

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

00346 7

24.

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO GENÓTOXICO DE TRES COMPUESTOS
ANÁLOGOS AL METRONIDAZOL EN CULTIVO DE
LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA
CON Y SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA CELULAR)
P R E S E N T A :
S A R A M E L C H O R C A S T R O

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO

MÉXICO, D.F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

25-9995



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico este pequeño logro a:

La fuerza del espacio, por darme su gran compañía, ayuda, amor, paciencia y fortaleza, para lograr esta meta: DIOS

Los constructores de mi ser: MIS PADRES

Sr. Pablo Melchor Rodríguez

Sra. Inés Castro de Melchor

con cariño y agradecimiento por enseñarme a caminar con los pies y con el alma y por hacer de mi lo que soy.

A MIS HERMANOS:

PABLO Y ELDA

con profundo amor y agradecimiento por su gran apoyo e invaluable ayuda para alcanzar esta meta.

A quienes tienen su alma junto a la mía: MIS AMIGOS

Fam. Cerón Bautista

Fam. Poyato Sánchez

Fam. Huerta Villegas

LAE. Rosalia Nuñez González

C.D. Jacqueline Huerta Vicarte y Fam.

Dra. Cristina Piña Barba

Z.F.B Olivia Cruz Ronquillo

Biól. Benito Palma Cortés

Biól. Rosa Y. Quiroz Vázquez

*A mis compañeros de laboratorio: Sofia, Ma. Elena, Ana Rosa,
Josefina, Miguel Angel, Omar, Zenaida, Yooko, Bibiana
Claudia, Claudio, Ericka, Miguel, Katy y la Sra. Emma.*

Al personal del CCA:

Sra. Ma. Teresa Vásquez Carmona

Sra. Amalia Maldonado Alonso

Secretaria: Maria Elena Castillo Sierra

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de tesis, Dra. Sandra Gómez Arroyo, por su acertada dirección en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini, por la revisión y comentarios hechos a la presente investigación.

A las profesoras:

Dra. Estela Meléndez Camargo

M. en C. Ma. Elena Campos Aldrete

les doy profundamente las gracias por haberme apoyado en esta investigación mediante sus consejos, sugerencias y por la donación de los compuestos químicos.

Asimismo le doy las gracias a la Z.F.B Rosa Patricia Cerón Bautista, por asesorarme a nivel químico y biológico para la integración de este trabajo.

A mis sinodales:

Dra. Ma. Estela Meléndez Camargo

Dra. Regina Montero Montoya

Dra. Patricia Ramos Morales

M. en C. Ma. Elena Campos Aldrete

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Dr. Fabio A. Salamanca Gómez

Dra. Sandra Gómez Arroyo

por su revisión crítica y sugerencias para la culminación de este trabajo, formando parte de mi jurado.

ÍNDICE

RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
1.0 Metronidazol (MTZ)	5
1.1 Propiedades farmacológicas	5
1.2 Propiedades fisicoquímicas	6
1.3 Farmacocinética	7
1.3.1 Absorción	7
1.3.2 Eliminación	7
1.4. Metabolismo en mamíferos	8
1.5. Metabolismo en microorganismos	11
1.6. Efectos colaterales	13
1.7. Genotoxicidad	14
1.7.1 Daño al ADN	14
1.7.2 Mutaciones en bacterias	16
1.7.3 Mutagenicidad en células de mamíferos	17
1.8. Carcinogenicidad en animales	18
1.9. Carcinogenicidad en humanos	18
2.0. Propiedades generales de los análogos al MTZ	20
3.0. Sistemas de pruebas para evaluar genotoxicidad	23
3.1. Linfocitos humanos	24
3.2. Intercambios de cromátidas hermanas (ICH)	25
3.3. Cinética de proliferación celular (CPC)	32
3.4. Mitomicina C y Ciclofosfamida	37
3.5. Metabolismo de mamíferos	38
II. HIPÓTESIS .	43
III. OBJETIVOS	43

