. (2005) Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. *Mutat. Res.*, 586: 102-114.

Chicca M.C., Nesti C., Muzzoli M., Pasetti P. y Pinamonti S. (1996) Correlation between age and DNA damage detected by FADU in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, 316: 201-208.

Choy W.N. (1996 a) Principles of genetic toxicology. En: Toxicology and Risk Assessment. Principles, Methods and Applications. A.M. Fan y L.W. Chang (Eds). Marcel Dekker Inc., New York, pp 25-36.

Choy W.N. (1996 b) Genetic toxicology testing. En: Toxicology and Risk Assessment. Principles, Methods and Applications. A.M. Fan y L.W. Chang (Eds). Marcel Dekker Inc., New York, pp 153-169.

Choy W.N., Henika P.R., Willhite C.C. y Tarantal A.F. (1993) Incorporation of a micronucleus study into a developmental toxicology and pharmacokinetic study of L-selenomethionine in nonhuman primates. *Environ. Mol. Mutagen.*, 21: 73-80.

Cohen S.M. y Ellwein L.B. (1990) Cell proliferation in carcinogenesis. *Science*, 249: 1007-1011.

COM, United Kingdom Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (2000) Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity, pp 1-36.

Couch D.B. (1996) Carcinogenesis: basic principles. En: Toxicology and Risk Assessment. Principles, Methods and Applications. A. M. Fan, L.W. Chang (Eds). Marcel Dekker Inc., New York, pp 9-24.

Countryman P.I. y Heddle J.A. (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 41:321-332.

Dearfield K.L., Cimino M.C., McCarroll N.E., Mauer I. y Valcovic L.R. (2002) Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutat. Res.*, 521: 121-135.

DeMarini D.M., Richard A.M., Shelby M.D. y Waters M.D. (1994) Hazard identification. En: Methods for Genetic Risk Assessment. D. Brusick (Ed). Lewis Publisher, CRC Press, Inc., Boca Raton, pp 1-27.

DeSesso J.M. y Harris S.B. (1996) Principles underlying developmental toxicity. En: Toxicology and Risk Assessment. Principles, Methods and Applications. A.M. Fan y L.W. Chang (Eds). Marcel Dekker Inc., New York, pp 37-56.

DH (1989) Report on health and social subjects, 35. Guidelines for the testing of chemicals for mutagenicity. Committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products and the environment. HMSO, London.

Díaz H.G., Bastida I., Castañedo N., Nasco O., Olazabal E., Morales A., Serrano H.S. y de Armas R.R. (2004) Simple stochastic fingerprints towards mathematical modelling in biology and medicine. 1. The treatment of coccidiosis. *Bull. Math. Biol.*, 66:1285-1311.

DNHW, Health Protection Branch (1991) Genotoxicity assays recommended in the health protection branch genotoxicity committee report. Ottawa, Canada.

Donald deBethizy J. y Hayes J.R. (1994) Metabolism. A Determinant of Toxicity. En: Principles and Methods of Toxicology. A.W. Hayes (Ed). Raven Press, Ltd., New York, pp 59-100.

Duydu Y., Dur A. y Suzen H.S. (2005) Evaluation of increased proportion of cells with unusually high sister chromatid exchange counts as a cytogenetic biomarker for lead exposure. *Biol. Trace Elem. Res.*, 104: 121-129.

Eastmond D.A. y Tucker J.D. (1989) Kinetochores localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: a new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents. *Mutat. Res.*, 224: 517-525.

EPA, US Environmental Protection Agency (1986) Guidelines for mutagenicity risk assessment. *Federal Register*, 51: 34006-34012.

