

Centro de Investigaciones Toxicológicas (CEITOX)

Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Dr. José Alberto Castro

El Centro de Investigaciones Toxicológicas

Dr. Gerardo Daniel Castro



El CEITOX hoy: Arriba (de izquierda a derecha): Téc. Martín H. Costantini, Dra. María E. Maciel, Dr. Leandro N. Quintans, Téc. Gustavo G. García, Téc. Florencia Formosa, Téc. Carlos A. Francesia, Téc. Eduardo A. Vaca. Abajo (de izquierda a derecha): Dra. María Montalto, Dra. María I. Díaz Gómez, Dr. José A. Castro, Téc. Carmen Rodríguez, Dr. Gerardo D. Castro.

La vida de nuestro laboratorio es tan extensa como la mía, ¡pues ambos nacimos el mismo año! Y no son pocos los años que llevo trabajando aquí, desde 1983...

Los tiempos más felices de mi actividad profesional han sido aquellos cuando los tres, mis viejos y yo, trabajábamos juntos en el CEITOX. No solamente por el placer de investigar, pensar experimentos, discutir resultados (en el laboratorio y en casa) si no también por todas aquellas oportunidades compartidas conociendo lugares hermosos en los viajes por congresos.

En muchas de esas ocasiones me tocó ver algo muy particular y notorio para un hijo respecto de su padre y fue darme cuenta del respeto y consideración que su persona tiene en

otros pares, que solo lo conocían por su trayectoria científica a través de los papers o por su cruzada permanente por llevar los temas de nuestra especialidad que preocupan a los países subdesarrollados a los foros científicos del primer mundo.

Reconocimientos a nivel nacional como el premio de la Fundación Konex en 1993, el de CEDIQIFA en 1996 o internacionales como el Merit Award de la Unión Internacional de Toxicología (IUTOX) en 2001, o las invitaciones para escribir reviews y capítulos en libros constituyen pruebas palpables de una valoración por su persona y trayectoria que no fue conseguida precisamente mediante las relaciones públicas. Para alguien de carácter tan frontal y poco polite como el suyo, no es algo que se dé con fluidez.

El apoyo sostenido por casi treinta años de los National Institutes of Health mediante subsidios para la línea principal de investigación de nuestro laboratorio (y en última instancia madre de todas las demás), “Mecanismo de la hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono”, fue un reconocimiento a la originalidad de su investigación, en tiempos donde la comprensión de los mecanismos básicos de la toxicidad de las sustancias químicas estaba definiéndose en el mundo.

Lo que sigue a continuación es una descripción no muy extensa sobre el Centro de Investigaciones Toxicológicas fundado por mi padre, de sus principales líneas de investigación y actividades de formación de recursos humanos y de desarrollo de la Toxicología. Al preparar este resumen, recordando hechos y anécdotas, puedo decir sin falsa modestia que el CEITOX ha tenido un papel protagónico en el desarrollo de la disciplina.

Nuestro laboratorio se inició en 1961 en CITEDEF (entonces CITEFA), con la denominación de Laboratorio de Química Biotoxicológica. En noviembre de 1980, por un convenio con el CONICET, se constituyó como Centro de Investigaciones Toxicológicas (CEITOX). Hoy es uno de los laboratorios componentes de la Unidad Ejecutora UNIDEF (Unidad de Investigación y Desarrollo Estratégicos para la Defensa), mediante un convenio entre el Ministerio de Defensa y el CONICET.

Su misión es la de servir como centro de consulta, promoción, asesoramiento, referencia y excelencia en temas de Toxicología de interés para el país. La Toxicología es la ciencia que estudia las interacciones nocivas entre las sustancias químicas y los seres vivos y hace las evaluaciones del riesgo que eso implica. Comprende distintas áreas de interés según sea el ser vivo afectado, el medio o la circunstancia donde se dan esas interacciones, y esto a su vez, genera distintas orientaciones. Por ejemplo: ambiental, ecotoxicológica, industrial, ocupacional, social (vinculada con los hábitos), clínica, de fármacos, alimentaria, agronómica, veterinaria, legal, utilitaria (cuando el efecto tóxico es lo deseado, tal como en el diseño de herbicidas, fungicidas, insecticidas, fármacos quimioterápicos, etc.) y quizás otras más. Todas estas áreas de interés

requieren de conocimientos básicos sobre los mecanismos de la acción tóxica, sin los cuales no es factible ni correcto encarar los temas de su competencia.

Estamos hablando de lo que se denominan los “Fundamentos de la Toxicología”. Se incluyen aquí aquellos conocimientos sobre cómo los tóxicos se absorben en un ser vivo, cómo se distribuyen dentro del mismo, cómo son excretados, qué transformaciones ocurren en sus moléculas, cómo el tóxico en sí mismo y los productos de transformación interactúan con componentes de las células de ese organismo, y qué consecuencias nocivas resultan de estas interacciones. Como resultado de los conocimientos básicos generados será posible hacer pronósticos de riesgo, diagnósticos de etiología y diseñar tratamientos. En el caso de la Toxicología utilitaria también será posible por ejemplo concebir cómo eliminar selectivamente una plaga sin dañar a otro ser vivo que se desea preservar, o matar a un parásito que se hospeda en otro ser vivo al que no se quiere perjudicar, etc.

Se comprenderá, por tanto, que la Toxicología en cualquiera de sus áreas es esencialmente multidisciplinaria y que tiene como componentes fundamentales a la química y a la biología. Por ejemplo: la ecotoxicología requiere de la ecología, una eco-química y por supuesto, el conocimiento y práctica de los fundamentos (conceptos básicos) de Toxicología. Esta conjunción permitirá establecer el riesgo derivado de la acción de un tóxico en un ecosistema.

Para poder cumplir con su misión e interactuar con la gran variedad de profesiones que tienen alguna relación con el quehacer toxicológico (químicos, bioquímicos, farmacéuticos, biólogos, médicos, veterinarios, ingenieros químicos, agrónomos, especialistas en higiene y seguridad, geólogos, etc.) el CEITOX optó por fortalecer para su propia actividad ese aspecto central que todas las áreas necesitan: los conceptos básicos (fundamentos) de Toxicología. Este aspecto involucra entender por qué los tóxicos son dañinos para los seres vivos. ¿Cómo hacer entonces para que los estudios tuvieran validez para la gran variedad de seres vivos existentes y para los múlti-



Edificio Química en el campus de CITEDEF. Sede del Centro de Investigaciones Toxicológicas.

ples sitios blanco del daño en cada uno de ellos? Simplemente se tuvo en cuenta que: 1) la célula es la unidad anatómica y fisiológica y de origen de todos los seres vivos; 2) la intoxicación no es más que la consecuencia del daño producido por los tóxicos a nivel celular.

