

Instituto de Química-Física «Rocasolano»  
Consejo Superior Investigaciones Científicas  
Madrid

## Contribución al estudio de las propiedades radioprotectoras del 2-mercaptobenzotiazol

por

M.<sup>a</sup> C. López Zumel,\* Y. Bernard y R. Rinaldi\*\*

(Recibido para publicar el 8 de julio de 1964)

Siendo ya conocidas y estudiadas por PORA y POP (8) algunas de las propiedades radioprotectoras del mercaptobenzotiazol (MBT), el objeto de este trabajo es el siguiente:

1.º Determinar el valor de la actividad radioprotectora de este compuesto en condiciones experimentales bien precisas a fin de compararla con la de otros compuestos heterocíclicos estudiados en las mismas condiciones por RINALDI y BERNARD (9, 10). Para ello, una vez calculada la toxicidad del MBT, se ha determinado por una parte, los porcentajes de supervivencia en función de la dosis de radiación y por otra, analizado *in vitro* la actividad radioprotectora de este compuesto, sobre una solución de bilirrubina irradiada.

2.º Precisar algunos puntos que puedan aportar datos de utilidad con relación al mecanismo de acción de este radioprotector *in vivo*, para lo cual se ha estudiado en ratones la hipotermia provocada por el compuesto y se ha seguido su distribución en el organismo, empleando un método autoradiográfico des-

pués de administrar el MBT marcado con S<sup>35</sup>.

Para la exposición de este trabajo, agrupamos las experiencias en dos capítulos, uno referente al estudio de la radioprotección *in vivo* y otro al de la radioprotección *in vitro*.

### A) RADIOPROTECCION *IN VIVO*

En esta serie de experiencias se ha estudiado sucesivamente la toxicidad del producto, la actividad radioprotectora, la distribución en el organismo y la acción hipotermizante del mercaptobenzotiazol.

Todos los ensayos *in vivo*, se han efectuado con una suspensión de MBT en aceite de oliva, al no encontrarse ninguna solución utilizable del producto, pues de los numerosos solventes ensayados, unos fueron descartados por su débil poder disolvente y otros por su

\* Lab. de Radiobiología, Instituto de Química-Física, Serrano, 119-MADRID.

\*\* Lab. Radiobiologie (Pr. R. RINALDI) du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, B. P. 269 (Isère) - FRANCE.

gran toxicidad en soluciones concentradas. Los animales utilizados son ratones adultos C<sub>3</sub>H/Jax, procedentes de un centro de selección del laboratorio, a los cuales se les administró la suspensión del MBT por vía intraperitoneal.

### I. TEST DE TOXICIDAD.

La toxicidad del producto se manifiesta principalmente por crisis convulsivas que comienzan a los pocos minutos después de la inyección y conducen, en dosis altas del producto, a la muerte del animal.

Cuando se administra una dosis tóxica, la muerte sobreviene durante las primeras horas que siguen a la inyección, en caso contrario, los ratones que sobreviven son vigilados diariamente, durante un mes a fin de comprobar la ausencia de toxicidad diferida.

Para determinar la toxicidad aguda se utiliza el método de aproximaciones sucesivas descrito por DIXON y MOOD (2) y puesto a punto por KIMBALL y col. (4). Este ensayo permite calcular la dosis letal 50/30 días con un número reducido de animales (10 ratones) y una precisión que, según los autores es de 5 %.

La utilización de este ensayo nos ha llevado a obtener la cantidad de 0,75 mg/g de animal como dosis letal 50 % (DL 50) del MBT.

La dosis de MBT empleada como radioprotector es igual a la mitad de la DL<sub>50</sub>, lo que no provoca ninguna mortalidad en los animales, ya que la toxicidad del producto no parece modificarse por la influencia de la irradiación. Por otra parte, la mortalidad debida a la irradiación no se comienza a manifestar hasta transcurridos 5 ó 6 días, por lo que no puede confundirse con la mortalidad debida a la toxicidad del MBT que sobreviene en las primeras 24 horas.