- EPA, US Environmental Protection Agency (2005) Guidelines for carcinogen risk assessment. Washington, DC.
- Estrada E. (1998) Structure-mutagenicity relationships in 2-furylethylene derivatives. A molecular orbital study of the role of nitro groups. *Mutat. Res.*, 420: 67-75.
- Estrada E. y Molina E. (2001) 3D connectivity indices in QSPR/QSAR studies. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 41: 791-797.
- EU (2000) Commission Directive 2000/32/EC, Annex 4C. *Off. J. Eur. Community*, 136: 50-56.
- Evans H.J. (1988) Mutation cytogenetics: past, present and future. *Mutat. Res.*, 204: 355-363.
- Fenech M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.*, 285: 35-44.
- Fenech M. (1998) Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes - a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat. Res.*, 404: 155-165.
- Fenech M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.*, 455: 81-95.
- Fenech M. y Morley A.A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147: 29-36.
- Fenech M., Perepetskaya G. y Mikhalevich L. (1997) A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human population-experiences from Chernobyl catastrophe. *Environ. Mol. Mutagen.*, 30: 112-118.
- Fernández-Torres B., Carrillo A.J., Martín E., Del Palacio A., Moore M.K., Valverde A., Serrano M. y Guarro J. (2001) In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45: 2524-2528.
- Fucic A., Markovic D. y Ferencic Z. (2003) Micronucleus induction in mouse peripheral reticulocytes by 5-nitrofurantoin. EEMS Book of abstracts, 49-50.
- Fucic A., Markovic D., Ferencic Z., Mildner B., Jazbec A.M. y Spoljar J.B. (2005) Comparison of genomic damage caused by 5-nitrofurantoin in young and adult mice using the in vivo micronucleus assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 46: 59-63.

- Gajewska J., Szczypka M., Tudek B. y Szymczyk T. (1990) Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone. *Mutat. Res.*, 232: 191-197.
- Garriott M.L., Phelps J.B. y Hoffman W.P. (2002) A protocol for the in vitro micronucleus test. I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutat. Res.*, 517: 123-134.
- George E., Wootton A.K., y Gatehouse D.G. (1990) Micronucleus induction by azobenzene and 1,2-dibromo-3-chloropropane in the rat: evaluation of a triple-dose protocol. *Mutat. Res.*, 234: 129-134.
- Gibson D.P., Aardema M.J., Kerckaert G.A., Carr G.J., Brauninger R.M. y Le Boeuf R.A. (1995) Detection of aneuploidy-inducing carcinogens in Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay. *Mutat. Res.*, 343: 7-24.
- Gibson D.P., Brauninger R., Shaffi H.S., Kerckaert G.A., LeBoeuf R.A., Isfort R.J. y Aardema M.J. (1997) Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutat. Res.*, 392: 61-70.
- Gold L.S., Slone T.H., Stern B.R. y Bernstein L. (1993) Comparison of target organs of carcinogenicity for mutagenic and non-mutagenic chemicals. *Mutat. Res.*, 286: 75-100.
- Guay D.R. (2001) An update on the role of nitrofurans in the management of urinary tract infections. *Drugs*, 61: 353-364.
- Haack T., Erdinger L. y Boche G. (2001) Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 of nitroso and respective hydroxylamine compounds. *Mutat. Res.*, 491: 183-193.
- Hamilton-Miller J.M. (1997) Nitrofurans. En: Antibiotic and Chemotherapy. F. O'grady, H.P. Lambert, R.G. Finch y D. Greenwood (Eds). Churchill Livingstone, London, pp 396-403.
- Hanahan D. y Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- Hartman P.E. (1983) Mutagens: some possible health impacts beyond carcinogenesis. *Environ. Mutagen.*, 5: 139-152.
- Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T. y Ishidate M.Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, 245: 245-249.

Hayashi M., Tice R.R., MacGregor J.T., Anderson D., Blakey D.H., Kirsch-Volders M., Oleson F.B.Jr., Pacchierotti F., Romagna F., Shimada H., Sutou S. y Vannier B. (1994) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res.*, 312: 293-304.

Hogstedt B. (1984) Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutat. Res.*, 130: 63-72.

IARC, International Agency for Research on Cancer (1999) The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. Lyon, France.