Mecanismos de daño celular por tóxicos. El modelo CCl_4 -hígado

El proyecto inicial y madre de las contribuciones que hizo el CEITOX a la Toxicología moderna estuvo vinculado con este tema clave, "Mecanismos de Daño Celular por Tóxicos". Mereció un apoyo financiero sostenido e ininterrumpido de los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos (NIH) entre los años 1969 y 1996 y contó también con subsidios a nivel nacional del CONICET y de la SECyT.

El tema elegido fue "Mecanismo de la hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono". Esta combinación era un sistema modelo de daño celular. Un tóxico de bajo peso molecular y que tiene un metabolismo aparentemente simple y el blanco de daño, el hígado, un órgano cuya bioquímica, función y estructura era la más conocida. Conceptualmente el proyecto podría haberse llamado "Mecanismo de daño celular por tóxicos", pues intentaba lograr reglas generales de porqué los tóxicos son tóxicos. Hilando más fino, podía haberse llamado, también, (y en inglés) "*Chemically-induced free radical cell injury*".

Curiosamente, con este proyecto la idea fue tratar de explicar paso a paso por qué el CCl_4 produce en 24 horas necrosis hepática en un 80-90% y cómo ese conocimiento podía ser usado para lograr mejores modos diagnósticos y tratamientos preventivos o terapéuticos. El objetivo era luego ver si las reglas de la toxicidad aprendidas y los tratamientos podían extrapolarse a 1) efectos del CCl_4 en otros órganos, 2) otros tóxicos hepáticos, 3) otros tóxicos actuando en otros órganos, 4) otros tóxicos actuando en otros seres vivos.

Al estudiar otros tóxicos hepáticos siempre disfruté en incluir algunos carcinógenos potentes (como las N-nitrosaminas), también usé el estudio de los fármacos antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol como "otros tóxicos" actuando sobre distintos órganos (ya que era crítico ser entendido acerca de la utilidad de estos estudios). Cuando estudiamos "otros tóxicos" sobre otros seres vivos recurrimos al efecto del Benznidazol y otros compuestos actuando ahora sobre un ser unicelular relevante para ser entendido: el *Trypanosoma cruzi*.

Se descubrieron los procesos de activación enzimática a metabolitos reactivos (radicales libres $\bullet\text{CCl}_3$ y como sus reacciones de interacción covalente o sus reacciones de abstracción de hidrógeno de blancos celulares hepáticos (proteínas, lípidos, ADN, hemo, etc.) estaban involucrados en el inicio del proceso dañino.

Nos pareció importante luego tratar de entender qué eventos críticos eran lo que esos procesos iniciales disparaban vía interacciones covalentes o estrés oxidativo, y que constituían los pasos siguientes que conducían a la muerte celular. Fue entonces que necesitamos seguir ese proceso a otros niveles (por ejemplo, estudiándolo detalladamente por microscopía electrónica e histológicamente).

Como se postulaba en la época, los procesos blancos del daño de la siguiente etapa podrían ocurrir sobre las bombas de calcio presentes en microsomas y mitocondrias, y ello conduciría a una acumulación nefasta del calcio celular. Decidimos verificar si era factible emplear quelantes de calcio que tuvieran cierto grado de liposolubilidad como tratamiento contra la necrosis. Varios quelantes específicos de calcio fueron efectivos (1) (2). Como muchas actividades mediadas por calcio requieren la participación de la hormona calmodulina, pensamos que esta última, quizás, también tuviera alguna participación en el proceso de daño celular. Y así pareció ser. Con conocidos fármacos, con capacidad anticalmodulínica, también pudo prevenirse en buena parte la acción necrogénica del CCl_4 . También eran efectivos ciertos bloqueantes de la acción del calcio (1) (2).

¿Qué proceso tan dañino iniciaba esa participación calmodulina-calcio dependiente, que llevaba a la muerte celular? Todos estos eran tratamientos que eran capaces de actuar aún seis o diez horas después de administrado el CCl_4 . ¡Nunca hasta esa época se había encontrado tratamiento alguno que fuera efectivo dado después del CCl_4 ! Era excitante, la microscopía electrónica del hígado, a 6 y 10 horas después del CCl_4 ya mostraba daños tremendos en el retículo endoplásmico y en mitocondrias. Los tratamientos que manejábamos parecían actuar cerca del denominado "punto de no retorno". Pero esa situación es la más común en las intoxicaciones humanas. Pudimos ver que esa acumulación de calcio-calmodulina dependiente estimulaba procesos degradativos de fosfolípidos y proteínas y potencialmente, de ácidos nucleicos. Fue así que encontramos que inhibidores de proteasas y fosfolipasas también eran capaces de prevenir a 6 ó 10 horas la necrosis hepática por CCl_4 (1) (2). Hicimos extrapolaciones con potencialidad antidotica a otros tóxicos hepáticos como dimetilnitrosamina, tioacetamida, aflatoxina, bromobenceno, alcohol alílico, etc.

Como el CCl_4 debe su toxicidad a que es capaz de generar radicales libres ($\bullet\text{CCl}_3$ y $\text{CCl}_3\text{O}\bullet_2$) y promover el proceso de estrés oxidativo (donde también se generan radicales libres y especies reactivas del oxígeno), también estudiamos la capacidad de impedir la necrosis hepática por CCl_4 con varios compuestos radioprotectores (ej. cistamina, cisteamina, cisteína, WR1605, AET, N-acetilcisteína, glutathion), y todos ellos funcionaron muy bien.

También verificamos la susceptibilidad a la acción tóxica del CCl_4 en otros órganos que tienen distintos contenidos de CYP2E1 y aún en especies que casi carecen de él (ej. la gallina), y por supuesto, la gallina es resistente a

su efecto, a tal punto que en una época se usaba el CCl_4 como vermificada en estas aves (1) (2).