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.1. Preparación de soluciones	44
4.2. Cultivo de linfocitos	44
4.2.1 Sin activación metabólica	44
4.2.2 Adición de la mitomicina C en ausencia de la fracción S9	45
4.2.3 Cosecha y Tinción diferencial	45
4.2.4 Con activación metabólica	47
4.2.4.1 Extracto S9 .	47
4.2.4.2 Mezcla S9	48
4.2.4.3 Adición de la ciclofosfamida (CP) en presencia y ausencia de la fracción S9	49
4.2.4.4 Análisis estadístico	49
V. RESULTADOS	50
VI. DISCUSIÓN .	54
VII. CONCLUSIONES	61
VIII. REFERENCIAS	62

RESUMEN

El metronidazol (MTZ) (flagyl; 1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol) y otros derivados de nitroimidazoles han sido usados ampliamente para tratar infecciones causadas por protozoarios y bacterias anaeróbicas. Sin embargo, la demostración de su mutagenicidad en bacterias y carcinogenicidad en ratones ha obligado la búsqueda de nuevos derivados que muestren una actividad semejante pero con menor toxicidad para el ser humano. Con este propósito se sintetizaron tres análogos al MTZ: 1-(p-metilfenacil-2-metil-5-nitroimidazol (A), 1-(p-metoxifenacil-2-metil-5-nitroimidazol (B) y 1-(p-flúorfenacil-2-metil-5-nitroimidazol (C), los cuales mostraron mayor eficacia contra *E. histolytica* con concentraciones menores (0.5-2 µg/mL) que las usadas con MTZ (3-6 µg/mL). Por tal motivo, en este trabajo se investigó el efecto genotóxico del MTZ y sus 3 análogos en cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica con y sin activación metabólica *in vitro*, mediante el análisis de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), cinética de proliferación celular (CPC) y los índices de replicación y mitótico (IR e IM).

Con la finalidad de tener la certeza de que los cultivos de linfocitos estuvieron adecuadamente manejados tanto con como sin activación metabólica se utilizaron como testigos positivos la mitomicina C (mutágeno directo) y la ciclofosfamida (mutágeno indirecto), los cuales demostraron que inducen incrementos significativos en la frecuencia de ICH a concentraciones de 1×10^{-7} M y 4×10^{-6} M, respectivamente.

El MTZ y sus 3 análogos disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), fueron probados en concentraciones de 2.92×10^{-6} hasta 6.25×10^{-4} M que correspondieron a 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 16.0 y 30 µg/mL. Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas en la frecuencia de ICH con respecto al testigo en presencia y en ausencia de la mezcla S9.

Con activación metabólica solo se incrementó significativamente la CPC e IR tanto para el MTZ como para los compuestos **A**, **B** y **C** a partir de las dosis 5.84×10^{-6} a 1.75×10^{-4} M (1 a 30 $\mu\text{g/mL}$), 8.13×10^{-6} a 1.22×10^{-4} M (2 a 30 $\mu\text{g/mL}$), 1.91×10^{-5} a 1.15×10^{-4} M (5 a 30 $\mu\text{g/mL}$) y 6.4×10^{-4} a 1.2×10^{-4} M (16 a 30 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Por lo tanto, con estos datos se puede concluir que el MTZ induce daño sobre la CPC en linfocitos humanos en concentraciones terapéuticas (3-6 $\mu\text{g/mL}$) y que los análogos **A**, **B** y **C** solo causan efecto por arriba de las dosis usuales, 2-30, 5-30 y 10-30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Con relación al IM, no se observaron alteraciones sin activación metabólica, mientras que en presencia de la mezcla S9 se manifestó inhibición con el MTZ y con el compuesto **B** en las concentraciones 1.75×10^{-4} M para el primero y 3.82×10^{-5} a 1.5×10^{-4} M, para el segundo.