### II. TEST DE RADIOPROTECCIÓN.

El ensayo escogido para poner rápida-

mente en evidencia la acción radioprotectora del compuesto consiste en determinar la disminución de mortalidad en los ratones tratados por el producto y sometidos a una irradiación mortal para todos los animales control.

#### a) Técnica

Los ratones C<sub>3</sub>H/Jax de unas 12 a 18 semanas de edad, se colocan durante la irradiación en una caja circular de plexiglass que contiene 10 compartimentos utilizables. Cinco de los ratones reciben una inyección intraperitoneal de la suspensión del producto a estudiar y los otros cinco son ratones control que han recibido por la misma vía una cantidad igual del solvente puro.

La administración de dosis letales de rayos X, se hizo con un generador de rayos X del tipo normalmente utilizado en radioterapia y que funciona a tensión continua de 180 kV, con una intensidad de 18 mA. Los animales se colocan a una distancia de 50 cm de la fuente, filtrada por una placa de cobre de 0,5 mm de espesor y en estas condiciones reciben una dosis de 80 roentgens por minuto, medido con un dosímetro Massiot-Philips. La caja que contiene los ratones se sitúa sobre un soporte giratorio, a fin de que la energía de los rayos se distribuya de una manera más homogénea.

Los animales, después de la irradiación, se meten en grupos de cinco en jaulas y se les mantiene en un régimen normal, vigilándolos diariamente durante un mes.

#### b) Experimentación.

La suspensión del MBT en aceite de oliva se ha utilizado a una concentración de 20 mg/ml y la dosis inyectada es de 0,38 mg/g de peso del ratón, lo que corresponde a la mitad de la DL<sub>50</sub>, anteriormente determinada. Los animales control se inyectaron con un volumen igual de aceite de oliva. En todos los

casos la inyección se ha realizado 30 minutos antes de la irradiación.

Se han administrado dosis de rayos X de 650, 700, 750, 850 y 950 roentgens. Estas dosis han provocado una mortalidad de 100 % en los animales control; por tanto, la supervivencia de los rato-

po transcurrido después de la irradiación y para las distintas dosis de la misma.

### III. ACCIÓN DEL MBT SOBRE LA TEMPERATURA RECTAL DE RATONES

Varios trabajos se han consagrado al estudio de la hipotermia considerada como un medio de protección contra las radiaciones, LIEBECQ MUTTER y col. (5) y también con el fin de explicar la acción de sustancias radioprotectoras. A pesar de que, en la mayoría de los casos, los resultados hayan mostrado que no se podía establecer paralelismo entre la radioprotección y la hipotermia provocada por los compuestos protectores, nosotros hemos intentado precisar este punto determinando la acción del MBT sobre la temperatura rectal de los ratones.

Para realizar esta experimentación, hemos utilizado un termómetro eléctrico (termómetro universal eléctrico tipo T. E. 3, Elektrolaboriet - Copenhague) equipado con sondas rectales R. M. 4, que permiten la determinación simultánea de las variaciones de temperatura de cinco animales.

Después de haber determinado la temperatura rectal de cada ratón se administra el MBT en las condiciones indicadas anteriormente y se mide a continuación la temperatura cada 5 minutos,

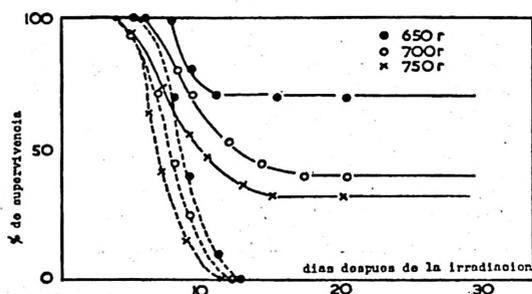


FIG. 1. Curvas de supervivencia de ratones control (- -) y protegidos (—) por MBT.