Las contribuciones del CEITOX permitieron establecer paso a paso mecanismos por los cuales las células se dañan al exponerse a este tóxico. Desde la comprensión del metabolismo activante que genera radicales libres triclorometilo, las interacciones covalentes con distintos tipos de moléculas blanco en la célula (2), el proceso de estrés oxidativo que altera procesos clave de la homeostasis celular, hasta los procesos degradativos que llevan a la muerte y la posterior necrosis (3-5). Más importante aún, fue posible desarrollar tratamientos capaces de interrumpir el proceso en cada paso y así proteger a las células. Los resultados permitieron establecer que las células inicialmente comienzan a dañarse de modos frecuentemente característicos de cada compuesto, pero que se encaminan luego a morir por caminos comunes. En el CEITOX se desarrollaron tratamientos capaces de bloquear esa etapa común tardía, lo cual como estrategia antidótica es algo aplicable a muchos tóxicos.

Carcinogénesis química ambiental

Hoy se sabe que la enorme mayoría de los cánceres que padece el hombre tienen un origen ambiental. Por medio ambiente humano se entiende todo aquello que hace a la vida del hombre. El aire que respira, el agua que bebe, los alimentos, la radiación solar a la que se expone, sus hábitos, el trabajo que realiza, los fármacos que recibe, etc. Dentro de este conjunto de factores se destacan por su relevancia e incidencia el hábito de fumar, la alimentación, el consumo excesivo de alcohol y la radiación ultravioleta solar. La importancia de estos conceptos reside en que el conocimiento en detalle acerca de cuáles son los componentes del medio ambiente involucrados, permitiría en principio concretar una prevención efectiva. El gran desafío es saber cuáles son las sustancias presentes en el medio ambiente humano que por su ubicuidad, potencia carcinogénica y particularidades en su modo de acción puedan explicar por sí los cánceres que se observan en la población (6). Muy pocas sustancias reúnen estas características, por ejemplo los hidrocarburos aromáticos policíclicos (que se producen en los procesos de combustión), la aflatoxina B1 (presente en alimentos contaminados con ciertas especies de hongos), las N-nitrosaminas (presentes en una gran variedad de alimentos y en el humo del cigarrillo), algunos productos de pirólisis de aminoácidos (producidos en las carnes asadas), las dioxinas, algunas aminos aromáticas, etc. (7-12).

Sin embargo, en la gran mayoría de los casos todo parece indicar que los cánceres humanos provendrían de una conjunción de factores operando simultáneamente. La otra pregunta es, ¿qué es lo que estas sustancias hacen de daño en los tejidos, que resulte en un cáncer? Es hoy

muy grande el grado de conocimiento alcanzado al respecto y esto ha dado lugar a la visualización de maneras prácticas y factibles de prevenir la mayoría de los cánceres, y aún de imaginar para un futuro no muy lejano qué hacer para conseguir terapéuticas mucho más eficientes que las actuales.

Una línea de trabajo de alto interés en el CEITOX tiene que ver con la Carcinogénesis Química Ambiental. Estos estudios estuvieron dirigidos inicialmente hacia la comprensión de los mecanismos de carcinogenicidad de halometanos como el cloroformo y el tetracloruro de carbono (13-16). El primero se forma durante los procesos de cloración de aguas, y el segundo tiene un amplio uso industrial. Nuestros estudios permitieron establecer que su carcinogenicidad hepática estaría vinculada con las interacciones de sus metabolitos con determinadas fracciones de proteínas nucleares (15). Estos estudios fueron de interés para la EPA (*Environmental Protection Agency*, EE.UU.) quien los tuvo en cuenta para fijar tolerancias. También se realizaron estudios con otros carcinógenos relevantes como la tioacetamida, la aflatoxina B1 (una toxina fúngica contaminante de alimentos de gran relevancia sanitaria) y algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Otra línea de estudio estuvo dirigida hacia las N-nitrosaminas. Son estas carcinógenos violentos presentes en el humo de cigarrillo; los alimentos; en algunas bebidas alcohólicas y en muchos otros productos, se puede decir que son carcinógenos omnipresentes. En el CEITOX evidenciamos su presencia en alimentos, plaguicidas y aún cervezas de producción nacional (17-19). Se realizó una labor intensa de difusión mediante cursos, conferencias y escritos acerca de cómo evitar su formación en estas matrices. Esto permitió a algunas empresas obtener productos libres de nitrosaminas y exportarlos y aún montar plantas llave en mano en el extranjero. Los estudios experimentales mecanísticos sobre la acción carcinogénica de estas sustancias permitieron a su vez evidenciar, que nitrosaminas presentes en el humo de cigarrillo pueden pasar por leche materna al lactante y allí reaccionar con el ADN de sus órganos para iniciar mutaciones y carcinogénesis (20). Otro tanto pudo verificarse en ovarios (21).

Se realizó un esfuerzo muy grande para mejorar la formación de recursos humanos en estos temas. Fue así que el Dr. Castro ganó una beca de la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC). En ese periodo estuvo aprendiendo procedimientos de aislamiento y análisis de bases de ácidos nucleicos en la *Internacional Agency for Research on Cancer* (IARC) en Lyon, Francia, bajo la dirección de el Dr. R. Montesano. Esa estadía le permitió también aprender más sobre los avances que la epidemiología estaba apuntando a la génesis del cáncer humano.

A lo largo de esos años el laboratorio logró también que otros miembros del grupo se formaran en temas vinculados (la Dra. María I. Díaz Gómez en carcinogénesis química, la Dra. Élide Cignoli de Ferreyra en histoquími-

ca, el Dr. Héctor M. Godoy en análisis de N-nitrosaminas, Carmen Rodríguez en metodologías de microscopía electrónica, María del Carmen Villarruel en análisis de carcinógenos en alimentos y Gerardo Castro en técnicas de GC-MS para el análisis de bases de ADN).

En los últimos seis años contamos con el apoyo del NIH para otro proyecto más, uno sobre el mecanismo de la carcinogenicidad del CCl_4 (era el inicio más lógico). Este compuesto era nuestro pet preferido. Es hepatocarcinogénico y, para colmo, se lo había encontrado presente en aguas de consumo humano junto con su metabolito, el cloroformo.

En este proyecto se obtuvieron resultados interesantes. Uno de ellos fue observar que la activación a radicales libres $\bullet\text{CCl}_3$, que había sido tan relevante en el caso de la necrosis hepática a nivel del retículo endoplásmico, también podía ocurrir en la membrana externa de preparados de núcleos totalmente libres de contaminación por retículo endoplásmico. La importancia reside en que los $\bullet\text{CCl}_3$ son tan reactivos que no tienen capacidad para migrar desde el retículo endoplásmico distante (en términos moleculares) al núcleo. Pudo verificarse no solamente la unión al ADN, sino también a lípidos de su membrana y quizás lo más importante, a las distintas fracciones de las proteínas nucleares (15). También se estudió la naturaleza química de las interacciones de los $\bullet\text{CCl}_3$ sobre las bases del ADN, algunos aminoácidos y lípidos (2).