ICH (1995) International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Test for Pharmaceuticals.

ICH (1997) International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals.

Karlowsky J.A., Kelly L.J., Thornsberry C., Jones M.E. y Sahm D.F. (2002) Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 2540-2545.

Kinzler K.W. y Vogelstein B. (2002) Colorectal tumors. En: *The Genetic Basis of Human Cancer*. B. Vogelstein, K.W. Kinzler (Eds). McGraw-Hill, New York.

Kirkland D., Aardema M., Henderson L. y Müller M. (2005) Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat. Res.*, 584: 1-256.

Kirkland D.J. (1993) Genetic toxicology testing requirements: official and unofficial views from Europe. *Environ. Mol. Mutagen.*, 21: 8-14.

Kirsch-Volders M., Radman M., Jeggo P. y Verschaeve L. (1984) Molecular mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. En: *Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Industrial Pollutants*. M. Kirsch-Volders (Ed). Plenum Press, New York, pp. 5-58.

Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M. Jr., Kirchner S., Lorge E., Morita T., Norppa H., Surrallés J., Vanhauwaert A. y Wakata A. (2003) Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat. Res.*, 540: 153-163.

Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmont D., Fenech M., Ishidate M.Jr., Lorge E., Norppa H., Surrallés J., von der Hude W. y Wakata A. (2000) Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 167-172.

Knudson A.G. (1993) Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 11914-11921.

Krishna G. y Hayashi M. (2000) In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.*, 455: 155-166

Krishna G., Urda G. y Paulissen J. (2000) Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutat. Res.*, 453: 45-50.

Lazutka J.R., Dedonyte V. y Krapavickaite D. (1994) Sister-chromatid exchanges and their distribution in human lymphocytes in relation to age, sex and smoking. *Mutat. Res.*, 306: 173-180.

Lee M., Kwon J. y Chung M.K. (2003) Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. *Mutat. Res.*, 541: 9-19.

MacGregor J.T. (1994) Environmental mutagenesis: past and future directions. *Mutat. Res.*, 23: 73-77.

MacGregor J.T., Casciano D. y Müller L. (2000) Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutat. Res.*, 455: 3-20.

Madrigal-Bujaidar E., Ibáñez J.C., Cassani M. y Chamorro G. (1997) Effect of furazolidone on sister-chromatid exchanges, cell proliferation kinetics, and mitotic index in vivo and in vitro. *J. Toxicol. Environ. Health*, 51: 89-96.

Marrero-Ponce Y., Castillo-Garit J.A., Olazabal E., Serrano H.S., Morales A., Castañedo N., Ibarra-Velarde F., Huesca-Guillen A., Jorge E., del Valle A., Torrens F. y Castro E.A. (2004) TOMOCOMD-CARDD, a novel approach for computer-aided 'rational' drug design: I. Theoretical and experimental assessment of a promising method for computational screening and in silico design of new anthelmintic compounds. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 18: 615-634.

Marrero-Ponce Y., Castillo-Garit J.A., Olazabal E., Serrano H.S., Morales A., Castañedo N., Ibarra-Velarde F., Huesca-Guillen A., Sánchez A.M., Torrens F. y Castro E.A. (2005) Atom, atom-type and total molecular linear indices as a promising approach for bioorganic and

medicinal chemistry: theoretical and experimental assessment of a novel method for virtual screening and rational desing of new lead anthelmintic. *Bioorg. Med. Chem.*, 13: 1005-1020.

Matsushima T., Hayashi M., Matsuoka A., Ishidate M. Jr., Miura K. F., Shimizu H., Susuki Y., Morimoto K., Ogura H., Mure K., Koshi K. y Sofuni T. (1999) Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, 14: 569-580.

McCalla D.R. (1983) Mutagenicity of nitrofurans derivatives: review. *Environ. Mutagen.* 5: 745-765.

