Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina
Unidad de Posgrado

Acción "in vitro" e "in vivo" del niridazole comparativamente con otras drogas antiesquistosomiásicas sobre el aparato genital femenino del *Schistosoma mansoni*

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Medicina

AUTOR

César Gabriel NÁQUIRA VELARDE

Lima, Perú

1974



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Náquira C. Acción "in vitro" e "in vivo" del niridazole comparativamente con otras drogas antiesquistosomiásicas sobre el aparato genital femenino del Schistosoma mansoni [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 1974.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Acción "in vitro" e "in vivo" del Niridazole comparativamente con otras Drogas Antiesquistosomiásicas sobre el Aparato Genital femenino del *Schistosoma mansoni*

TESIS DE DOCTOR EN MEDICINA

César G. Náquira Velarde

QL
391.P7
N24
ej.2

1974

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA CENTRAL

Acción "in vitro" e "in vivo" del Niridazole comparativamente con otras Drogas Antiesquistosomiásicas sobre el Aparato Genital femenino del *Schistosoma mansoni*

TESIS DE DOCTOR EN MEDICINA

César G. Náquira Velarde

1974

UNMSM

JURADO EXAMINADOR

Dr. Zuño Burstein Alva

Dra. Olga Palacios Agüero

Dr. Juan J. Miranda Zúñiga

UNMSM

UNMSM

Mi homenaje

A mis padres, hermanos y

esposa Soledad

A mis maestros:

Hugo Lumbreras
Hugo Pesce
Enrique Encinas
Amador Neghme
Moisés Agosin
Rafael Mancilla
Ernest Bueding
Everett Schiller

UNMSM

UNMSM

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue realizado entre 1968 a 1970 en los Laboratorios del Departamento de Patobiología de la Escuela de Salud Pública e Higiene de la Universidad Johns Hopkins, bajo la supervisión del Profesor Dr. Ernest Bueding, a quien le expreso mi agradecimiento, lo mismo que al personal a su cargo, en especial, a la Srta. Jean Fischer, a la Srta. Geraldine Rose, a la Srta. Virginia Vroblesky, a la Srta. Virginia Turner; a los Doctores Everett Schiller y Steffen Rogers y al Sr. John Bourgois, quienes me ayudaron en las diversas etapas de las investigaciones realizadas.

UNMSM

UNMSM

QL
391.P7
.N24
ej. 2

SUMARIO

INTRODUCCION 13
MATERIAL Y METODOS 16
RESULTADOS OBTENIDOS 23
DISCUSION 31
CONCLUSIONES 34
RESUMEN 35
SUMMARY 36
LITERATURA CITADA 37

18-07-2008 CPF

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE San Marcos
BIBLIOTECA CENTRAL
73627
UNMSM

UNMSM

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY
SCHOOL OF HYGIENE AND PUBLIC HEALTH
615 NORTH WOLFE STREET
BALTIMORE, MARYLAND 21205, U. S. A.

DEPARTMENT OF PATHOBIOLOGY

November 5, 1973

TO WHOM IT MAY CONCERN:

Dr. César Náquira has my full authorization to use the results obtained by him in this laboratory for his doctoral thesis. This study was concerned with effects of a variety of antischistosomal drugs, such as potassium antimony tartrate, niridazole and the nitrovinylfuran SQ 18,506 on the reproductive system of *Schistosoma mansoni*. I recommend this study highly for your consideration.

Ernest Bueding, M.D.
Professor of Pathobiology, School of
Hygiene and Public Health
Professor of Pharmacology and Experimental
Therapeutics, School of Medicine

UNMSM

UNMSM

INTRODUCCION

La esquistosomiasis es una de las parasitosis más importantes del hombre, por el gran número de individuos parasitados y por las dificultades que ofrece su eliminación. Se estima que hay de 180 a 200 millones de esquistosomiásicos en el mundo, y en Brasil, de 6 a 8 millones (BARUZZI, 1972).

En el Perú, a pesar de la presencia de caracoles suceptibles a *Schistosoma mansoni* (PARAENSE y col., 1964), y del arribo de personas procedentes de zonas endémicas del parasitismo, hasta el momento, no se han comunicado casos humanos autóctonos del país. Las personas con reacciones serológicas de floculación y de fijación del complemento positivas a *S. mansoni*, encontradas por BUCK y col. (1967), en el Perú, serían, a criterio de los autores, reacciones positivas falsas; sin embargo, las continuas corrientes migratorias, de las zonas endémicas al Perú, pueden hacer variar esta situación.

Una de las razones para que la esquistosomiasis persista y se difunda aún más en el mundo, radica en la falta de una droga ideal de aplicación epidemiológica. A criterio del Grupo de Expertos en Esquistosomiasis de la Organización Mundial de la Salud, una droga esquistosomicida ideal, debería ser:

a) Segura y efectiva.
b) Desprovista de efectos colaterales que atentarían contra su aceptación popular.
c) Capaz de ser administrada convenientemente en una sola dosis, ya sea por la boca o por vía parenteral.
d) Barata, estable bajo condiciones de almacenamiento, fácilmente obtenible y transportable.

Y, concluye que: "al momento presente, no existe tal compuesto y es muy deseable que a la búsqueda de drogas que se acerquen al ideal, se les dé la más alta prioridad" (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1972).

Para el desarrollo de una quimioterapia racional en los parasitismos, es necesario el conocimiento completo de la estructura, biología,

UNMSM

fisiología y bioquímica de los parásitos que se intentan eliminar, para que, al actuar la droga selectivamente sobre alguno de los factores mencionados, no se dañe al hospedero. Desafortunadamente, ese conocimiento básico es incompleto, de donde es poco conocido el o los mecanismos de acción de las drogas antiparasitarias, y de allí el enorme interés por averiguarlo.

El conocimiento de la morfología y ciclo biológico de las tres especies de *Schistosoma*, de importancia en Medicina humana: *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*, es bastante completo, no así en lo que se refiere a la fisiología y bioquímica de los mismos.

El mecanismo de acción de las más importantes drogas antiesquistosomiásicas es mejor conocido en el caso de *S. mansoni*, principalmente en lo que respecta a las alteraciones bioquímicas de los antimoniales y del Niridazole. Los antimoniales actuarían afectando el metabolismo de los hidratos de carbono, principalmente por una inhibición selectiva de la fosfofructoquinasa del parásito, y no del hospedero; y Niridazole permitiendo una mayor actividad de la glucógeno fosforilasa-fosfatasa, produciendo una depleción del glucógeno, detectable morfológicamente por la pérdida de las eminencias de la superficie del cuerpo del parásito adulto macho (BUEDING y FISHER, 1969).

La mayor parte de investigadores, al estudiar el efecto de las diversas drogas antiesquistosomiásicas, se refieren como pautas de la acción efectiva a:

a) En ensayos en humanos, a la detención en la puesta de huevos en las heces, y

b) En infecciones experimentales, a la ausencia de ejemplares adultos en los vasos sanguíneos mesentéricos, a la destrucción de los mismos a nivel del hígado, o a la pérdida de la vitalidad de los huevos presentes en el hígado o en otros tejidos.