Paralelamente, desarrollamos una actividad intensa en el campo de la carcinogénesis por N-nitrosaminas. En contraste con el caso del CCl_4 , las nitrosaminas (ej.: dimetil; dietil; otras) son carcinógenos potentes y ubicuos en el medio ambiente (alimentos; bebidas alcohólicas; humo de cigarrillo, etc.) ¡En algunos casos pueden producir cáncer después de exponer los animales a una sola dosis! La dimetilnitrosamina era particularmente atractiva para estudiar. Se activa de un modo parecido al CCl_4 (vía el CYP2E1). Sus efectos dañinos son mediados por la producción de un metabolito reactivo, el ión carbonio $^+\text{CH}_3$. Este reacciona con el ADN y las proteínas.

En esa época se consideraba que no había ninguna especie que fuera resistente a la acción tóxica de la dimetilnitrosamina. Nosotros demostramos que no era así para el caso de la gallina (como pasaba con el CCl_4) y aún con otra ave; la paloma. Estas aves tienen una baja capacidad metabolizadora de Fase I (22).

En los estudios sobre el metabolismo pudimos verificar que la dietilnitrosamina (mucho más potente carcinógeno que la dimetilada) no parecía activarse igual que la dimetilnitrosamina. También verificamos la existencia de un camino metabólico reductivo para la dimetilnitrosamina, que conducía a la hidracina correspondiente (23). Ello parecía muy relevante porque se le atribuía en algunos estudios un rol en el cáncer de colon y a su vez se sabía que varias hidracinas producían cáncer de colon. Por ello fue interesante abordar el modelo experimen-

tal de los visones, los cuales a pesar de ser carnívoros no habían evidenciado cáncer de colon pero sí de hígado al exponerse a N-nitrosaminas en su alimento a base de pescado (19).

Se hicieron estudios en otros órganos de la rata que fueron de interés, por ejemplo en el ovario, donde se verificaron interacciones con su ADN y proteínas, derivadas de un metabolismo activamente *in situ*. Ello pareció de alto interés debido a la presencia relevante de dimetilnitrosamina en el humo del tabaco y debido al riesgo que ello implicaba para descendencia que podía involucrar esas interacciones (21).

La exposición de la mujer que está amamantando a nitrosaminas fuertemente carcinogénicas presentes en el humo del tabaco (por ejemplo, dimetilnitrosamina; nitrosopirrolidina y nitrosomonocotina también puede iniciar el proceso de mutagénesis y carcinogénesis en la cría que amamanta como se evidenció la formación de sus metabolitos reactivos con las bases de ADN (20).

Chagas: una aplicación del conocimiento de los mecanismos de toxicidad

El Mal de Chagas es una enfermedad endémica parasítica que afecta a millones de personas en Latinoamérica. Muchos millones más presentan riesgo de adquirir la enfermedad. Por su misma definición, la Toxicología incluye por tanto a todos los seres vivos involucrados en el problema que plantea la enfermedad: El hombre y los fármacos que se emplean en el tratamiento, junto con los efectos laterales que éstos poseen; los insectos vectores de la enfermedad y los insecticidas que se emplean, su efectividad y el riesgo para ecosistemas y para el hombre. Las extrapolaciones de lo aprendido permitieron encarar el problema planteado por la necesidad de información actualizada acerca de los efectos laterales tóxicos de los fármacos antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol. Un problema grave en el tratamiento del Mal de Chagas es que sólo existen disponibles en el mercado estos dos fármacos y que ambos, tienen efectos laterales importantes (24) (25). Se requería entender los efectos tóxicos que observaba el clínico al administrárselas a sus pacientes chagásicos. Frente a un caso de Chagas agudo infantil, el médico no tiene otra alternativa que emplearlos porque corre riesgo la vida del paciente. Hay entonces una necesidad de tratamientos nuevos más seguros y eficaces. Pero más importante aún, desde su introducción en el mercado los conocimientos de relaciones estructura / toxicidad permitían predecir otros riesgos no necesariamente evidentes, ni para el médico ni para el paciente, pero igualmente o más grandes que los observables.

En el CEITOX se demostró que ambos compuestos eran mutagénicos y que podían iniciar de ese modo la

carcinogénesis. Se descubrió también que ambos poseen efectos adversos sobre la reproducción dañando ovarios y testículos o alterando la función adrenal. Además se observaron efectos adversos en el colon, esófago, páncreas, corazón y ello es importante porque la enfermedad de Chagas tiene de por sí, efectos nocivos sobre alguno de esos órganos y hoy existe la tendencia a usar estos fármacos posteriormente a las etapas agudas de la enfermedad (26). Pudo establecerse también que el Benznidazol atraviesa la barrera placentaria y que reacciona químicamente con los componentes celulares del feto (27). Esto es sumamente grave puesto que en el pasado había médicos que utilizaban este fármaco en mujeres embarazadas para prevenir el Chagas congénito. Estudiando los procesos de toxicidad y de biotransformación del Benznidazol se propuso que el momento óptimo para encarar ese problema, es poco después del nacimiento y esto es lo que hoy se hace (28).

Los trabajos del CEITOX no solamente han contribuido a la comprensión de los efectos laterales tóxicos de los fármacos antichagásicos hoy en uso (Nifurtimox y Benznidazol) sino que han surgido de ello criterios científicos para la selección de su uso. A lo largo de los años, estos estudios han recibido subsidios de CONICET, SECyT y en parte por los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de Estados Unidos.

Paralelamente, se efectuaron estudios en colaboración con otros laboratorios para desarrollar nuevos agentes terapéuticos contra la enfermedad. Se analizó cómo el conocimiento toxicológico podía utilizarse para imaginar nuevas sustancias capaces de matar al agente etiológico de la enfermedad, el *Trypanosoma cruzi* y también para entender el por qué de la efectividad del Benznidazol contra este parásito. En todos estos aspectos la Toxicología ha tenido y tiene una participación protagónica.