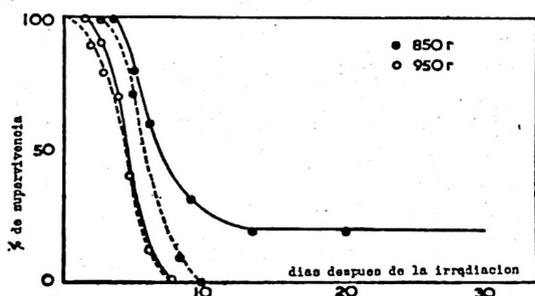


FIG. 2. Curvas de supervivencia de ratones control (- -) y protegidos (—) por MBT.

nes tratados al cabo de 30 días, sirve para valorar la acción radioprotectora del producto estudiado. En estas condiciones se ha obtenido, a las distintas dosis de rayos X, los siguientes porcentajes de supervivencia :

- el 70 % para una dosis de 650 R,
- el 35 % " " 700 R,
- el 32 % " " 750 R,
- el 20 % " " 850 R,
- el 0 % " " 950 R.

Las figuras 1 y 2 representan las curvas de supervivencia en función del tiempo

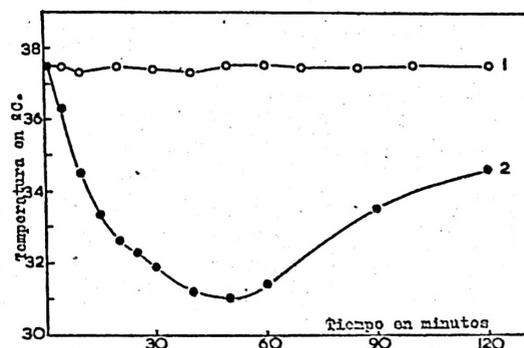


FIG. 3. Variación de la temperatura rectal del ratón después de la inyección del solvente (1) y del MBT (2).

durante la primera media hora y después cada 15 y 30 minutos durante el siguiente período de observación, que en el caso del MBT fue de 2 horas y media.

En los resultados obtenidos (fig. 3), hemos observado una caída progresiva de la temperatura, alcanzando el valor más bajo a los 50 minutos y que corresponde a una hipotermia de  $-7^{\circ}\text{C}$ ; a continuación la temperatura sube lentamente y se restablece la normal al cabo de 3 horas aproximadamente.

#### IV. ESTUDIO AUTORRADIOGRÁFICO DEL MBT EN EL ORGANISMO.

Este estudio se realiza con el MBT marcado con  $\text{S}^{35}$  cuya radiación beta permite la realización de autorradiogramas de buena calidad. La actividad del MBT- $\text{S}^{35}$  empleada es de 100  $\mu\text{c}$ . por ratón y se agrega la cantidad necesaria del MBT no marcado, hasta obtener la concentración habitual del producto. Se utiliza también en suspensión en aceite de oliva.

##### a) Técnica

La técnica empleada es la puesta a punto por PELLERIN (7). Consiste en congelar por inmersión en nitrógeno líquido ( $-195^{\circ}\text{C}$ ) los animales a quienes se ha administrado el compuesto radiactivo. Después de incluirlos en un bloque de parafina, se practica un corte por fresaje al nivel anatómico escogido (fig. 4).

A continuación, se coloca un film de rayos X contra esta preparación, la cual se mantiene constantemente a baja temperatura. Transcurrido el tiempo de exposición, se retira el film y se revela en condiciones normales de temperatura. La localización anatómica se facilita realizando una fotografía en color, directamente de la superficie del corte.

Para la fotografía en negro del autorradiograma hemos utilizado el método de *contacto*. Las zonas radiactivas aparecen en ésta en forma de manchas,

tanto más blancas cuanto más elevada sea la concentración del producto marcado.

En las condiciones de temperatura a que se opera, PELLERIN ha comprobado que la emulsión no sufre modificación alguna y que una exposición prolongada de la misma sobre bloques no radiactivos, en las mismas condiciones, no daba lugar a efectos pseudo-autorradiográficos.