McOsker C.C. y Fitzpatrick P.M. (1994) Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J. Antimicrob. Chemother.*, 33: 23-30.

Medina R., Bernal M.G. y Rodríguez J.A. (2000) Inducción de la resistencia in vitro al G-1. Estudio preliminar. *Medicentro*, 4.

Menéndez D., Rojas E., Herrera L.A., López M.C., Sordo M., Elizondo G. y Ostrosky-Wegman P. (2001) DNA breakage due to metronidazole treatment. *Mutat. Res.*, 478: 153-158.

Mitelman F. (1988) Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. Alan R. Liss, New York.

Moriya M., Kato K. y Shirasu Y. (1978) Effects of cysteine and a liver metabolic activation system on the activities of mutagenic pesticides. *Mutat. Res.*, 57: 259-263.

Müller H.J. (1927) Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66: 84-87.

Müller L. y Kasper P. (2000) Human biological relevance and the use of threshold-arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. *Mutat. Res.*, 464: 19-34.

Müller L., Kikuchi Y., Probst G., Schechtman L., Shimada H., Sofuni T. y Tweats D. (1999) ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat. Res.*, 436: 195-225.

Murthy M.S. y Najaria K.B. (1980) Deactivation of furyl furamide (AF-2) by rat-liver microsomes and its implication in short-term test for mutagenicity/carcinogenicity. *Mutat. Res.*, 77: 127-134.

Murthy M.S. y Sankaranarayanan N. (1978) Induction of gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae* by the nitrofurantoin derivative furylfuramide (AF-2). *Mutat. Res.*, 58: 23-25.

- Nakai S. y Michida I. (1974) Mutagenic action of acryl furamide in yeast. *Mutat. Res.*, 26: 437.
- Natarajan A.T., Meijers M., van Zeeland A.A. y Simons J.W.I.M. (1982) Attempts to detect ataxia telangiectasia (AT) heterozygotes by cytogenetical techniques. *Cytogenet. Cell Genet.*, 33: 145-151.
- Natarajan A.T., Simons J.W.I.M., Vogel E.W. y van Zeeland A.A. (1984) Relationship between cell killing, chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and point mutations induced by monofunctional alkylating agents in Chinese hamster cells. A correlation with different ethylating products in DNA. *Mutat. Res.*, 128: 31-40.
- Natarajan A.T., Tucker J.D. y Sasaki M.S. (1994) Monitoring cytogenetic damage in vivo. En: *Methods to Assess DNA Damage and Repair. Interspecies Comparisons.* R.G. Tardiff, P.H. M. Lohman y G.N. Wogan (Eds). Wiley, Chichester, UK, pp 95-117.
- Ni Y.C., Heflich R.H., Kadlubar F.F. y Fu P.P. (1987) Mutagenicity of nitrofurans in *Salmonella typhimurium* TA98, TA98NR and TA98/1,8-DNP6. *Mutat. Res.*, 192: 15-22.
- Nomura T. (1975) Carcinogenicity of food additive furylfuramide in foetal and young mice. *Nature*, 258: 610-611.
- Obe G. y Beek B. (1975) The human leukocyte test system. VII. Further investigations concerning micronucleus-derived premature chromosome condensation. *Humangenetik*, 30: 143-154.
- OECD (1997) Guideline 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals. OECD, Paris, France, 1-10.
- OECD (2004) Draft Guideline 487, In Vitro Micronucleus Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals. OECD, Paris, France, 1-13.
- Ong, T.O. y Shahin M.M. (1974) Mutagenic and recombinogenic activities of the food additive furylfuramide in eukaryotes. *Science*, 184: 1086-1087.
- Orsière T., De Méo M., Rathelot P., Pompili J., Galas M., Castegnaro M., Vanelle P., y Duménil G. (2003) Implication of nitro group reduction in the mutagenic and chromosome damaging activities of 22 new 5-nitroisoquinolines by the *Salmonella* mutagenicity test and the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Food Chem. Toxicol.*, 41: 275-290.
- Ostling O. y Johanson K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 291-298.