Estos estudios se hicieron en colaboración con el laboratorio del Dr. J. Cazzulo, de la Universidad Nacional de General San Martín. Se estableció el mecanismo de acción del Benznidazol y se encontraron varios compuestos nuevos capaces de matar al *T. cruzi* eficientemente, aunque con dificultades para ser trasladados a la etapa clínica (29-32).

Las contribuciones del CEITOX en el problema de la enfermedad de Chagas no se agotaron en estos estudios. También se hicieron extrapolaciones a otro ser vivo vinculado con la transmisión de la enfermedad, el *Triatoma infestans* (vinchuca). Esos estudios se realizaron en colaboración con el laboratorio de Química Orgánica de CITEFA en la década del setenta. Por esos tiempos la vinchuca se veía resistente a los insecticidas disponibles en el mercado y eso constituía un problema sanitario serio. Más aún, los compuestos en uso tampoco eran ovicidas con lo cual la recurrencia era frecuente. En esos estudios, se estableció que la vía respiratoria del insecto era el modo más eficaz de matarlo y que

entonces los insecticidas gaseosos como el bromuro de metilo y aún el anhídrido sulfuroso, eran apropiados y de acción tóxica rápida (el primero también es ovicida) (33). Se hicieron ensayos de campo cubriendo los ranchos con carpas plásticas, con resultados muy positivos. Estos estudios dieron lugar a la génesis de un centro especializado para este tipo de estudios, el CIPEIN, que continuó trabajando exitosamente en otras alternativas.

Recientemente, se está intentando bloquear los efectos laterales tóxicos de ambos compuestos, preservando su efectividad terapéutica. Un enfoque que está probándose es buscar modos de bloquear los efectos laterales tóxicos del Benznidazol y del Nifurtimox con compuestos que no comprometen –o mejoran– su efectividad quimioterápica. Parece más promisorio.

Recientemente, con el afán de ser útil en este tema, nos interesamos en el problema de las transfusiones de sangre en áreas donde esta enfermedad es endémica y en situaciones de emergencia en las cuales debe procederse con urgencia y cuando no hay posibilidad de verificar si la sangre esté infectada o no hay disponibilidad suficiente de donadores. En esos casos se recomienda el empleo del Violeta de Genciana para efectuar la quimioprofilaxis efectiva. Este aditivo siempre fue visto como un riesgo de carcinogenicidad y mutagenicidad para el recipiente de la transfusión debido a que distintos ensayos de mutagenicidad en sistemas bacterianos mostraron que en efecto este aditivo es mutagénico para leucocitos de la sangre que aporta el dador y además para los del que la recibe (34). Pero teniendo en cuenta que este compuesto probó ser muy útil en situaciones reales de necesidad, intentamos bloquear ese efecto mutagénico para el recipiente de la transfusión y esto se logró administrándole al que recibe la sangre compuestos como la N-acetil cisteína o el ácido lipoico (esto no tendría problemas, teniendo en cuenta que la sangre ya ha sido librada del *Trypanosoma cruzi* con el violeta de Genciana previamente) (34).

El alcohol: un nuevo “pet” en el laboratorio

A pesar de que una parte importante del tiempo en el laboratorio estaba dedicada a otros proyectos nunca se dejó de apuntar al área de la carcinogénesis química. Frecuentemente los toxicólogos que estudiaban el tema de la hepatotoxicidad del CCl_4 mantenían un seguimiento bibliográfico (o experimental a veces) con el tema del efecto del consumo de alcohol sobre el hígado. Hubo razones adicionales que influyeron en el interés del Dr. Castro por el tema de la toxicología del alcohol. Desde aquellos tiempos de su beca en NIH en los sesenta y la actualidad, el consumo de alcohol en la Argentina (y en gran parte del mundo) aumentó gravemente. Tam-

bién ello ocurrió en la mujer y dejó hace rato de ser solo problema en los hombres. Además, el hábito de fumar y el consumo de alcohol están entre las causas conocidas más frecuentes de enfermedad y mortalidad. Hay sin embargo aspectos de la gravedad del consumo excesivo de alcohol que no han tenido una atención adecuada a pesar de su relevancia: 1) su participación de la promoción de cáncer en distintos órganos; 2) el daño reproductivo que produce en ambos sexos. La población en cambio percibe claramente los efectos sobre el sistema nervioso central y sus consecuencias en la vida diaria (35) (36).

Para colmo, es mucho más difícil lograr cambios culturales sobre el abuso del alcohol, como lo que hace poco comenzó a ocurrir con el hábito de fumar. Esto vuelve a la educación algo más crítico para la prevención. Requiere tener que convencer a los consumidores con argumentos que documenten los daños de un modo más convincente y esto solo se logra con estudios sobre los mecanismos de la acción tóxica del alcohol. Eso es de interés de un laboratorio de investigación y este tipo de enfoque también dio frutos positivos en el caso del hábito de fumar.

Además del hábito de fumar y de la alimentación, el consumo de alcohol es uno de los tres factores de riesgo más importante para los cánceres humanos. Las localizaciones asociadas con este riesgo incluyen el tracto aerodigestivo superior, el hígado, la mama, el colon y recto; y con algún grado de incertidumbre, estómago, próstata y pulmón (35). En el CEITOX se ha analizado el mecanismo por el cual el consumo de alcohol promueve la inducción de cáncer en las tres etapas del proceso: iniciación, promoción y progresión. Se hace énfasis especialmente en la necesidad de una biotransformación del etanol al mutágeno y carcinógeno acetaldehído y de la estimulación de un proceso de generación de radicales libres del propio alcohol (1-hidroxietilo, acetilo) y de especies reactivas de oxígeno (37). En estudios recientes se encontraron nuevas vías metabólicas para la generación de metabolitos reactivos del etanol, en la fracción nuclear de hígado y en órganos relevantes a la carcinogénesis como mama y próstata (38) (39). Se estudiaron posibilidades preventivas a través de la dieta que surgen más allá de evitar el consumo de bebidas alcohólicas (39-42).

Es importante además tener en cuenta el efecto estimulador del consumo de alcohol sobre la activación de otros carcinógenos ambientales (43-45), su capacidad para inhibir procesos de reparación de daños en el ADN, sobre el sistema inmune y en la progresión del proceso carcinogénico.

En la actualidad estamos explorando también en qué medida este tipo de biotransformaciones podría ser relevante para explicar daños reproductivos en testículos, en útero y en ovarios, que se observaron en la epidemiología humana (36) (41) (42). Estas investigaciones han recibido subsidios de CONICET, de ANPCyT y de UNSAM.