Las ventajas de este método son :

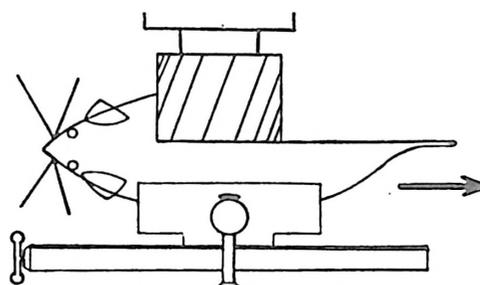


FIG. 4. Técnica del fresaje según Pellerin.

— una congelación del animal y su mantenimiento a una temperatura inferior a  $-120^{\circ}\text{C}$ , permiten estudiar la repartición del radioelemento en el mismo momento de la muerte del animal.

— la certeza total del bloqueo de las eventuales sustancias volatilizables o susceptibles de sublimarse en el congelador en el caso de una criodesecación.

— una localización topográfica cómoda del radioelemento en los diferentes planos de corte que se pueden practicar en una misma preparación.

##### b) Experimentación y resultados

Se han practicado los cortes de los ratones en dos planos diferentes para cada etapa estudiada; uno al nivel del riñón y otro al nivel de la columna vertebral.

Las diferentes etapas metabólicas estudiadas: 15, 30 y 60 minutos y 6 y 24 horas, nos han dado los siguientes resultados:

1) *Metabolismo de 15 minutos.*

El corte al nivel de la columna vertebral (fig. 5) muestra una zona peritoneal que retiene una gran parte del radioelemento; sin embargo, la difusión hacia el circuito sanguíneo es rápida y la cavidad cardíaca contiene más actividad que el miocardio. Una porción de la aorta descendente aparece igualmente en claro. Los tejidos hepáticos están ya, por tanto,

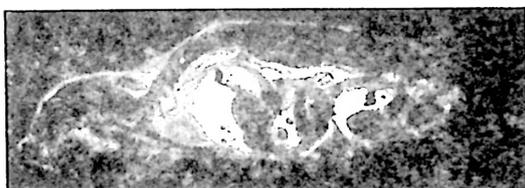


FIG. 5. Autorradiograma de ratón 15 minutos después de la inyección de MBT-S<sup>35</sup>. Corte al nivel de la columna vertebral.

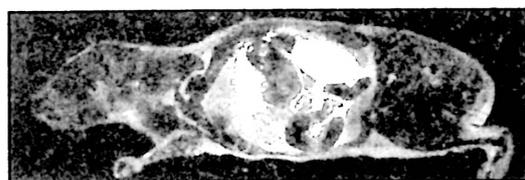


FIG. 6. Autorradiograma de ratón 15 minutos después de la inyección de MBT-S<sup>35</sup>. Corte a nivel del riñón.

fuertemente impregnados de radiactividad. Es también digno de destacar la ausencia total de radiactividad en el cerebro.

Un corte al nivel del riñón (fig. 6) pone en evidencia una concentración ya muy fuerte del MBT-S<sup>35</sup> en este órgano. La eliminación del producto es, por tanto, rápida y se efectúa, parece ser, esencialmente por vía urinaria.

2) *Metabolismo de 30 y 60 minutos.*

La repartición de la actividad es semejante a la descrita anteriormente, con la exclusión de la zona peritoneal que sólo

se encuentra débilmente radiactiva. Al cabo de una hora, una parte ya importante del radioelemento parece estar eliminada.

3) *Metabolismo de 6 horas y 24 horas.*

A partir de la sexta hora queda ya muy poca cantidad de producto marcado, el cual aparece totalmente eliminado a las 24 horas.

B) *RADIOPROTECCION IN VITRO*

La prueba de radioprotección *in vitro* consiste en comparar las densidades ópticas de soluciones de una sustancia coloreada y de dicha sustancia más el compuesto a estudiar, sometidas todas a diversas dosis de irradiación. Las sustancias utilizadas son, generalmente, la hemina, GOMES OLIVEIRA y col (3), la bilirrubina y biliverdina, BARAC y col. (1) y la protoporfirina, MYERS y col. (6), y se sigue su degradación por espectrofotometría.