Escasa es la información sobre las alteraciones morfológicas o fisiológicas que más tempranamente se observan en el estudio del efecto de las drogas; así, mediante la administración de dos antiesquistosomiásicos: el cloruro de tris (p - aminofenil) carbonio (TAC) y del 1 - (5 - nitro - 2 - tiazolil) - imidazolidona (Niridazole o producto CIBA 32,644 - Ba) a ratones infectados con *S. mansoni*, produce alteraciones morfológicas y funcionales importantes en el aparato genital femenino que lleva a la formación de huevos anormales (BUEDING y col., 1967).

El presente trabajo es una contribución al mejor conocimiento del

UNMSM

mecanismo de acción de las drogas antiesquistosomiásicas, en sus efectos más iniciales, para lo cual se fijan dos objetivos:

1. Conocer el efecto "in vitro" del Niridazole sobre el aparato genital femenino del *S. mansoni*, y

2. Averiguar si este efecto es privativo del Niridazole o está presente en otras drogas: el tártaro emético (tartrato de antimonio y potasio) y el derivado nitrovinilfuránico (trans-5-amino-3-[2-(5-nitro-2-furil)-vinil]-1, 2, 4-oxadiazol (Squibb 18.506).

UNMSM

MATERIAL Y METODOS

PLAN DE TRABAJO

En una primera etapa, de acuerdo con los objetivos planteados, se intentó conocer si los resultados obtenidos "in vivo" con Niridazole por BUEDING y FISHER (1969), eran reproducibles "in vitro"; para ello se realizaron dos tipos de estudio:

a) Bioquímico: determinando la disminución de la inhibición de la glucógeno fosforilasa-fosfatasa activa de adultos de *S. mansoni*, y
b) Morfológico: observando la morfología del aparato genital femenino de *S. mansoni*, mediante coloración supravital del gusano y el estudio histológico del mismo.

En una segunda etapa, los resultados del estudio morfológico se compararon con los efectos del tártaro emético y del Squibb 18.506; tanto "in vitro" como "in vivo".

1. *Infección experimental de los ratones con S.* MANSONI.

Ratones blancos de raza Swiss-Webster de 6 a 8 semanas de edad, con un peso entre 18 a 23 gramos, fueron infectados con 100 furcocercarias de *S. mansoni* (cepa Puerto Rico), mediante la inmersión de la cola en agua destilada conteniendo las cercarias. Las cercarias fueron obtenidas de caracoles *Australorbis glabratus* infectados y mantenidos en el laboratorio.

De la sexta a la décima semana, los ratones presentan huevos de *S. mansoni* en las heces, y al momento de la autopsia, es posible obtener de 15 a 26 parejas de adultos por ratón.

2. *Obtención de los ejemplares adultos de S.* MANSONI *de los animales infectados.*

Los animales infectados fueron sacrificados y autopsiados bajo lupa. Los parásitos adultos fueron obtenidos de las venas mesentéricas,

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
BIBLIOTECA CENTRAL

vena Porta y del pleno parénquima hepático, mediante la ayuda de pinzas y agujas de disección.

En los animales no tratados, el 70% de los gusanos estaban presentes en las venas mesentéricas. Los parásitos así obtenidos fueron colocados en suero de caballo al 75%, a temperatura ambiente. Su destino posterior dependió del tipo de estudio a realizarse.

3. *Actividad de la glucógeno fosforilasa-fosfatasa.*

El método está basado en la velocidad de declinación de la actividad de la glucógeno fosforilasa-fosfatasa durante la incubación a 30°C de homogenizados de parejas de gusanos (BUEDING y FISHER, 1970), y se procede como sigue:

15 parejas de gusanos se colocan sobre papel parafinado y se secan con papel filtro; con la punta de una vagueta, se colocan en un tubo de prueba con 0.3 ml. de solución buffer 0.05 M glicil-glicina pH 7.4 con 20% de glicerol, todo lo cual se homogeniza a la temperatura ambiente. El homogenizado se transfiere a tubos de prueba de 12x75 mm. (3) que se dejan en incubación 10, 15 y 30 minutos a 30°C. En este momento del método, la enzima fosforilasa-fosfatasa, presente en los gusanos actúa sobre el glucógeno presente en los mismos, convirtiéndolo en Glucosa-1-fosfato; la fosforilación se detiene agregando a los incubados 0.2 ml. de una mezcla de buffer 0.05 M glicil-glicina pH 7.4 y 0.02 M de fluoruro de sodio.

Las muestras de los 10, 15 y 30 minutos se centrifugan a 10.000 r. p.m., 10 minutos, usándose 0.05 ml. del sobrenadante para estudiar la cantidad de enzima que no ha sido utilizada, lo cual se realiza haciendo actuar la enzima sobre el glucógeno, produciéndose Glucosa-1-fosfato, que en presencia de la enzima fosfoglucomutasa y de TPN (NADP) se convierte en Glucosa-6-fosfato y el TPN (NADP) cambia a TPNH (NADPH), cambio que puede leerse espectofotométricamente, para lo cual se procede:

En sendos frascos de vidrio del espectrofotómetro Carl Zeiss M4QIII se colocan: 0.08 ml. de 0.1 M de fluoruro de sodio, 0.33 ml. de agua destilada y 0.3 ml. de una mezcla reactante que contiene: 4.0 ml. de glucógeno comercial al 10%, 6.0 ml. de buffer fosfato 2M pH 7.2, 16 ml. de 0.2 M de buffer Imidazol y 0.005 M de cloruro de magnesio, 3.0 ml. de 0.01 M de TPN (NADP), 1.0 ml. de $5x10^{-4}$ M de glucosa 1-6-difosfato; 0.04 ml. de enzima auxiliar que contenía: 0.01 de fosfoglucomutasa, 0.29 de Imidazol y 0.3 de 2F 1:50. Luego de agitar con una vagueta los reactantes, se añadía los 0.05 ml. de los sobrenadantes de las incubaciones de 10, 15 y 30 minutos. Las lecturas se hicieron a 340 mμ. En cada

73627
UNMSM

determinación se usó un grupo control y un grupo tratado de los gusanos.

4. *Estudio morfológico del aparato genital femenino de S.* MANSONI *mediante la coloración supravital.*

El método empleado se basa en la reducción de derivados del tetrazolium por las deshidrogenasas presentes en los tejidos del gusano (DODIN, 1966; BUEDING y col., 1967).

Los gusanos obtenidos en las autopsias fueron colocados en suero de caballo al 75% que contenía Carbacol $2x10^{-4}$ M por 10 minutos a 37°C, lo cual provoca una disminución de la actividad muscular de los gusanos, facilitando la separación de las hembras y de los machos, sin provocarles ningún daño mecánico. Las hembras así separadas fueron colocadas en discos de vidrio que contenían suero de caballo al 75%, para que los gusanos recuperaran su actividad muscular, luego de lo cual se les colocó en 2.7 ml. del siguiente medio de incubación: 1 ml. de medio base de Earle 199 (sin bicarbonato), 0.8 ml. de buffer glicilglicina 0.012 M pH 7.6; y 10 ml. de agua destilada. A los 2.7 ml. del medio de incubación se le añadía 0.09 ml. del colorante, el cual se había disuelto en 0.5 ml. de agua destilada, inmediatamente antes de ser usado. El colorante es una mezcla de metasulfato de fenazina y bromuro del 2, 5 difeniltetrazolium 3 (4, 5 dimetiltiazolil 1, 2) en buffer fosfato, mantenido en seco a 2-4°C. Después de 90 minutos a 37°C se transfieren los gusanos a suero de caballo al 75% con carbacol $2x10^{-4}$ M, de donde son finalmente transferidos a una lámina portaobjeto con el mismo medio y examinados al microscopio.