- Parry E.M. y Parry J.M. (1995) In vitro cytogenetics and aneuploidy. En: Environmental Mutagenesis. D.H. Phillips y S. Venitt (Eds). Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, pp 121-139.
- Perry P. y Wolff S. (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251: 156-158.
- Perry P., Henderson L. y Kirkland D. (1984) Sister-chromatid exchange in cultured cells. En: UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. B.J. Dean (Ed.), UKEMS, pp. 89-109.
- Petrilli F.L. y de Flora S. (1978) Metabolic deactivation of hexavalent chromium mutagenicity. *Mutat. Res.*, 54: 139-147.
- Pincu M., Bass D. y Norman A. (1984) An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 139: 61-65.
- Pires J.R., Saito C., Gomes S.L., Giesbrecht A.M. y Amaral A.T. (2001) Investigation of 5-nitrofurán derivatives: synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure-activity relationships. *J. Med. Chem.*, 44: 3673-3681.
- Polatti F., Nappi R.E., Brundu B., Fantuzzi M. y Frisenda L. (2003) Clinical study on the dose-effect relationship of a nifuratel-nystatin combination in the treatment of vulvo-vaginal infections. *Arzneimittelforschung*, 53: 730-737.
- Purves D., Harvey C., Tweats D. y Lumley C.E. (1995) Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. *Mutagenesis*, 10: 297-312.
- Quillardet P., Michel V., Arrault X., Hofnung M. y Touati E. (2000) Mutagenic properties of nitrofurán, 7-methoxy-2-nitronaphtho [2, 1-b] furán (R 7000), in lacI transgenic mice. *Mutat. Res.*, 470: 177-188.
- Ramos A., Vizoso A., Edreira A., Betancourt J. y Décalo M. (1997) Activity of a nitroalkene derivative, 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroethene, in the Salmonella/microsome assay and the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.*, 390: 233-238.
- Rosenberg M., Balaz S., Sturdik E. y Kuchár A. (1987) Reactivity of 2-furylethylenes with nucleophilic groups and its biological significance. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 52: 425-436.
- Rouse J. y Jackson S.P. (2002) Interfaces between the detection, signalling, and repair of DNA damage. *Science*, 297: 547-551.

- Rydberg B. y Johanson K.J. (1978) Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. En: DNA Repair Mechanisms. P.C. Hanwalt y E.C. Friedberg (Eds). Academic Press, New York, pp 465-468.
- Sahm D.F., Thornsberry C., Mayfield D.C., Jones M.E. y Karlowsky J.A. (2001) Multidrug-resistant urinary tract isolates of *Escherichia coli*: prevalence and patient demographics in the United States in 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45: 1402-1406.
- Salamone M.F., y Mavournin K.H. (1994) Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environ. Mol. Mutagen.*, 23: 239-273.
- Sasaki Y.F., Fujikawa K., Ishida K., Kawamura N., Nishikawa Y., Ohta S., Satoh M., Madarame H., Ueno S., Susa N., Matsusaka N. y Tsuda S. (1999) The alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs: results with 30 aromatic amines evaluated by the IARC and U.S. NTP. *Mutat. Res.*, 440: 1-18.
- Schmid W. (1975) The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31: 9-15.
- Schmid W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection. Vol. 4, A. Hollander (Ed). Plenum Press, New York, pp 31-53.
- Shelby M.D. (1988) The genetic toxicity of human carcinogens and its implications. *Mutat. Res.*, 204: 3-15.
- Shelby M.D. y Sofuni T. (1991) Toxicology testing requirements and the U.S.-Japan collaborative study on in vitro test for chromosomal aberrations. *Environ. Health Perspect.*, 94: 255-259.
- Shelby M.D. y Zeiger E. (1990) Activity of human carcinogens in Salmonella and rodent bone-marrow cytogenetic tests. *Mutat. Res.*, 234: 257-261.
- Singh N.P. (1998) Sodium ascorbate induces DNA single-strand breaks in human cells in vitro. *Mutat. Res.*, 375: 195-203.
- Singh N.P. (2000) Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat. Res.*, 455: 111-127.
- Singh N.P., Graham M.M., Singh V. y Khan A. (1995) Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low dose of gamma rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68: 563-569.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. y Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191.