Se trabaja normalmente, a las longitudes de onda para las que el compuesto a analizar presente el máximo de absorción, por lo que se ha estudiado previamente la absorción propia de las soluciones de MBT a la concentración utili-

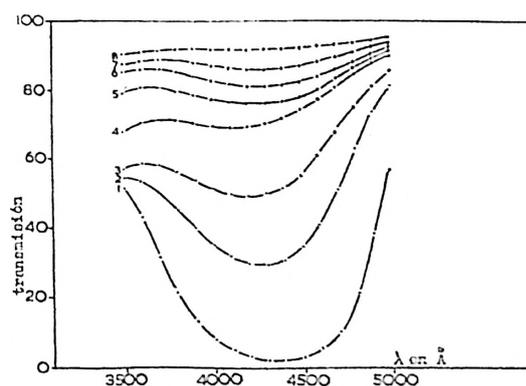


FIG. 7. Espectros de soluciones de Bilirrubina no irradiada (1) e irradiada a  $2,25 \times 10^4$  (2),  $4,5 \times 10^4$  (3),  $9 \times 10^4$  (4),  $18 \times 10^4$  (5),  $27 \times 10^4$  (6),  $36 \times 10^4$  (7) y  $45 \times 10^4$  R (8).

zada. Esta, que es débil para una solución no irradiada, aumenta con la irradiación y este aumento es más elevado a 3900 Å, máximo de absorción de la hemina que a 4300 Å que es la longitud de onda correspondiente al máximo de la bilirrubina.

Se han estudiado, además, los espectros

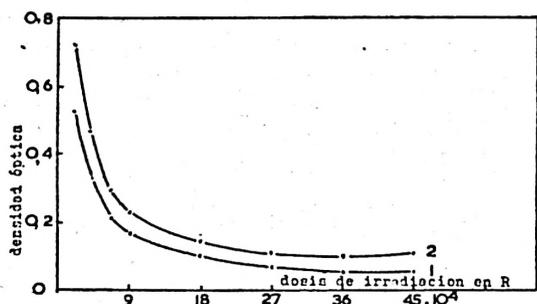


FIG. 8. Variación de las densidades ópticas de soluciones de Bilirrubina (1) y de Bilirrubina en presencia de MBT (2), a 4.300 Å.

de las soluciones de hemina y bilirrubina antes y después de la irradiación, a dosis comprendidas entre  $9 \times 10^4$  y  $45 \times 10^4$  R, con lo que se ha puesto en evidencia que la bilirrubina es mucho más sensible a la irradiación que la hemina, así después de  $9 \times 10^4$  R, no se encuentra más que el 10 % de la densidad óptica inicial de la bilirrubina, mientras que de la hemina hay aún un 55 %.

La figura 7 muestra los espectros de transmisión de una solución de bilirrubina para diferentes dosis de irradiación.

Estos resultados nos han llevado a estudiar la protección que el MBT pudiera producir sobre una solución de bilirrubina en el momento de la irradiación.

Las concentraciones utilizadas son  $3 \cdot 10^{-3}$  M en NaOH N/100 para el MBT y 20 mg/l para la bilirrubina.

El emisor de rayos X que se ha empleado en estas experiencias es un baltógrafo de 5 a 50 kV y 35 mA, equipado de un tubo OEG 60 con ventana axial de berilio, trabajando a una tensión de 43 kV

y 30 mA de intensidad. Las soluciones se colocan en una cápsula de 4 cm. de diámetro, de fondo plano, se utilizan volúmenes de 2 ml. y la geometría de la muestra es la exigida por la débil penetración de los rayos X blandos. La distancia entre la cápsula y la ventana es de 4,5 cm. y en estas condiciones experimentales la velocidad media de irradiación es de 90.000 R/min.