El estudio de los parásitos involucró fundamentalmente, la observación del ovario, el ootipo, los huevos y las glándulas vitelógenas. Se cuantificó el porcentaje de las anormalidades observadas sobre 10 ejemplares examinados, considerándose como tales:

Ovario: agrandamiento (10%), reducción (10%), colapsado (10%), presencia de oocitos grandes (5%) y ligeramente reducido (5%).

Huevos: ausencia (10%), anormal (10%).

Glándulas vitelógenas: reducidas o atróficas (10%), ligeramente reducidas (5%).

El promedio general de anormalidades, en el grupo control y en el de los tratados, se estableció sumando los porcentajes de anormalidades particulares y dividiendo dicha suma entre tres; no se consideró las alteraciones del ootipo por no ser detectables con este método de coloración.

UNMSM

5. *Estudio histológico del aparato genital femenino.*

Los gusanos destinados al estudio histológico fueron colocados en discos de vidrio y lavados tres veces con solución balanceada de Hauck sin bicarbonato de sodio. Los parásitos fueron colocados sobre un portaobjeto, cubiertos con un cubreobjeto para conseguir una buena elongación de los gusanos; en este momento se les agregó líquido fijador A.F.A. (formol, 10 partes; etanol al 95%, 50 partes; ácido acético, 2 partes y agua destilada, 38 partes); el líquido fijador se añadió en caliente y en movimiento continuo. Luego de 4 a 5 minutos se pasaron los gusanos a un disco Petri con alcohol etílico al 80% por 25 minutos, luego por alcohol etílico al 95% por 25 minutos por dos veces, en la segunda vez se les dejó por dos horas y media; finalmente, fueron dejados en Terpinol toda la noche. Al día siguiente se les incluyó en parafina, orientándose los cortes para que las secciones de los gusanos sean transversales. Los cortes fueron de 6 μ de espesor y fueron coloreados con Hematoxilina-eosina o por el Método de Feulgen.

6. *Drogas utilizadas.*

6.1. *Tártaro emético*: Se utilizó la sal pura (tartrato de antimonio y potasio). En los experimentos "in vivo" se utilizó la dosis de 25 mg/kilo, por vía intraperitoneal. En los experimentos "in vitro" se utilizaron las siguientes concentraciones: $1x10^{-6}$ M, $5x10^{-6}$ M, $1x10^{-5}$ M y $5x10^{-5}$ M.

6.2. *Niridazole*: Se utilizó el preparado puro, proporcionado por la casa CIBA y registrado como el producto CIBA 32644 Ba, comercialmente conocido como AMBILHAR y que químicamente corresponde al 1-(5-nitro-2-tiazolil)-2-imidazolidona.

En los experimentos "in vivo" se utilizó la dosis de 200 mg./kilo de peso, por vía oral. En los experimentos "in vitro" se utilizaron las dosis de 0.2, 1, 2 y 5 ug/ml. de medio de incubación.

Como quiera que la droga no es completamente soluble en el agua, para conocer la exacta concentración de la droga, se procedió de la siguiente manera:

20 mg. de la droga se diluyeron en 20 ml. de agua destilada por una hora a 37°C y en agitación continua; se filtró y diluyó en la proporción de 1:10, se leyó espectofotométricamente a 370 mμ, y sabiendo que 10 ug/ml. equivale a 710 de lectura, se procedió a hacer las diluciones deseadas.

UNMSM

6.3. *Squibb 18.506*: Se utilizó el preparado puro, proporcionado por la casa Squibb y que químicamente es un derivado nitrovinilfurá-nico, el trans-5-amino-3 [-2-(5-nitro-2-furil)-vinil] -1, 2, 4, oxadiazol. La droga es insoluble en agua, razón por la cual no se pudieron realizar experimentos "in vitro". En los experimentos "in vivo", la dosis empleada fue de 1.2% del peso de la dieta por día.

7. *Experimentos.*

7.1. "In Vitro".

7.1.1. *Medio de incubación*: Estuvo constituido por 15 ml. de una solución que contenía: suero de caballo (11.25 ml.), glucosa (62.5 mg./ml.) 0.1 ml., la droga empleada en solución acuosa y se completaba con agua destilada hasta los 15 ml. Los frascos fueron incubados a 37°C en aparato Dubnoff por 2 horas. Los gusanos fueron colocados pareados, entre 10 a 25 parejas en cada experimento. El grupo control no contenía droga.

7.1.2. *Acción "in vitro" del Niridazole sobre la actividad de la glucógeno fosforilasa-fosfatasa de S.* MANSONI: 300 parejas de adultos de *S. mansoni* obtenidas bajo las condiciones señaladas en 2.0, fueron clasificadas en dos grupos: 150 como control y 150 fueron tratadas (15 con 1 ug./ml., 120 con 2 ug./ml. y 15 con 5 ug./ml.) e incubadas de acuerdo a lo señalado en 3.0.

7.1.3. *Acción "in vitro" del Niridazole sobre el aparato genital femenino de S.* MANSONI:

7.1.3.1. *Coloración supravital*: 264 parejas de adultos de *S. mansoni*, obtenidas bajo las condiciones señalas en 2.0, fueron clasificadas en dos grupos: 99 como grupo control y 165 como grupo tratado (16 con 0.2 ug./ml., 39 con 0.5 ug./ml., 10 con 1 ug./ml., 91 con 2 ug./ml. y 9 con 5 ug./ml.). Ambos grupos de gusanos (control y tratados) fueron incubados de acuerdo a lo señalado en 7.1.1. A las dos horas de incubación, las hembras fueron tratadas de acuerdo a lo señalado en 4.0.

7.1.3.2. *Coloración con hematoxilina-eosina*: 47 parejas de adultos de *S. mansoni*, obtenidas bajo las condiciones señaladas en 2.0, fueron clasificadas en dos grupos: 8 como grupo control y 39 como grupo tratado (8 con 0.2 ug./ml.; 8 con 0.5 ug./ml.; 8 con 2 ug./ml.; 7 con 5 ug./ml. y 8 con 10 ug./ml.). Ambos grupos fueron incubados de acuerdo a lo señalado en 7.1.1. A las dos horas de incubación, los gusanos fueron tratados de acuerdo a lo señalado en 5.0 y 5.1.