Por medio del análisis cuantitativo de relación-actividad (estudio de la actividad biológica de los compuestos con base en su estructura molecular y/o propiedades fisicoquímicas) realizado por Campos *et al.* (1995) y junto con los resultados obtenidos en este trabajo se confirma que los 3 análogos al MTZ modificaron su toxicidad con respecto a la del MTZ por:

- a) los tipos de sustituyentes que favorecieron la actividad biológica debido al movimiento de electrones en las moléculas de los análogos,
- b) los grupos de mayor tamaño que aportaron un efecto estérico
- c) los productos obtenidos de la fragmentación ya que son diferentes con relación al MTZ.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos decenios se ha registrado un enorme auge en el empleo de productos químicos con una gran variedad de actividades farmacológicas. Aunque es evidente que estos han participado en el mejoramiento de las condiciones de vida, también se ha puesto de manifiesto que originan algunos efectos adversos en la población.

Recientemente han aparecido publicaciones científicas que señalan el hecho de que diversos fármacos que tienen acción sobre diferentes parásitos del hombre como protozoarios y helmintos, son capaces de inducir cáncer, teratogénesis o cambios genéticos en distintos sistemas biológicos (Cantelli-Forti *et al.* 1983, Declerck y De Ranter 1987).

En México el estudio de los medicamentos antiparasitarios es importante por su repercusión en la salud, ya que sus consecuencias han sido solo parcial e insuficientemente analizadas a pesar de su uso generalizado sobre todo en niños y en jóvenes. Las enfermedades parasitarias y en particular las ocasionadas por amibas y helmintos constituyen un problema de salud pública ya que su origen está en la naturaleza del suelo, en las condiciones geográficas, en las situaciones de vivienda y en la contaminación fecal del ambiente. El consumo de este tipo de sustancias es muy elevado y la misma persona puede recibir más de un tratamiento por año a causa de las reinfestaciones y en ciertos casos esto lo agrava la automedicación (Biagi 1988).

Los fármacos amebicidas y antihelmínticos hasta ahora no han sido objeto de investigaciones sistemáticas en nuestro país para determinar su acción, especialmente en pacientes desnutridos o que presenten sus funciones alteradas

como consecuencia de la enfermedad, por lo que se desconoce su farmacocinética en tales condiciones.

El metronidazol (Fig.1) es un importante medicamento para los tratamientos de varias enfermedades por protozoarios, así como para infecciones por bacterias anaeróbicas (Cossar y Julou 1959, Goldring *et al.* 1975, Tally *et al.* 1975). Sin embargo, se han descrito efectos adversos indeseables siendo críticos en algunos casos. Por ejemplo, alteraciones neurológicas provocadas por la interacción del fármaco con el sistema nervioso central, trastornos en el ritmo cardíaco debido a la quelación que realiza este compuesto con los iones calcio, asimismo se ha demostrado que incrementa significativamente ciertos tumores en roedores y es mutagénico en cultivos bacterianos (Edwards y Matheson 1970, Rustia y Shubik 1972, Rosenkranz y Speck 1975, Connor *et al.* 1977, Roweley *et al.* 1980).

Debido a que el metronidazol (MTZ) se ha demostrado que es tóxico en diferentes sistemas de prueba y aún en individuos bajo tratamiento (Elizondo *et al.* 1994), resulta importante hacer nuevos medicamentos que reúnan los elementos estructurales que muestren una actividad semejante pero con menor toxicidad para el hombre.

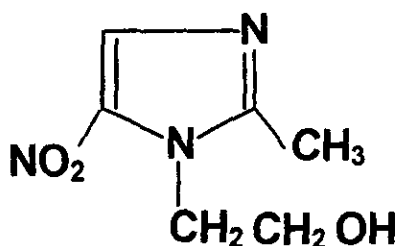


Fig.1 Estructura química de 1-(2-hidroxietil)-2-metil 5-nitroimidazol
(Metronidazol)

Con este propósito, fueron preparados los compuestos 1-(p-metilfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (**A**), 1-(p-metoxifenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (**B**) y 1-(p-flúorfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (**C**) (Fig. 2). Este grupo de cetonas fueron sintetizadas en el laboratorio de Química Orgánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN por la M. en C. María Elena Campos.