La asociación entre el consumo de alcohol con el há-

bito de fumar y la alimentación rica en grasa y proteínas animales es particularmente perjudicial al respecto. La investigación experimental debe tener como objetivo analizar las razones mecánicas por las cuales estas potenciaciones podrían ocurrir y cómo es factible disminuir los riesgos por educación y prevención.

Una misión: contribuir al desarrollo de la toxicología en el país y en el mundo

Desde 1969 en adelante pero más intensamente entre 1973 y 1976, el Dr. Castro junto con colegas médicos (las Dras. E. Giménez, N. Vallejo u ocasionalmente con algunos de sus colaboradores del Centro de Intoxicados del Hospital de Niños, con el Dr. A. Grande, del Hospital Posadas, con el Dr. J. Berman, de Rosario) recorrieron las provincias promoviendo que en distintos lugares de nuestro país hubiera al menos lo siguiente:

- 1) Centros de Tratamiento de Intoxicados.
- 2) Laboratorios que pudieran hacer diagnóstico bioquímico de intoxicaciones.
- 3) Laboratorios capaces de detectar y/o cuantificar tóxicos en el medio ambiente.
- 4) Laboratorios capaces de investigar problemas toxicológicos regionales.

Casi no ha habido lugar en que no hayan estado por lo menos una vez y en algunos casos varias veces. Ello les permitió conocer y apoyar a mucha gente interesada en la Toxicología. De las relaciones surgieron algunas amistades y vínculos que luego en diciembre de 1979 estimularon a mi padre a convocar a todos con la propuesta de fundar una Sociedad Argentina de Toxicología (hoy Asociación Toxicológica Argentina), entidad que fuese multidisciplinaria y cuyos estatutos fuesen democráticos y representativos. La Asociación sigue existiendo, ha hecho muchos congresos y actividades científicas y permitió vínculos antes no imaginables entre la gente de distintas profesiones y para el bien del país. En algún momento en sus comienzos fue elegido su presidente. Otros integrantes del CEITOX ocuparon cargos relevantes en su conducción.

La experiencia adquirida en Argentina llevó luego a mi padre a desafíos más importantes. Sucedió que la Unión Internacional de Toxicología (IUTOX) lo designó entre 1983 y 1986 como uno de los siete miembros de su Comité Científico y tuvo la arriesgada inquietud de preguntarle: ¿qué cosa creía él que IUTOX no estaba haciendo y debería hacer? Como era el único de los siete directores proveniente de un país en desarrollo, sintió la responsabilidad de plantear que había mucho que hacer en estos países e hizo una serie de propuestas. Como resultado, hoy IUTOX tiene en su organigrama una división entera para ocuparse de problemas en nuestros países. Otra experiencia parecida le sucedió con la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR), donde fue

uno de los Consejeros de la Sección de Toxicología, entre 1979 y 1987 y Consejero en su Comité Ejecutivo entre 1998 y 2001. Hoy los congresos de IUPHAR tienen secciones específicas donde se analizan los problemas toxicológicos de los países en vías de desarrollo.

En 1987 en el CEITOX organizamos el Primer Congreso Internacional de Toxicología en los Países en Desarrollo, que ocurrió en el mes de noviembre en Buenos Aires. En este ámbito se analizaron los problemas que vinculan Toxicología con el subdesarrollo, y que son muchos. Concurrieron trescientas personas de 29 países y allí interactuaron idealistas de ambos mundos, el desarrollado y el todavía en desarrollo ¡La llama permaneció encendida! Los siguientes congresos han ocurrido desde entonces en varios países en vías de desarrollo, cada tres años. A partir de 2005 IUTOX consideró tan relevantes a estos congresos que los incorporó como su segunda actividad científica junto a los congresos mundiales (46).

El CEITOX y la formación de recursos humanos en toxicología

La formación de recursos humanos en Toxicología y la promoción de esta actividad en el país e internacionalmente siempre ocupó un lugar importante dentro del CEITOX. Varios de sus investigadores hemos sido o somos docentes de Toxicología, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires, en la Universidad J.F. Kennedy, en la UADE, en la Universidad Nacional de La Pampa y otras. En la actualidad tenemos bajo nuestra responsabilidad una carrera de posgrado en la Universidad Nacional de General San Martín (UNSAM), y a la que nos referiremos a continuación. En nuestro centro se han desarrollado dieciocho tesis de doctorado y dos de maestría. Una gran parte de los doctorandos provino de universidades del interior del país y las tesis fueron defendidas principalmente en la Universidad de Buenos Aires y en la UNSAM.

Todos los investigadores del CEITOX hemos tenido la oportunidad, y para varios de nosotros, en más de una ocasión, de perfeccionarnos en el exterior mediante becas postdoctorales otorgadas por CONICET, la Unión Internacional contra el Cáncer, el NIH, el *British Council*, la Fundación Alexander von Humboldt y otros. Prestigiosas instituciones y universidades del extranjero nos recibieron y eso contribuyó invaluablemente a la especialización y mejoramiento de las líneas de investigación en el laboratorio. Mencionaremos algunos ejemplos: diferentes laboratorios de los Institutos Nacionales de la Salud, *Chemical Industry Institute of Toxicology*, *University of Texas Medical School*, *University of Massachusetts Medical School* y *National Center for Toxicological Research* (EE.UU.), Agencia Internacional del Cáncer (Francia), *Chester Beatty Research Institute*, *Middlesex Research Hospital* y *Toxicology Research Unit* (Reino Unido), *Institute of Toxicology* (Suiza), *Deutsche Krebsforschung de Heidelberg*, *Institute of Toxicology de Tübingen*, *Universidad de Mainz* (Alemania), *Universidad de Graz* (Austria), *Instituto Nacional de Toxicología* (España), etc.

A lo largo de los años muchos profesionales del interior del país y algunos del exterior han concurrido a formarse en temas específicos de investigación mediante el régimen de pasantías.