UNMSM

7.1.3.3. *Coloración por el método de Feulgen*: 40 parejas de adultos de *S. mansoni*, obtenidas bajo las condiciones señaladas en 2.0, fueron clasificadas en dos grupos: 10 como grupo control y 30 como grupo tratado, con las siguientes dosis: 10 con 0.2 ug./ml.; 10 con 2 ug./ml. y 10 con 10 ug./ml. Ambos grupos fueron tratados de acuerdo a lo señalado en 7.1.1. A las dos horas de incubación se siguió el procedimiento señalado en 5.0 y 5.2.

7.1.4. *Acción "in vitro" del tártaro emético sobre los Oocitos del* S. MANSONI: *coloración por el método de Feulgen*: 50 parejas de adultos de *S. mansoni*, obtenidas bajo las condiciones señaladas en 2.0, fueron clasificadas en dos grupos: 10 como grupo control y 40 como grupo tratado, con las siguientes dosis: 10 con $1x10^{-6}$ M, 10 con $5x10^{-6}$ M, 10 con $1x10^{-5}$ M y 10 con $5x10^{-5}$ M de tartrato de antimonio y potasio. Ambos grupos fueron incubados de acuerdo a lo señalado en 7.1.1. A las dos horas de incubación, se tomaron solamente las hembras, las que fueron tratadas de acuerdo a lo señalado en 5.0 y 5.2.

7.2. "In Vivo".

7.2.1. *Acción "in vivo" del Niridazole sobre los Oocitos de S.* MANSONI: *coloración por el método de Feulgen*: Cuatro ratones infectados de acuerdo a 1.0 fueron separados en dos grupos: 2 ratones no recibieron droga y constituyeron el grupo control y dos recibieron 200 mg./kilo de peso por vía oral. A las dos horas se sacrificaron los cuatro ratones y se obtuvieron los gusanos de acuerdo a 2.0; de cada ratón se tomaron 5 parejas al azar, las que fueron procesadas de acuerdo a lo señalado en 5.0 y 5.2.

.2.2. *Acción "in vivo" del tártaro emético sobre los Oocitos de* S. MANSONI: *coloración por el método de Feulgen*: Siete ratones infectados de acuerdo a 1.0 fueron separados en dos grupos: 4 ratones no recibieron droga y constituyeron el grupo control y tres recibieron intraperitonealmente 25 mg. de droga por kilo de peso, la droga estaba disuelta en agua destilada 2.5 mg./ml. A las dos horas se sacrificaron 2 ratones, uno de cada grupo, se contaron las parejas encontradas en los vasos mesentéricos, vena Porta y sinusoides hepáticos; de las parejas encontradas en cada ratón, 10 fueron procesadas de acuerdo a lo señalado en 5.0 y 5.2. A las 24 y 48 horas se sacrificaron dos ratones en cada vez, procedentes de ambos grupos (control y tratados), se contaron las parejas encontradas en los vasos mesentéricos, vena Porta y parénquima hepático. A las 72 horas se sacrificó el último ratón del grupo control y se realizó el mismo contaje de los gusanos encontrados.

UNMSM

7.2.3. *Acción "in vivo" del Squibb 18.506 sobre los Oocitos de S.* MANSONI: *coloración por el método de Feulgen*: Los cuatro ratones utilizados como grupo control en 7.2.3., sirvieron también como control para este experimento, ya que ambos experimentos se efectuaron simultáneamente. 6 ratones infectados de acuerdo a 2.0., recibieron la droga mezclada con la dieta (1.2%). A las 24, 48, 72 y 96 horas, se sacrificaron, de cada grupo, un ratón. Las parejas de gusanos presentes se contaron, señalándose su ubicación en las venas mesentéricas, vena Porta o en el parénquima hepático. De las parejas encontradas en cada ratón, 10 se procesaron de acuerdo a lo señalado en 5.0. y 5.2. Los dos restantes ratones de cada grupo fueron sacrificados al mes y a los dos meses respectivamente, y las parejas de gusanos halladas contadas según su localización. Finalmente se analizó si los huevos presentes en el hígado eclosionaban para saber su viabilidad.

UNMSM

RESULTADOS OBTENIDOS

1. *Acción "in vitro" del Niridazole sobre la actividad de la glucógeno fosforilasa-fosfatasa de S.* MANSONI:

En la Tabla Nº 1, se muestran los resultados sobre el estudio de la inhibición de la actividad de la enzima, se puede observar que hay una disminución de dicha inhibición a partir de la concentración de 2 ug./ml. de la droga.

2. *Acción "in vitro" del Niridazole sobre el aparato genital femenino de S.* MANSONI:

2.1. *Coloración supravital*: En la Tabla Nº 2 se han señalado los porcentajes de anormalidades presentes en los principales elementos del aparato genital femenino de *S. mansoni*, pudiéndose observar que a partir de la concentración de 2 ug./ml. hay un incremento notable, casi el doble, del promedio de anormalidades observadas, sobre el grupo control o el tratado a dosis bajas. Por otro lado, llama la atención que dicho incremento esté dado, fundamentalmente, por el aumento de anormalidades presentes en los ovarios de los gusanos, desde dosis tan bajas como 0.2 ug./ml. y evidentes a dosis más altas como 2 y 5 ug./ml.

2.2. *Coloración con hematoxilina-eosina*: En la Tabla Nº 3, se señalan los hallazgos más importantes encontrados en el estudio del aparato genital femenino y del intestino. Se puede observar que las alteraciones más importantes se encuentran en los ovarios, donde el hallazgo de oocitos anormales es lo destacable; razón por la cual se realizó un estudio pormenorizado de los mismos, cuyos resultados se encuentran consignados en la Tabla Nº 4, en la cual, comparativamente hay alteraciones tanto en el citoplasma como en el núcleo, siendo aquí importante el aparente mayor tamaño del núcleo, la menor intensidad de coloración del nucleolo, pero lo más notorio es la irregularidad en la distribución de la cromatina, aún a dosis bajas 0.2 ug./ml.

UNMSM

Tabla Nº 1. Acción "in vitro" del Niridazole sobre los adultos de *S. mansoni*. Reducción de la actividad de la glucógeno fosforilasa-fosfatasa a las dos horas de incubación.

Dosis	Porcentajes promedios de reducción según tiempo de incubación		
	10'	15'	30'
Control	46	58	73
1 μg./ml.	40	65	79
2 μg./ml.	39	53	67
5 μg./ml.	33	49	67

Tabla Nº 2. Acción "in vitro" del Niridazole sobre el aparato genital femenino de *S. mansoni*. Porcentaje de anormalidades según coloración supravital a las 2 horas de incubación.

	Control	Dosis μg./ml.				
		0.2	0.5	1.0	2.0	5.0
Ovario	3	9	12	25	49	67
Huevos	21	31	30	10	28	22
Vitellaria	0	0	3	0	0	11
PROMEDIO	8	13	15	12	26	33

Tabla Nº 3. Acción "in vitro" del Niridazole sobre el aparato genital femenino y digestivo del *S. mansoni*. Estudio histológico mediante la coloración de Hematoxilina-eosina. 200 cortes por ejemplar. 2 horas de incubación.