Debido a lo anterior debe señalarse que se requiere del análisis de la relación entre el riesgo y el beneficio que representa cada compuesto antes de salir al mercado, para fundamentar los criterios sobre el control de su producción y consumo. Por tal motivo, el objetivo fundamental de este trabajo es verificar si estos compuestos análogos al MTZ tienen efectos genotóxicos y citotóxicos, utilizando un sistema biológico de prueba, como es el cultivo de linfocitos humanos con y sin activación metabólica mediante el intercambio de cromátidas hermanas, la cinética de proliferación celular y el índice mitótico.

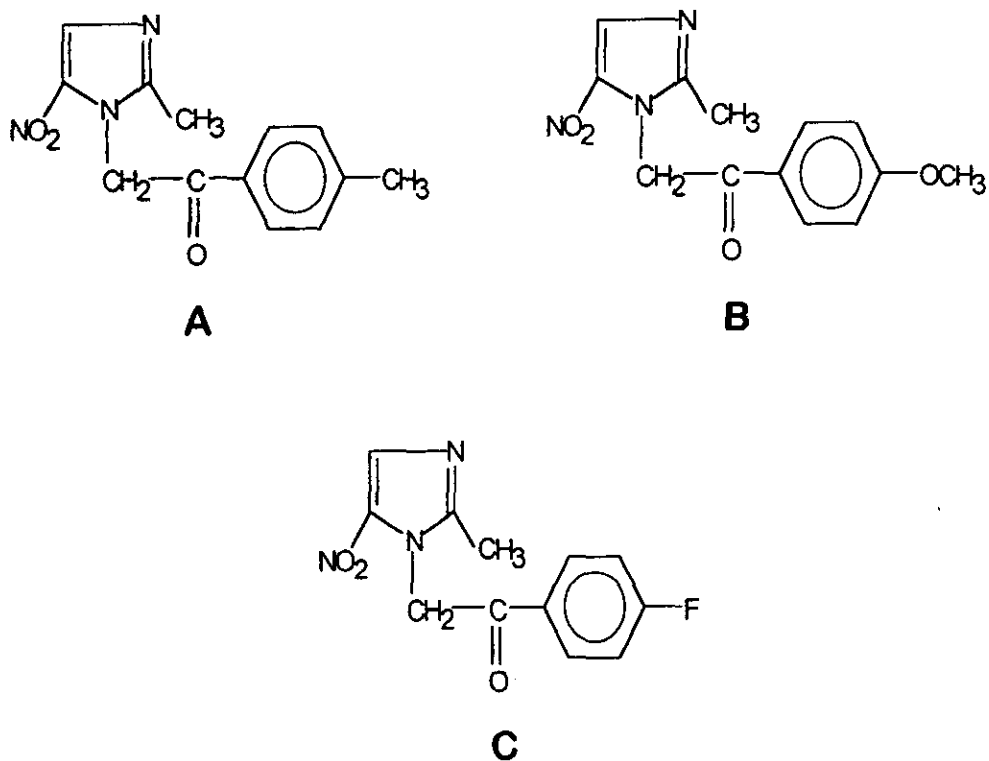


Fig. 2 Estructuras de los compuestos: 1-(p-metilfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (**A**), 1-(p-metoxifenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (**B**) y 1-(p-flúorfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (**C**).