La figura 8 que representa las curvas indicativas de la degradación de la bilirrubina sola y de la bilirrubina en presencia del MBT, nos muestra claramente que no se ha manifestado ninguna protección del MBT sobre la bilirrubina, ya que su degradación es prácticamente la misma en ambos casos.

### Conclusiones

Nuestras experiencias sobre las propiedades radioprotectoras del mercapto-benzotiazol nos han permitido confirmar su acción *in vivo*. En efecto, después de una irradiación mortal para todos los animales control, este compuesto administrado a una dosis igual a la mitad de la DL<sub>50</sub> de toxicidad, produce una supervivencia del 70 % en los animales tratados. Sin embargo, este porcentaje disminuye rápidamente al aumentar la dosis de rayos X.

En los experimentos *in vitro* frente a una solución de bilirrubina irradiada, ningún efecto radioprotector se ha puesto en evidencia.

La variación de la temperatura rectal de los ratones, provocada por el MBT, se manifiesta importante y pasa por un máximo a los 50 minutos después de la inyección.

El estudio autoradiográfico de la distribución del compuesto marcado con S<sup>35</sup>, en los animales, nos ha mostrado que el producto se difunde rápidamente en la circulación sanguínea, sin fijación preferencial en ningún órgano y se elimina totalmente en 24 horas.

### Resumen

Para precisar las propiedades radioprotectoras del 2-mercaptobenzotiazol (MBT), los autores han estudiado:

a) Radioprotección debida al producto, su distribución en los tejidos y la hipotermia que provoca en el ratón.

b) Radioprotección *in vitro* frente a una solución de bilirrubina.

Los resultados confirman una supervivencia del 70 % de los animales y muestran que el MBT es inactivo *in vitro*. Se ha podido comprobar una rápida difusión del producto y su eliminación total en 24 horas así como una hipotermia importante 50 min. después de su administración.

### Summary

#### Contribution to the study of the radioprotective properties of 2-mercaptobenzothiazol

In order to know the radioprotective properties of the 2-mercaptobenzothiazole (MBT) under specific conditions, the authors have studied the following:

a) Radioprotection due to the substance, its distribution in the tissues and the hypothermy incited to the mice.

b) Radioprotection «in vitro» against a bilirrubine solution.

Results confirm a survival of 70 % of the animals, and show that MBT is inac-

tive «in vitro». The authors have found a fast diffusion of the substance and its complete elimination in 24 hours, as well as an important hypothermy 50 minutes after the injection.

### Bibliografía

- (1) BARAC, G., BEAUMARIAGE, M. L., CUVÉLIER, C. y NOTAY, W.: *Arch. Int. Pharm.*, **CXXXI**, 239, 1961.
- (2) DIXON y MOOD, A. M.: *J. Am. Stat. Assoc.*, **43**, 109, 1948.
- (3) GOMES OLIVEIRA, M., BEAUMARIAGE, M. L., CUVÉLIER, C., NOTAY, W. y BARAC, G.: *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **CXXXI**, 236, 1961.
- (4) KIMBALL, A. W., BURNETT, W. T. y DOHERTY, D. G.: *Rad. Res.*, **7**, 1, 1957.
- (5) LIEBECQ-MUTTER, S. y BACQ, Z. M.: *Arch. Int. Physiol. Bioch.*, **66**, 469, 1958.
- (6) MYERS, S., ROTHSCHILD, M. L., KERSTEN, M. y COSI, L.: *Rad. Res.*, **11**, 761, 1959.
- (7) PELLERIN, P.: *Path. Biol.*, **9**, 233, 1961.
- (8) PORA, A. E. y POP, M.: *Proc. 2nd United Nat. Internat. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy*, **23**, 49, 1958.
- (9) RINALDI, R. y BERNARD, Y.: *3eme Congrès International d'Hygiène et de Médecine Préventive, Vienne, 27-30 mai. Rapport C.E.A. n.º 2207*, 1962.
- (10) RINALDI, R. y BERNARD, Y.: *Ist. International Symposium on radiosensitizers and radioprotective drugs. Milán, 22 may, 1964.*