	Control	Dosis μg./ml.				
		0.2	0.5	2.0	5.0	10.0
No ejemplares	8	8	8	8	7	8
Ovario: No. secc.	15	18	19	19	17	17
Oocitos anormales	3	6	8	8	7	8
Ootipo: vacío	4	2	3	5	2	2
huevo u Oocito	4	6	5	3	5	6
Utero: vacío	7	7	8	8	5	8
huevo normal	1	1	0	0	2	0
Vitellaria: Normal	8	6	7	8	7	7
reducido	0	2	1	0	0	1
Intestino: Normal	8	6	4	7	5	8
dilatado	0	2	4	1	2	0

UNMSM

2.3. *Coloración por el método de Feulgen*: El estudio comparativo del grupo control con el grupo tratado permitió señalar las características normales de los oocitos coloreados por el método de Feulgen; a mayor aumento, el oocito normal presenta (Figs. Nos. 1 y 2):

1. En el núcleo, el nucleolo claro, bien definido, denso, con algunas vacuolas,
2. Una zona clara entre el nucleolo y la membrana nuclear,
3. La cromatina con tamaño uniforme y con una distribución regular alrededor del nucleolo, y
4. El citoplasma uniforme y sin gránulos.

En cambio, los oocitos encontrados en el grupo tratado presentan (Fig. Nº 4):

1. Un aparente agrandamiento del oocito.
2. Nucleolo menos nítido y denso.
3. Irregularidad en la distribución de la cromatina.

Las alteraciones fueron evidentes a partir de la concentración de 2 ug./ml., pero también se observaron a dosis menores.

Tabla Nº 4. Acción "in vitro" del Niridazole sobre los oocitos de *S. mansoni* mediante la coloración de la hematoxilina-eosina. 2 horas de incubación.

	Control	Dosis μg./ml.			
		0.2	0.5	2.0	5.0
No. ejemplares	8	8	8	8	7
Núcleo:					
tamaño en μ	8.11	8.29	8.37	8.45	8.45
	± 0.21	± 0.75	± 0.80	± 0.43	± 0.55
coloración: +++	3	1	0	0	0
++	3	0	3	5	2
+	2	7	5	3	5
cromatina: regular	6	1	0	0	0
intermedia	2	0	0	1	0
irregular	0	7	8	7	7
Citoplasma:					
uniforme color.	6	1	0	1	0
poco granuloso	2	4	1	2	1
muy granuloso	0	3	7	5	6

UNMSM

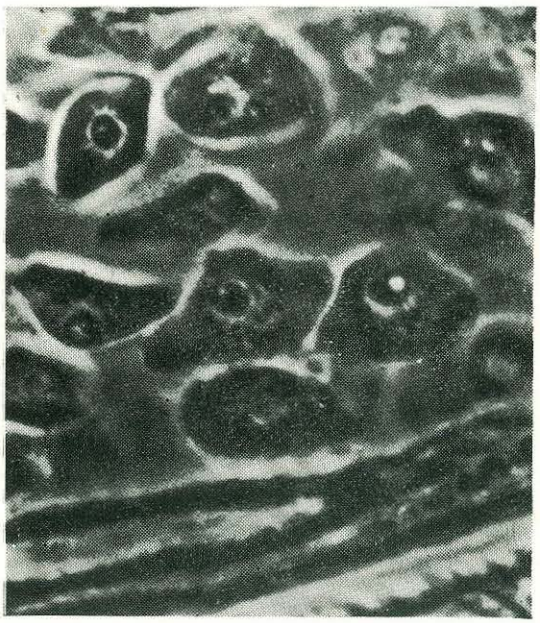


Fig. Nº 1. Grupo control. Oocitos normales coloreados por el Método de Feulgen.

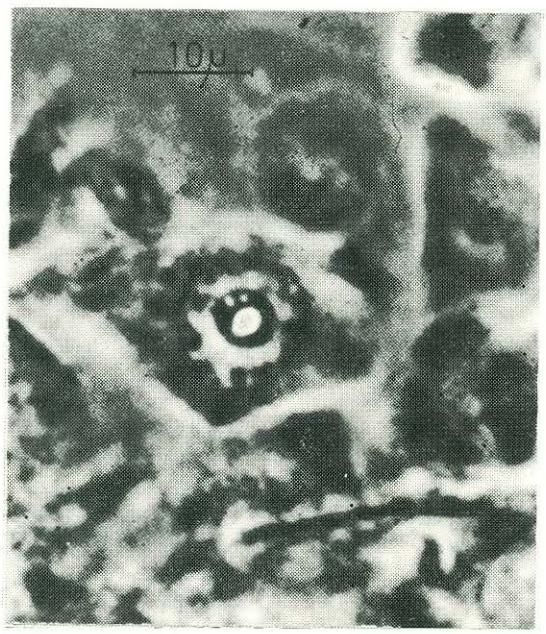


Fig. Nº 2. Grupo control. Oocito normal: nucleolo bien coloreado y vacuolado, cromatina con distribución regular. Método de Feulgen.

UNMSM

3. *Acción "in vitro" del tartrato de potasio y antimonio sobre los oocitos de S.* MANSONI: *coloración por el método de Feulgen:*

Solamente las concentraciones más altas de la droga $1x10^{-5}$ M a $5x10^{-5}$ M, permitieron mostrar cambios en los oocitos, similares a los encontrados con Niridazole a la concentración de 2 ug./ml. (Fig. Nº 3).

4. *Acción "in vivo" del Niridazole sobre los oocitos de S.* MANSONI: *coloración por el método de Feulgen:*

A las dos horas de administración de la droga, se encontró una alteración de los oocitos similar a la obtenida con dosis bajas de Niridazole "in vitro" (Fig. Nº 5).

5. *Acción "in vivo" del tártaro emético sobre los oocitos de S.* MANSONI: *coloración por el método de Feulgen:*

A las dos horas de administrada la droga, en el ratón tratado, se encontró 25 parejas de gusanos en el hígado y ninguna en las venas mesentéricas o la Porta; en cambio, en el ratón control se encontró 21 parejas y 4 machos (60%) en las venas mesentéricas, 5 parejas y 2 machos (16%) en la vena Porta y 9 parejas y 1 macho (24%) en el parénquima hepático. Los oocitos de los gusanos tratados mostraron cambios poco severos y comparables a las dosis más bajas de Niridazole "in vitro" (Fig. Nº 4). A las 24 horas, en el ratón tratado se encontró 17 parejas (43%) en los vasos mesentéricos, 13 parejas (33%) en la vena Porta y 10 parejas (24%) en el hígado. En el ratón control se encontró 33 parejas (85%) en las venas mesentéricas, 6 parejas (15%) en la vena Porta y ninguna pareja (0%) en el hígado. A las 48 horas, en el ratón tratado se encontró 22 parejas (54%) en las venas mesentéricas, 13 parejas (32%) en la vena Porta y 6 parejas en el hígado (14%). En el ratón control se encontró 7 parejas (54%) en las venas mesentéricas, 4 parejas (31%) en la vena Porta y 2 parejas (15%) en el hígado. A las 72 horas, en el ratón control se encontró 17 parejas (49%) en las venas mesentéricas, 12 parejas y 3 machos (39%) en la vena Porta y 4 parejas y 1 macho (13%) en el hígado. El contaje de los gusanos hallados en las diferentes localizaciones indican que, bajo el efecto de la droga, se produce una migración de los gusanos hacia el hígado, los cuales comienzan a retornar a los vasos mesentéricos a partir de las 24 horas.