II. ANTECEDENTES

1.0 METRONIDAZOL (MTZ)

1.1 Propiedades farmacológicas

El MTZ, cuyo nombre químico es: 1-(2- hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol fue introducido en 1959 para el tratamiento de *Trichomona vaginalis* (Cossar y Julou 1959) y aprobado por los Estados Unidos de América en 1971 para tratar *Entamoeba histolytica* (Powell *et al.* 1966, Meyers *et al.* 1978) y *Giardia lamblia* (Khambatta 1971). También es empleado como agente quimioterapéutico debido a su efecto específico en bacterias anaeróbicas (Tally *et al.* 1975) y se ha propuesto como un fármaco citotóxico y radiosensible específicamente para células tumorales hipóxicas (Stone y Whithers 1974, Willson *et al.* 1974, Foster *et al.* 1976). Se ha notado que su uso aumenta la efectividad de la radiación ionizante durante la radioterapia de pacientes con ciertos tipos de tumores (Andersson 1981).

El MTZ y sus derivados son ahora medicamentos usados para el tratamiento de abscesos a nivel cerebral, pulmonar e intrabdominal, sinusitis crónica y otitis, infecciones estomatológicas y del órgano reproductor femenino, casos de osteomielitis y en la profilaxis de infecciones anaeróbicas (Dobiás *et al.* 1994). Este compuesto representa el componente activo de gran cantidad de formulaciones disponibles en el mercado bajo diferentes marcas registradas (Tabla I). Algo menos convencional es su uso en el tratamiento de alcohólicos, debido a su incompatibilidad con el etanol (IARC 1987) y en la industria cosmética como un ingrediente en ciertos tipos de preparaciones para piel.

Las cepas de *Tricomona vaginalis* mueren a una dosis de 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del fármaco en condiciones anaerobias y se necesitan concentraciones mayores en presencia de oxígeno, así como en el caso de cepas que han desarrollado resistencia (Lumsden et al. 1988). Los trofozoitos de *Giardia lamblia* también son afectados *in vitro* en forma directa por el MTZ en concentraciones de 1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Jokipii y Jokipii 1980).

Tabla I. Derivados 5-nitroimidazoles sintéticos.

R ₁	5-NITROIMIDAZOLES	R ₂	FÁRMACO
-CH ₂ CH ₂ OH -CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₂ CH ₂ -CH ₂ CH ₂ N $\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$ $\begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array}$ O -CH ₂ CHOHCH ₂ Cl -CH ₂ CHOHCH ₃ -CH ₂ CH ₂ NH-CS-OCH ₃		-CH ₃ -CH ₃ -H -CH ₃ -CH ₃ -CH ₃	Metronidazol Tinidazol Nimorazol Ornidazol Secnidazol Camidazol

1.2 Propiedades fisicoquímicas

El MTZ tiene peso molecular de 171; a pH fisiológico se encuentra en forma neutra y por lo tanto puede atravesar la membrana celular con facilidad. Los organismos sensibles a este fármaco son aquellos que contienen en su sistema bioquímico ferredoxinas o tipos de flavodoxinas, cuya característica es poseer un potencial de oxidorreducción capaz de reducir al grupo nitro del MTZ, lo que provoca que disminuya su concentración intracelular creando así un gradiente de concentración que incrementa el transporte y la producción de derivados que

ejercen una acción letal en la célula, por combinación con cierto tipo de macromoléculas que influyen en algunas funciones celulares (Reynolds 1989).

1.3 Farmacocinética

1.3.1. Absorción

Se administra generalmente por vía oral. En el hombre, el MTZ se absorbe muy rápidamente y se distribuye en casi todos los tejidos del cuerpo, incluyendo el sistema nervioso central (Bartlett 1981). Después de su administración con dosis única de 250 y 500 mg, es detectable en el suero humano 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, aproximadamente en 1 hora (Amon *et al.* 1981). La concentración efectiva media en el plasma es de 8 $\mu\text{g/ml}$ o menos para la mayor parte de protozoarios y bacterias susceptibles. Por lo menos el 20% se une a las proteínas del plasma (Andersson 1981).