- Singh N.P., Stephens R.E. y Schneider E.L. (1994) Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int. J. Radiat. Biol.*, 66: 23-28.
- Singh N.P., Stephens R.E., Singh H. y Lai H. (1999) Visual quantification of DNA double-strand breaks in bacteria. *Mutat. Res.*, 429: 159-168.
- Sisson G., Goodwin A., Raudonikiene A., Hughes N.J., Mukhopadhyay A.K., Berg D.E. y Hoffman P.S. (2002) Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 2116-2123.
- Skeggs H.R., Berglund M.R., VandenHeuvel W.J., Mrozik H., Wislocki P.G. y Wolf F.J. (1984) Effect of liver enzymes on the mutagenicity of nitroheterocyclic compounds: activation of 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-3-(1-methyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-1,2-benzisoxazole and deactivation of nitrofurans and nitroimidazoles in the Ames test. *Mutat. Res.*, 136: 1-8.
- Slapsyte G., Jankauskiene A., Mierauskiene J. y Lazutka J.R. (2002) Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of children treated with nitrofurantoin for recurrent urinary tract infection. *Mutagenesis*, 1: 31-35.
- Slapsyte G., Jankauskiene A., Mierauskiene J. y Lazutka J.R. (2001) Cytogenetic analysis of children under long-term antibacterial therapy with nitroheterocyclic compound furagin. *Mutat. Res.*, 491: 25-30.
- Soares E.R. y Sheridan W. (1975) Lack of induction of dominant lethals in mice by orally administered AF-2. *Mutat. Res.*, 31: 235-240.
- Sorsa M., Pyy L., Salomaa S., Nylund L. y Yager J.W. (1988) Biological and environmental monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide in industry and hospitals. *Mutat. Res.*, 204: 465-479.
- Soska J., Koukalová B. y Ebringer L. (1981) Mutagenic activities of simple nitrofurans derivatives. I. Comparison of related compounds in the phage inductest, chloroplast-bleaching and bacterial-repair and mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 81: 21-26.
- Speit G., Autrup H., Crebelli R., Henderson L., Kirsch-Volders M., Madle S., Parry J.M., Sarrif A.M. y Vrijhof H. (2000) Thresholds in genetic toxicology-concluding remarks. *Mutat. Res.*, 464: 149-153.
- Sturdik E., Benova M., Miertus S., Balaz S., Rosenberg M., Sturdikova M., Ebringer L., Stibranyi L., Ilavsky D. y Vegh D. (1986) Relationships between Structure of 5-nitro-2-

furylethylenes and their SOS-function-inducing activities in *Escherichia coli*. *Chem. Biol. Interact.*, 58: 69-78.

Sturdik E., Drobnica L. y Balaz S. (1983) Reactions of 2-furylethylenes with thiol enzymes. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 48: 336-345.

Sturdik E., Rosenberg M., Stibranyi L., Balaz S., Chreno O., Ebringer L., Ilavsky D. y Vegh D. (1985) Structure-mutagenicity relationships of 5-nitro-2-furylethylenes in *Salmonella thypimurium* TA98. *Chem. Biol. Interact.*, 53: 145-153.

Sugiyama T., Goto K. y Uenaka H. (1975) Acute cytogenetic effect of 2-(furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide (AF-2, a food preservative) on rat bone marrow cells in vivo. *Mutat. Res.*, 31: 241-246.

Surrallés J. y Natarajan A.T. (1997) Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat. Res.*, 392: 165-174.