UNMSM

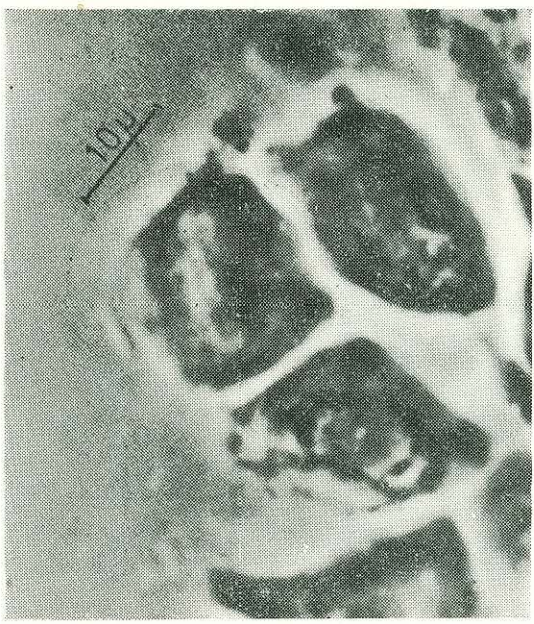


Fig. Nº 3. Grupo tratado con antimonial. Acción "in vitro" del tartrato de antimonio y potasio. Dosis $5x10^{-5}M$. Método de Feulgen.

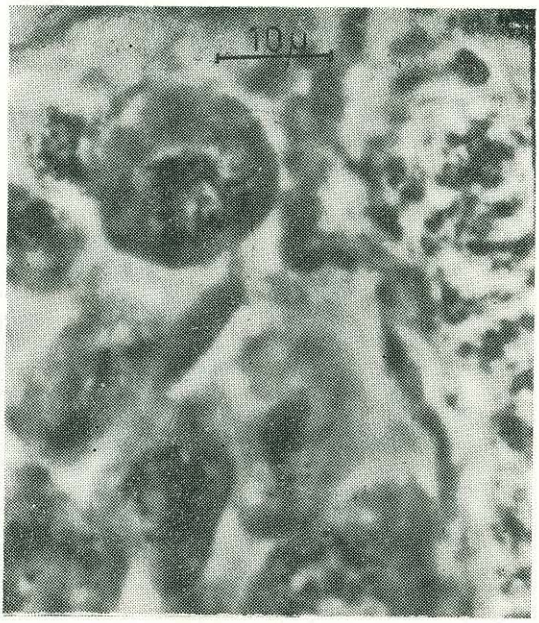


Fig. Nº 4. Grupo tratado con Niridazole. Acción "in vitro" del Niridazole. Dosis 2 ug./ml. Método de Feulgen.

UNMSM

6. *Acción "in vivo" del Squibb 18.506 sobre los oocitos de S.* MANSONI: *coloración por el método de Feulgen*:

A las 24 horas de iniciado el tratamiento se pesó la cantidad de droga ingerida y se calculó en 3.45 g./ratón lo que equivaldría a 14 mg./kilo. En el ratón tratado se encontró 29 parejas y 2 machos (83%) en las venas mesentéricas, 5 parejas en la vena Porta (14%) y 1 pareja en el hígado (3%), en el ratón control se encontró 21 parejas y 4 machos (60%) en las venas mesentéricas, 5 parejas en la vena Porta (16%) y 9 parejas y 1 macho (24%) en el hígado. 10 parejas de cada grupo examinadas por la coloración de Feulgen mostraron, en el grupo tratado, oocitos anormales.

A las 48 horas, la cantidad de droga ingerida se calculó en 2.95 g./ratón, o sea 12 mg./kilo. En el ratón tratado se encontró 9 parejas en las venas mesentéricas (30%), 14 parejas en la vena Porta (47%) y 7 parejas (23%) en el hígado. En el ratón control se encontró 33 parejas en las venas mesentéricas (85%), 6 parejas en la vena Porta (15%) y ninguna pareja en el hígado (0%). Los gusanos obtenidos mostraron, en el grupo tratado, oocitos anormales.

A las 72 horas, la droga ingerida se calculó en 2.7 g./ratón o sea 13.5 mg./kilo. En el ratón tratado no se encontró gusanos en las venas mesentéricas (0%), 16 parejas en la vena Porta (89%) y 2 parejas en el hígado (11%). En el ratón control se encontró 7 parejas en las venas mesentéricas (54%), 4 parejas en la vena Porta (31%) y 3 parejas en el hígado (15%). Oocitos anormales estuvieron presentes en los gusanos tratados.

A las 96 horas, en el grupo tratado, la cantidad de droga ingerida fue calculada en 2.7 g./ratón, equivalente a 13.5 mg./kilo. En el ratón tratado se encontró solamente gusanos en el hígado: 31 parejas y 5 machos (100%). En el ratón control se encontró 17 parejas (49%) en las venas mesentéricas, 12 parejas y 3 machos (39%) en la vena Porta y 4 parejas y 1 macho (13%) en el hígado. El efecto de la droga sobre los oocitos se juzgó severo de acuerdo a la Fig. Nº 6.

Al mes, uno de los ratones tratados fue sacrificado y no se encontró gusanos. El hígado fue triturado y se observó que los huevos presentes no eclosionaban.

A los dos meses, otro de los ratones tratados mostró iguales características a lo mencionado con el ratón sacrificado al mes de tratamiento.

UNMSM
3329

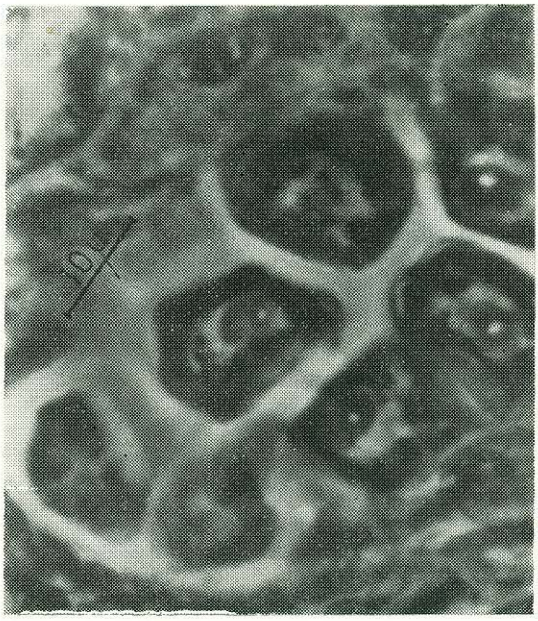


Fig. Nº 5. Grupo tratado con Niridazole. Acción "in vivo" del Niridazole. Dosis 200 mg./kilo de ratón. Método de Feulgen.



Fig. Nº 6. Grupo tratado con Equibb 18.506. Acción "in vivo" de la droga. Dosis 1.2% de la dieta por ratón. Método de Feulgen.