Penetra en la barrera de los fluidos cerebrales y cerebroespinales (Jokipii *et al.* 1977) y puede encontrarse en el órgano reproductor femenino (Mannisto *et al.* 1984), en humores acuosos (Mattila *et al.* 1983), en glándulas de la próstata y en vesículas seminales (Tu *et al.* 1990).

1.3.2. Eliminación

Es excretado principalmente por vía renal, la mayoría en forma de metabolitos, glucurónidos y acetilados. Su vida media de eliminación varía entre 6 y 12 horas, con un promedio de casi 8 horas. Cerca del 80% de los compuestos son expulsados después de la hidroxilación a hidroximetronidazol (Loft 1990). Del 6 al 15% es excretado en las heces (Rosenblatt y Edson 1983), particularmente como

metabolito activo 1-(2- hidroxietil)-2-carboxil-5-nitroimidazol (Andre *et al.* 1968). Su presencia también es detectable en secreciones vaginales, fluidos seminales, bilis, saliva, sudor (Mohtashampur y Norpoth 1986) y a través de las glándulas mamarias (Gray *et al.* 1961) con vida media de casi 9 horas (Erickson *et al.* 1981).

1.4. Metabolismo en mamíferos

En mamíferos los procesos metabólicos oxidante y reductor están presentes. La vía metabólica predominante para las cadenas alifáticas del MTZ es por oxidación, principalmente en el hígado. En el hombre, es metabolizado mediante el citocromo P-450 por oxidación a un metabolito hidroxil o ácido acético o por la subfamilias IA, IIB, IIC del P-450 y en algunos casos por IIIA (Loft 1990).

Los procesos de conjugación son menos frecuentes. En ratones los mismos metabolitos se forman por glucuronidación, la más importante ruta del metabolismo (Ralph 1983, Loft *et al.* 1986). Cantelli-Forti *et al.* (1983) han mostrado que la actividad enzimática del sistema monooxigenasa disminuye significativamente después de repetirse la administración en ratones.

El compuesto 1-(2-hidroxietil)-hidroximetil-5-nitroimidazol ha sido identificado como el principal metabolito urinario. Sus intermediarios junto con otros dos que contienen el grupo nitro intacto, por ejemplo, 2-metil-5-nitroimidazol-1-il ácido acético y 1-(2-hidroxietil)-2-carboxil-5-nitroimidazol, constituyen el 97% de los metabolitos urinarios del MTZ (Templeton 1977).

El efecto terapéutico de compuestos nitroheterocíclicos va unido al mecanismo de reducción enzimática o a la química del grupo nitro. Las enzimas involucradas

en la reducción del grupo nitro de estos compuestos en mamíferos son las flavoproteínas, como NADPH-citocromo c (P-450)-reductasa, xantina-oxidoreductasa, aldehído-oxidasa, entre otras (Amon *et al.* 1981, Kedderis y Miwa 1988). Inicialmente los procesos enzimáticos se caracterizan por la reducción de un electrón del grupo nitro ($R-NO_2$) acompañado de la formación de radicales aniónicos (Kedderis y Miwa 1988). La reducción del mono-electrón puede tener varias etapas para la constitución de heterocíclicos intermedios que contienen un grupo nitroso ($R-NO$) en su estructura molecular, que pueden reducirse fuertemente a hidroxilamina ($R-NHOH$) y a una amina primaria ($R-NH_2$) (Ings *et al.* 1974, Willson *et al.* 1974, Müller 1981). Es evidente que el efecto tóxico de los metabolitos nitroheterocíclicos es dependiente de las condiciones de reacción durante la reducción del grupo nitro (Fig. 3). El reactivo intermedio que probablemente actúa como co-participante en la formación de una unión covalente entre el MTZ y los biopolímeros nucleofílicos de las células, es un metabolito con un grupo hidroxilamina (Edwards *et al.* 1980, Kedderis y Miwa 1988) que se origina en la última etapa de la reducción enzimática del grupo nitro del MTZ. Como reactivos intermedios se forman hidroxilaminas orgánicas por la reducción enzimática de nitratos o nitritos, producto normal del metabolismo celular. Estas hidroxilaminas reaccionan con biopolímeros nucleofílicos, por ejemplo, el ADN (Bautz -Freese 1964).