Docencia de posgrado en Toxicología. El vínculo con la Universidad Nacional de General San Martín

Las actividades de docencia del CEITOX en la UNSAM se desarrollan dentro del Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental (3iA) y son:

La Carrera de Especialización en "Evaluación de contaminación ambiental y su riesgo toxicológico". Esta carrera tiene como propósito generar recursos humanos idóneos en el campo de la evaluación de la contaminación ambiental y el riesgo toxicológico asociado, en un nivel claramente operativo técnico. Estos profesionales especialistas habrán adquirido lo siguiente:

- Información y formación que les permita encarar el problema de determinar la naturaleza y magnitud de la contaminación y de los efectos potenciales sobre el ambiente.
- Formación en temas vinculados con efectos de tóxicos sobre seres vivos, suficiente como para percibir los riesgos tóxicos que asumen al evaluar un caso de contaminación ambiental, y los que ésta y las soluciones que proponen puedan tener sobre los seres vivos.
- Conocimiento acerca de dónde y a quiénes recurrir para satisfacer necesidades de información, asesoramiento, o de resolución de aspectos técnicos específicos; relacionados con la evaluación de riesgo toxicológico.

Desde su comienzo en 1999, la carrera ha producido algo más de cincuenta especialistas, desde profesiones de base como la medicina, la química y la bioquímica, la biología, la ingeniería química, la farmacia o la higiene y seguridad laboral, entre otras. Esta carrera fue acreditada por la CONEAU con categoría A en 2004 y recategorizada con la misma letra en 2012. La gestión académica está enteramente en el ámbito de nuestro laboratorio, siendo el Dr. Gerardo Castro el coordinador y el Dr. José Castro su director.

Las actividades extracurriculares de la carrera de especialización, que se desarrollan en la forma de cursos, a distancia, semipresenciales o presenciales: "Toxicología I" (toxicocinética, o los procesos que siguen los tóxicos dentro de un organismo vivo), "Toxicología II" y "Toxicología III" (toxicodinamia, esto es, la respuesta a

los tóxicos de distintos sistemas y órganos), “Emergencias toxicológicas masivas” (análisis de distintos casos de exposiciones masivas a tóxicos); “Bases moleculares de la evaluación de riesgo en Toxicología” (estudiar como los mecanismos de toxicidad pueden variar en función de las dosis y su relación con la evaluación de riesgo); “Ecotoxicología” (los tóxicos alterando la vida de distintas especies y sus interacciones en un ecosistema); “Manejo de incidentes con productos químicos peligrosos” (que trata sobre el marco legal y las metodologías para la acción y contención de este tipo de incidentes).

El objetivo de estas actividades es fundamentalmente acercar varios de los temas más relevantes que se tratan en la currícula de la especialización, a cursantes del interior del país, que repetidamente se interesan por la carrera pero no pueden acceder a una cursada presencial tan extensa. El éxito de esta iniciativa quedó revelado por las repetidas ediciones de todos los cursos, que desde 1998 a la fecha han realizado más de tres mil profesionales. De ellos, una proporción menor pero relevante (más de 240) corresponde a alumnos de varios países de Iberoamérica y aún de otras latitudes.

El papel de la educación en la resolución de los problemas ambientales es protagónico. Aquellas sociedades que han encarado cambios en su educación frente a la comprensión de los problemas sanitarios que padecen han producido mejoras sustanciales en la prevención de las enfermedades. En el caso de la carcinogénesis, estas diferencias se revelan incluso por la epidemiología. La formación en distintos aspectos de la Toxicología, de profesionales en áreas como la Higiene y Seguridad Laboral, la Biología, la Química, etc., contribuye a la educación de la sociedad toda y a impulsar los cambios que se necesitan. Las actividades docentes del CEITOX con la UNSAM pretenden ser un aporte en tal sentido.

Referencias bibliográficas

1. Castro JA, Castro GD. Carbon tetrachloride. En: Mc Cuskey R, Earnest DL, editores. Hepatic and Gastrointestinal Toxicology. En: Sipes IG, Mac Queen CA, Gandolfi AJ, editores. Comprehensive Toxicology. New York: Elsevier Science; 1997. p. 251-71.
2. Castro JA, Castro GD. Treatment of chemically induced free radical mediated cell injury and toxicology. *Anales Soc Cient Argent* 1997; 227: 41-54.
3. Castro JA. Mechanistical studies and prevention of free radical cell injury. *Proceedings of the 9th (IUPHAR) International Congress of Pharmacology*, vol 2. London: The Macmillan Press Ltd; 1984. p. 243-50.
4. Castro JA. Prevention of chemically induced liver injury. En: Goldstein RS, Hewitt W, Hook JB, editores. Toxic interactions between chemicals mechanism and effects. New York: Academic Press; 1990. p. 233-57.
5. Castro JA. Toxicología básica. Mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1993; 27: 197-206.
6. Castro JA. Importancia de los factores ambientales en los cánceres que padece el hombre. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1993; 17: 3-9.
7. Castro JA. Cáncer y el hábito de fumar. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1981; 15: 363-74.
8. Castro JA. Efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos del arsénico. Un problema toxicológico de interés nacional. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1982; 16: 3-17.
9. Castro JA. El cáncer, el alimento y la alimentación. Carcinógenos en alimentos. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1982; 16: 243-64.
10. Castro JA. Cánceres de origen medicamentoso. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1983; 17: 369-80.
11. Castro JA. Cáncer, alimentación y alimento. Epidemiología y etiología del cáncer de colon. II. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1983; 17: 213-31.
12. Castro JA. Cáncer, alimentación y alimento. Epidemiología y etiología del cáncer de estómago. I. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1983; 17: 203-12.
13. Díaz Gómez MI, Castro JA. Covalent binding of chloroform metabolites to nuclear proteins. No evidence for binding to nucleic acids. *Cancer Lett* 1980; 9: 213-18.
14. Díaz Gómez MI, Castro JA. Nuclear activation of carbon tetrachloride and chloroform. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1980; 27: 191-4.
15. Castro GD, Díaz Gómez MI, Castro JA. Species differences in the interaction between CCl₄ reactive metabolites and liver DNA or nuclear protein fractions. *Carcinogenesis* 1989; 10: 289-94.
16. Castro GD, Díaz Gómez MI, Castro JA. Biotransformation of carbon tetrachloride and lipid peroxidation promotion by liver nuclear preparations from different animal species. *Cancer Lett* 1990; 53: 9-15.
17. Marzi A, Castro JA. Presencia de nitrosaminas volátiles carcinogénicas en algunos pesticidas que se emplean en el país. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1983; 17: 387-92.
18. Marzi A, Castro JA. Presencia del carcinógeno dimetilnitrosamina en cervezas y maltas de producción nacional. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1983; 17: 381-6.
19. Martino PE, Díaz Gómez MI, Tamayo D, López AJ, Castro JA. Studies on the mechanism of the acute and carcinogenic effects of N-nitrosodimethylamine on mink liver. *J Toxicol Environ Health* 1988; 23: 183-92.
20. Díaz Gómez MI, Tamayo D, Castro JA. Administration of N-nitrosodimethylamine, N-nitrosopyrrolidine or N'-nitrosornicotine to nursing rats: Their interaction with liver and kidney nucleic acids from sucklings. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76: 1133-36.
21. DíazGómezMI, TamayoD, CastroJA. Nitrosodimethylamine metabolism in rat ovaries. Interactions of its metabolites with nucleic acids and proteins. *Cancer Lett* 1988; 41: 257-63.
22. Godoy HM, Díaz Gómez MI, Marzi A, de Ferreyra EC, de Fenos OM, Castro JA. Chicken resistance to dimethylnitrosamine acute effects on the liver: A comparative study with other species. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 687-91.