Surrallés J., Antoccia A., Creus A., Degrassi F., Peris F., Tanzarella C., Xamena N. y Marcos R. (1994) The effect of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. Results from two laboratories. *Mutagenesis*, 9: 347-353.

Surrallés J., Autio K., Nylund L., Jarventaus H., Norppa H., Veidebaum T., Sorsa M. y Peltonen K. (1997) Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. *Carcinogenesis*, 18: 817-823.

Surrallés J., Xamena N., Creus A., Catalán J., Norppa H. y Marcos R. (1995) Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated lymphocytes cultures. *Mutat. Res.*, 341: 169-184.

Suter W., Hartmann A., Poetter F., Sagelsdorff P., Hoffmann P. y Martus H.J. (2002) Genotoxicity assessment of the antiepileptic drug AMP397, and Ames-positive aromatic nitro compound. *Mutat. Res.*, 518: 181-194.

Tan T.Y., McNulty C., Charlett A., Nessa N., Kelly C. y Beswick T. (2003) Laboratory antibiotic susceptibility reporting and antibiotic prescribing in general practice. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51: 379-384.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C. y Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-221.

- Tonomura A. y Sasaki M.S. (1973) Chromosome aberrations and DNA repair synthesis in cultured human cells exposed to nitrofurans. *Japan J. Genetics*, 48: 292-294.
- Tucker J.D. y Preston R.J. (1996) Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cáncer risk assessment. *Mutat. Res.*, 365: 147-159.
- Tucker J.D., Auletta A., Cimino M.C., Dearfield K.L., Jacobson-Kram D., Tice R.R. y Carrano A.V. (1993) Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 297: 101-180.
- Tuppurainen K., Lötjönen S., Laatikainen R., Vartiainen T., Marau U., Strandberg M. y Tamm T. (1991) About the mutagenicity of chlorine-substituted furanones and halopropenals. A QSAR study using molecular orbital indices. *Mutat. Res.*, 247: 97-102.
- United States Congress, (1976) Toxic substances control act. En: *Chemicals Mutagens: Principles and Methods for their Detection*. A. Hollaender y F.J. De Serres (Eds). Plenum, New York, pp 287-335.
- Van Hummelen P. y Kirsch-Volders M. (1992) Analysis of eight known or suspected aneugens by the in vitro human lymphocyte micronucleus test. *Mutagenesis*, 7: 447-455.
- Venitt S. y Phillips D. H. (1995) The importance of environmental mutagens in human carcinogenesis and germ line mutation. En: *Environmental Mutagenesis*. D. H. Phillips, S. Venitt (Eds). Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, pp 1-20.
- Vogel H., Lim D.S., Karsenti G., Finegold M. y Hasty P. (1999) Deletion of Ku86 causes early onset of senescence in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 96: 10770-10775.
- Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A.M. y Bos J.L. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Eng. J. Med.*, 319: 525-532.
- von der Hude W., Kalweit S., Engelhardt G., McKiernan S., Kasper P., Slacik-Erben R., Miltenburger H.G., Honarvar N., Fahrig R., Gorlitz B., Albertini S. Kirchner S., Utesch D., Potter-Locher F., Stopper H. y Madle S. (2000) In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of the collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutat. Res.*, 468: 137-163.
- Wakata A. y Sasaki M.S. (1987) Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, 190: 51-57.

Wassom J.S. (1989) Origins of genetic toxicology and the Environmental Mutagen Society. *Environ. Mol. Mutagen.*, 14 (Suppl 16): 1-6.

Wild D. (1975) Mutagenicity of the food additive AF-2, a nitrofurán, in *Escherichia coli* and Chinese hamster cells in culture. *Mutat. Res.*, 31: 197-199.

Zhanel G.G., Karlowsky J.A., Harding G.K.M., Carrie A., Mazzulli T., Low D.E. y Hoban D.J. (2000) A Canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: comparison of the activities of trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, mecillinam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 1089-1092.