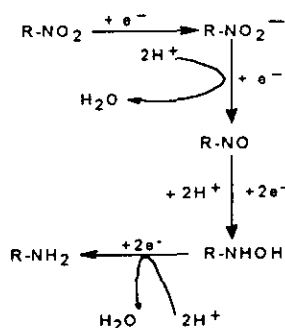


Fig.3 Proceso de reducción del grupo nitro de las moléculas del MTZ.

La toxicidad del MTZ es muy selectiva debido a la fácil reducción del grupo nitro sin una subsecuente reoxidación con oxígeno. Experimentos en ratas han mostrado que el grupo hidroxietil presente en la posición N₁ del MTZ promueve la conjugación del compuesto con ácido glucurónico, facilitando una precondición de circulación enterohepática en mamíferos (Wood y Monro 1975, Andersson 1981). Sin embargo, ha fallado el intento de identificar al metabolito responsable de la toxicidad.

Se considera que el radical anión-nitro (R-NO₂) del MTZ formado por la reducción del electrón del grupo nitro no reacciona con los centros nucleofílicos de la célula. Sin embargo, se sugiere que la actividad biológica del MTZ es influenciada por metabolitos que contienen un grupo hidroxilamina (Ings *et al.* 1974).

El grado de daño en el ADN depende de la velocidad de reducción del fármaco (Zahoor *et al.* 1987); cuando es lenta produce mayor alteración que la rápida, por ejemplo: MTZ > ornidazol > azomicin > misonidazol > bensnidazol.

La acción del nitroimidazol reducido sobre el ADN causa rompimientos de hebras y desestabilización de la hélice, permitiendo la formación de regiones de hebras sencillas. Este daño depende de la naturaleza del fármaco y de la variación de la composición de bases, en particular del contenido de adenina más timina (A + T). Esto sugiere que la citotoxicidad sobre el ADN no involucra rompimientos de hebras al azar sino en un sitio específico en los residuos de A y T (Rowley *et al.* 1983, Zahoor *et al.* 1987). Cabe señalar que la relación entre el daño al ADN y el contenido de A+T es un factor que contribuye a la toxicidad selectiva de este fármaco hacia infecciones causadas por anaerobios; los protozoarios *Tricomona vaginalis* y *Entamoeba histolytica* que tienen un contenido de A+T de 71% y 62-78 %, respectivamente, son muy susceptibles al

MTZ; en contraste, *Rhodospirillum* y *Rhodopseudomonas* cuyo volumen de A+T es de 38.4 % y 33 %, respectivamente son aproximadamente 25 veces menos sensibles a los nitroimidazoles (Rowley *et al.* 1983).

Recientemente se identificó que el MTZ junto con otros nitroimidazoles causan rompimientos en las uniones de fosfodiéster cerca de los residuos de timina del ADN, lo que sugiere que el grado de daño está en relación con el contenido de A + T. También se ha observado la acción de algunos nitroimidazoles sobre el ARN en los residuos de uracilo, sugiriendo la especificidad del efecto tóxico en el anillo del uracilo y no en el grupo 5-metil de la timina (La Russo *et al.* 1977, Edwards *et al.* 1980, Knox *et al.* 1981, 1983).

1.5. Metabolismo en microorganismos

La toxicidad del MTZ para bacterias anaeróbicas y protozoarios es muy selectiva debido a la reducción del grupo nitro. Esta vía juega un papel importante en el metabolismo de los compuestos nitroheterocíclicos ya que va acompañada por el potencial de oxido-reducción de las ferredoxinas (Fig. 4). Como resultado se forma un producto reactivo necesario para el compuesto que llega a ser citotóxico (Müller 1981). El efecto citotóxico del MTZ se considera que resulta de la interacción de los compuestos o sus productos metabólicos con el DNA, RNA y proteínas por inhibición de la síntesis del ADN y procesos proteosintéticos en las células blanco (La Russo *et al.* 1977, Kedderis y Miwa 1988).