23. Godoy HM, Díaz Gómez MI, Castro JA. Metabolism and activation of 1,1-dimethylhydrazine and methylhydrazine, two products of nitrosodimethylamine reductive biotransformation, in rats. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71: 1047-51.
24. Castro JA, Díaz de Toranzo EG. Toxic effects of Nifurtimox and Benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Biomed Environ Sci* 1988; 1: 19-33.
25. Castro JA. Contributions of toxicology to the problem of Chagas' disease (American trypanosomiasis). A year 2000 update. *Biomed. Environ Sci* 2000; 13: 271-79.
26. Castro JA, Montalto de Mecca M, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human Exp Toxicol* 2006; 25: 471-79.
27. Díaz de Toranzo EG, Masana M, Castro JA. Administration of Benznidazole, a chemotherapeutic agent against Chagas' disease, to pregnant rats. Covalent binding of reactive metabolites to fetal and maternal proteins. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1984; 272: 17-23.
28. Aguilar EG, Díaz de Toranzo EG, Castro JA. Pasaje del antichagásico Benznidazol vía leche materna a ratas lactantes. Efectos sobre el metabolismo de xenobióticos. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1990; 24: 371-74.
29. Díaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ. Interaction of Benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 1988; 44: 880-1.
30. Lacuara JL, de Barioglio SR, de Oliva PP, Bernacchi AS, de Culasso AF, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ. Disruption of mitochondrial function as the basis of the trypanocidal effect of trifluoperazine on *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 1991; 47: 612-6.
31. Franke de Cazzulo BM, Bernacchi AS, Esteva MI, Ruiz AM, Castro JA, Cazzulo JJ. Trypanocidal effect of SKF 525A, Proadifen, on different developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *Medicina* 1998; 58: 415-8.
32. Bernacchi AS, Franke de Cazzulo BM, Castro JA, Cazzulo JJ. Trypanocidal action of 2,4-dichloro-6-phenylphenoxyethyl diethylamine hydrobromide (Lilly 18947) on *Trypanosoma cruzi*. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 399-404.
33. Castro JA, Zerba EN, de Licastro SA, Picollo MI, Wood EJ, Rúveda MA *et al.* Toxicity of methyl bromide and other gaseous insecticides to *Triatoma infestans*. *Acta Physiol Latinoam* 1976; 26: 106-14.
34. Díaz Gómez MI, Castro JA. Genotoxicidad en leucocitos por la quimioprolifaxis de sangre con Violeta de Genciana y su prevención con antioxidantes. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2013; 47: 719-26.
35. Maciel ME, Castro GD. Consumo de alcohol y su relación con los cánceres de mama y próstata. Un aspecto menos conocido de la toxicidad del etanol. *Ciencia e Investigación* 2013; 63: 49-66.
36. Quintans LN, Castro GD. Alcohol y toxicidad reproductiva. *Ciencia e Investigación* 2013; 63: 39-47.
37. Castro JA, Castro GD. Hydroxyl and 1-hydroxyethyl radical detection by spin trapping and GC-MS. En: Armstrong D, editor. *Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols. Methods in Molecular Biology Series*. Totowa: Humana Press; 2002. p. 89-99.
38. Castro JA, Castro GD. Mechanisms in prostate damage by alcohol. En: Preedy VR, Watson RR, editores. *Comprehensive Handbook of Alcohol Related Pathology* New York: Elsevier-Academic Press; 2005. p. 1007-15.
39. Castro GD, Castro JA. Alcohol drinking and mammary cancer. Pathogenesis and potential dietary preventive alternatives. *World J Clin Oncol* 2014; 5: 713-29.
40. Castro GD, Castro JA. Metabolism of ethanol to acetaldehyde in the rat mammary tissue. Inhibitory effects of plant polyphenols and folic acid. En: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S, editores. *Alcohol, Nutrition and Health Consequences. Nutrition and Health*. New York: Springer Science + Business Media; 2013. p. 145-54.
41. Castro GD, Quintans LN, Maciel ME, Castro JA. Preventive effects of plant polyphenols in the promotion of mammary cancer and testicular damage induced by alcohol drinking. En: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S, editores. *Polyphenols in Human Health and Disease*. San Diego: Elsevier-Academic Press; 2014. p. 1181-90.
42. Castro JA, Castro GD. Acetaldehyde formation and accumulation. Toxic effects on reproductive target tissues during alcohol drinking. En: Stone M, editor. *Acetaldehyde: Biochemistry, Applications and Safety Concerns*. Hauppauge: NOVA Science Publishers; 2015. p. 79-129.
43. de Mecca MM, Bartel LC, Castro JA. Effect of chronic alcohol drinking on rat liver microsomal nitroreductive metabolism of nifurtimox and benznidazole. *Hum Exp Toxicol* 2013; 32: 1305-10.
44. Díaz Gómez MI, Valles E, Fanelli SL, Delgado de Layño AMA, Castro GD, Castro JA. Alcohol induction of liver nuclear ethanol and N-nitrosodimethylamine metabolism to reactive metabolites. *Teratog Carcinog Mutagen* 2002; 22: 139-45.
45. Díaz Gómez MI, Fanelli SL, Delgado de Layño AMA, Castro JA, Castro GD. Liver nuclear and microsomal CYP2E1-mediated metabolism of xenobiotics in rats chronically drinking an alcohol-containing liquid diet. *Toxicol Ind Health* 2006; 22: 367-74.
46. IUTOX. History of IUTOX. International Union of Toxicology, 1977-2007. <http://www.iutox.org/downloads/HistoricalNotes2007.pdf>. (Fecha de acceso 20 de febrero de 2015).