UNMSM

DISCUSION

Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que el Niridazole tiene efecto directo sobre los adultos de *S. mansoni*, el cual es similar a lo observado cuando se administra la droga al animal infectado, tanto desde el punto de vista bioquímico (disminución de la inhibición de la fosforilasa-fosfatasa), como de las alteraciones del aparato genital femenino detectables por la coloración supravital (BUEDING y col., 1967; BUEDING y FISHER, 1969, 1970). En efecto, tal como se observa en la Tabla Nº 1, el Niridazole a las 2 horas de incubación, en experimentos "in vitro" produce a la dosis de 2 ug./ml. en los gusanos adultos una reducción de la inhibición de un 10%, similar a lo observado después de la administración oral de la droga a las dosis de 100 mg./kilo a las 18 horas o de 200 mg./kilo a las 2 horas (BUEDING y FISHER, 1969). Por otro lado, fue posible, mediante la coloración supravital, Tabla Nº 2, observar alteraciones en el aparato genital femenino que eran similares a los señalados "in vivo" (BUEDING y col., 1967); es decir, podemos afirmar que la droga como tal, y no productos intermediarios tienen acción directa sobre *S. mansoni*, a dosis tan bajas como 2 ug./ml. y en tiempo tan corto como 2 horas.

Del estudio de la Tabla Nº 2, podemos señalar que el órgano con alteración morfológica más precozmente detectable es indudablemente el ovario, lo cual ya había sido señalado para el cloruro del tris (p-aminofenil) carbonio (TAC) (BUEDING y col., 1967); sin embargo, un estudio citológico del ovario y en especial de los oocitos no había sido llevado a cabo, principalmente para detectar los más primigenios efectos citológicos del Niridazole; y así, los resultados obtenidos y mostrados en las Tablas Nos. 3 y 4, nos permiten señalar que las alteraciones más importantes radican en el núcleo de los oocitos y aún con mayor precisión en las características de la cromatina nuclear y nucleolo de los oocitos, ya que como se muestra en las Figs. Nos. 1 y 2, hay en los oocitos tratados un cambio en la regularidad de la distribución de la cromatina, lo cual ha sido posible detectar con mayor precisión con la coloración de los oocitos por el método de Feulgen.

Para comprobar si esta alteración era exclusiva de Niridazole o también puede presentarse bajo la acción de otras drogas antiesquisto-

UNMSM

somiásicas, se investigó el efecto sobre la cromatina nuclear, usando la misma metódica de tinción selectiva de la cromatina nuclear por el método de Feulgen. Las drogas usadas fueron dos de reconocida acción antiesquistosomiásica como son el tártaro emético y un nuevo producto, el Squibb 18.506 (BUEDING y col., 1971).

Con el tártaro emético, la droga antiesquistosomiásica más conocida desde la antigüedad, se pudo estudiar el efecto "in vivo" e "in vitro" sobre los oocitos de *S. mansoni*. En relación a la acción "in vivo", se determinó si la dosis usada era efectiva, lo cual pudo demostrarse, ya que, como es sabido, bajo el efecto del antimonial, que bloquea específicamente la fosfofructoquinasa, perdiendo con ello entre otras características su capacidad de fijación en las venas mesentéricas y los gusanos son llevados al hígado, así, en nuestros experimentos, a las dos horas todos los gusanos se encuentran en el hígado, y recién a las 24 horas comienzan a descender a las venas mesentéricas, pero no todos los gusanos, ya que algunos retenidos en el hígado serán destruidos, lo cual parece ser el mecanismo de eliminación de gusanos más importante en el tratamiento con antimoniales, ya que dosis continuadas de la droga determinarán migraciones sucesivas de gusanos al hígado y la captación y destrucción por éste de los mismos. En nuestros experimentos se estudiaron los oocitos de los gusanos sometidos a estas dosis, observándose cambios similares a los obtenidos con dosis bajas de Niridazole "in vitro" (0.2 ug./ml.), lo cual fue posible también observar bajo la acción "in vitro" del antimonial, pero solamente a las dosis más altas usadas.

En relación a la acción del Squibb 18.506, pudo observarse que la dosis "in vivo" empleada produce una cura parasitológica, detectable al mes de la dosificación, ya que en tal momento no fue posible detectar gusanos en los vasos mesentéricos, vena Porta o hígado, e incluso los huevos encontrados en el hígado han perdido su capacidad de viabilidad. Las hembras presentan a partir de las 24 horas alteraciones evidentes de los oocitos que son más claras a los cuatro días del tratamiento. Con esta droga no se pudieron realizar experimentos "in vitro" por ser insoluble en el agua; de allí la posibilidad que las alteraciones observadas pudieran corresponder a productos metabólicos de la droga también.

Los resultados obtenidos permiten señalar que las drogas antiesquistosomiásicas tienen acción sobre la cromatina nuclear de los oocitos, es decir probablemente sobre el metabolismo del ácido desoxiribonucleico, lo cual explicaría la puesta de huevos anormales o no viables, a la vez que nos indicaría la potencialidad teratogénica o cancerígena de las drogas ensayadas, capacidad que ha sido señalada para Niri-

UNMSM

dazole (COHEN y col., 1970; ERTURK y col., 1970) y para Hycanthone (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1972).

La circunstancia que similares alteraciones sobre los oocitos han sido señaladas para los antimoniales y el Squibb 18.506 y para Niridazole, parece confirmar la apreciación de BUEDING y FISHER, (1969), que, requiriendo el aparato genital femenino de un importante suministro energético, cualquier interferencia, bioquímica o fisiológica, alterará la función del aparato genital femenino, y añadiremos de acuerdo a lo observado que dicho daño es fundamentalmente a nivel del ovario, siendo los oocitos los primariamente afectados.

UNMSM

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir:

1. El Niridazole, similarmente a lo que ocurre "in vivo", "in vitro" disminuye la inhibición de la glucógeno fosforilasa-fosfatasa de de los adultos de *S. mansoni.*
2. El Niridazole, similarmente a lo que ocurre "in vivo", "in vitro" altera el aparato genital femenino del *S. mansoni,* principalmente el ovario, el cual se reduce o presenta oocitos aumentados de tamaño.
3. El estudio histológico de los gusanos adultos de *S. mansoni,* mediante las coloraciones de Hematoxilina-eosina y por el método de Feulgen, ha permitido demostrar que las principales alteraciones citológicas producidas por el Niridazole están a nivel de los oocitos, los cuales presentan núcleos alterados: más grandes con pérdida de la capacidad tintorial de los nucleolos y de la distribución regular de la cromatina, cuando se les compara con el grupo control.
4. Estudios histológicos similares, mediante el método de Feulgen, realizados en gusanos adultos de *S. mansoni,* sometidos a la acción del tartrato de antimonio y potasio y de un derivado nitrovinilfuránico, el Squibb 18.506, muestran que dichas drogas "in vivo" y el antimonial "in vitro", también poseen la capacidad de desarrollar una acción similar a Niridazole.
5. La similitud de la acción de las drogas estudiadas sobre los oocitos de *S. mansoni,* puede interpretarse como la acción bioquímica inespecífica de las drogas, que directa o indirectamente bloquean el aporte energético al ovario.
6. La circunstancia de detectarse la alteración de la cromatina nuclear como el primer cambio morfológico en el gusano adulto hembra, puede interpretarse como la expresión probable de una acción sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos, lo cual señala la acción potencial teratogenética o cancerígena de estas drogas antiesquistosomiásicas.

UNMSM

RESUMEN

Se ha estudiado la acción "in vitro" del Niridazole sobre la inhibición de la actividad del glucógeno fosforilasa-fosfatasa de *S. mansoni*, demostrándose que a las dos horas de incubación y a una dosis de 2 ug./ml., hay una disminución de la inhibición, resultado similar a lo obtenido "in vivo" por otros investigadores.

Se ha estudiado la acción "in vitro" del Niridazole sobre el aparato genital femenino de *S. mansoni* mediante la coloración supravital y el estudio histológico con las coloraciones de Hematoxilina-eosina y Feulgen, observándose que, mediante la coloración supravital, el ovario está principalmente afectado, reducido, colapsado o con oocitos agrandados, similar a lo observado en estudios "in vivo" por otros autores. El estudio histológico muestra una acción importante sobre los oocitos, los cuales presentan alteraciones nucleares que por el método de Feulgen permiten precisar como una distribución irregular de la cromatina y pérdida de las características tintoriales del nucleolo, cuando se comparan los oocitos del grupo tratado con el control.

Se ha estudiado mediante el método de Feulgen, si las alteraciones observadas en los oocitos son privativas del Niridazole o pueden estar presentes en otras drogas antiesquistosomiásicas como el tártaro emético y un derivado nitrovinilfuránico, el Squibb 18.506. Los experimentos "in vivo" e "in vitro" con el antimonial e "in vivo" con el Squibb 18.506, demostraron que dicho efecto está presente también a dosis altas del antimonial usado "in vitro" y en todos los experimentos "in vivo" tanto con el antimonial, como con Squibb 18.506.

Se concluye que la mayor actividad metabólica del aparato genital femenino de *S. mansoni*, y principalmente de su ovario, hace necesario el mayor aporte energético a dicho órgano, y cuando, ya sea por bloqueo bioquímico o fisiológico se interrumpe dicho aporte, los oocitos serán los primariamente afectados y al parecer ello conlleva una alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos, necesario de tener presente.

UNMSM

SUMMARY

It has been studied the "in vitro" effect of Niridazole on the glycogen phosphorylase inactivation of *S. mansoni*. There was a reduction of activity at 2 hours of incubation with 2 ug./ml., which was similar to the "in vivo" experiments performed by others researchers.

It has been studied the "in vitro" effects of Niridazole on the reproductive system of the female of *S. mansoni* by an "intra vitam" staining method and by the histologycal methods of Hematoxilin-eosin and Feulgen. It was showed alterations of the Ovary by the "intra vitam" staining method, it was reduced, collapsed or contained big Oocytes. These results were similar to the "in vivo" experiments. The histologic studies showed an important effect on the Oocytes because they had nuclear alterations. The Feulgen's Method permitted to show and irrigular distribution of the chromatin and losing of the affinities of the Nucleoli for the stain when we compared the Oocytes belong to the treated group with the Control.

It has been studied by the Feulgen's Method, if the abnormalities observed in the Oocytes were private Niridazole or they could be present under others antischistosomal drugs like potassium antimony tartrate or a nitrovynilfuran derivate (Squibb 18.506). The "in vivo" and "in vitro" experiments with antimony compund and the "in vivo" essays with Squibb 18.506 showed similar effect to Niridazole when high doses of the antimony compound were used "in vitro" and in all the "in vivo" experiments with both drugs, antimony product or Squibb 18.506.

It is concluded that the metabolic activity of he female reproductive system of *S. mansoni*, and in special its Ovary demands high energetic supply, so when by biochemical or physiological mechanism the supply is interrupted, the Oocytes become primary affected apparently in the nucleic acid metabolism.

UNMSM

LITERATURA CITADA

BARUZZI, R. 1972. Geografia Medica des Helmintiases. Cap. 13. Introducao a Geografia Medica do Brasil (Carlos Da Silva Lacaz, Roberto G. Baruzzi y Waldomiro Siqueira Jr.) Sao Paulo, Edgard Blucher, Ed. Da Universidade de Sao Paulo pp.: 305-350.

BUEDING, E. y FISHER, J. 1969. Biochemical Effects of Schistosomicides. Ann. New York Acad. Scien. *160*: 536-543.

BUEDING, E. y FISHER, J. 1970. Biochemical Effects of Niridazole on *Schistosoma mansoni*. Mol. Pharmacol. *6*: 532-539.

BUEDING, E.; NAQUIRA, C.; BOUWMAN, S. y ROSE, G. 1971. The antischistosomal activity of a nitrovinyl furan derivate (Squibb 18.506) in mice and hamsters. J. Pharmacol. Exp. Ther. *178*: 402-410.

BUEDING, E.; SCHILLER, E. y BOURGEOIS, J. 1967. Some physiological, biochemical and morphologic effects of tris (p-aminophenyl) carbonium salts (TAC) on *Schistosoma mansoni*. Amer. Trop. Med. Hyg. *16*: 500-515.

BUCK, A.; SASAKI, T.; ANDERSON, R.; HITCHCOCK, J. y LEIGH, G. 1967. Comprehensive Epidemiologic Studies of four contrasting peruvian villages. Geographic Epidemiology Unit. The Johns Hopkins University. Baltimore, Maryland, U.S.A.

COHEN, S. M.; ERTURK, E. y BRYAN, G. T. 1970. Production of Leukemia and Stomach neoplasm in Swiss, Rf, Balb C and C3H female mice by feeding N-4-(5 nitro-2-furil)-2-thiazolil acetamide. Cancer Res. *30*: 2320-2323.

DODIN, A.; BRYGOO, E. R. y RICHAUD, J. 1966. Activite Glucose-6 phosphate-deshydrogenese des adultes de *Schistosoma mansoni*. Acta Tropica. Suppl. 9: 49-53.

ERTURK, E.; COHEN, S. M. y BRYAN, G. T. 1970. Carcenogenecity of N-4-(5-nitro-2-furil)-2-thiazolil acetamide in female rats. Cancer Res. *30*: 936-941.

PARAENSE, W. L.; IBAÑEZ, N. y MIRANDA, H. 1964. *Australorbis tenagophilus* in Perú and its suceptibility to *Schistosoma mansoni*. Amer. J. Trop. Med. Hyg. *13*: 534-540.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1972. Report of a WHO consultant group on the comparative evaluation of new schistosomicidal drugs for use in treatment campaigns, Geneva, 26-29 Jun 1972 (Documento no publicado WHO/Schisto/72. 19).

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1972. Report of a WHO consultant group on Hycanthone, Geneva, 5-7 October 1971 (Documento no publicado WHO/Schisto/ 72. 20).

UNMSM

182990

UNMSM

U.N.M.S.M. BIBLIOTECA CENTRAL
000000204623

Imprenta de la Universidad
Nacional Mayor de San Marcos