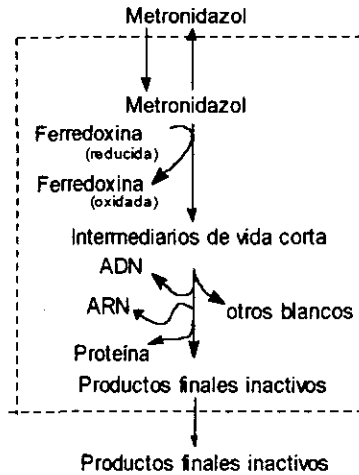


Fig. 4 Mecanismos de acción citotóxica del MTZ

Se sabe que la microflora intestinal del hombre posee una gran capacidad nitrorreductasa que influye tanto en la biotransformación y en la mutagenicidad como en el efecto biológico del MTZ (Rowland 1988).

Se ha descrito que el MTZ es primeramente convertido en un agente con reactividad elevada y en un derivado de hidroxilamina lábil al oxígeno. Esta formación es facilitada por las condiciones anaeróbicas en el colon. Los productos estables de la reacción de reducción se constituyen por la ruptura del anillo imidazol originando acetamida y N-(2-hidroxietil)-ácido oxámico (Koch y Goldman 1979). Pequeñas cantidades de ambos compuestos se han encontrado en las heces y en la orina de pacientes tratados con MTZ, pero no en las excretas de ratas libres de gérmenes (Koch et al. 1981).

El papel de la microflora intestinal ha sido confirmado por evidencias que muestran que la activación mutagénica del MTZ puede evitarse mediante el empleo de agentes antibacterianos. En ratones tratados con MTZ se observa que

se reduce el nivel de mutágenos derivados de este compuesto en más del 90 % al ser administrada una mezcla de agentes antibacterianos y el antioxidante butilato hidroxianisol (BHA), esto se refleja en los resultados del ensayo mediado por el huésped así como en la determinación de la mutagenicidad de la orina en las cepas TA98 y TA100. En contraste, al marcar la disminución en los niveles de metabolitos mutagénicos ni el BHA ni los compuestos antibacterianos administrados a largo plazo parecen afectar la actividad antitricomónica del MTZ *in vivo* (Bruckner *et al.* 1979). Sin embargo, todavía no hay evidencias de la ausencia de mutagenicidad entre el 5-nitroimidazol y la actividad antitricomónica.

Existen diferencias importantes entre la composición y la función metabólica de la flora intestinal que son evidentes entre varias especies de mamíferos y en el hombre. Como por ejemplo, la actividad nitrorreductasa de muestras fecales humanas es mucho más baja que la de los roedores de laboratorio (Rowland 1988) por lo que se espera que los compuestos nitro incluyendo el MTZ que dependen parcialmente de la reducción microbiana para su efecto mutagénico, sea menos potente para el hombre. Por otro lado, evidencias disponibles sugieren que el MTZ puede afectar el espectro de la flora intestinal al reducir la cantidad de microorganismos anaeróbicos y de esta manera no solo influir en la capacidad metabólica de la microflora sino también en su propio metabolismo (Roe 1983), que es también un factor importante, el cual se debe tomar en cuenta.

1.6 Efectos colaterales

El empleo de este fármaco que año tras año ha ampliado su espectro terapéutico, también ha enriquecido la lista de efectos adversos siendo entre los más comunes: náuseas, diarrea, cólico abdominal, dolor epigástrico y anorexia. La cefalea y el vómito son menos comunes. Pueden agravarse infecciones con monilia y aparecen glositis y estomatitis (Reynolds 1989).

Otros efectos son: urticaria, rubicundez, prurito, cistitis y opresión en la pelvis, sequedad en la boca, vagina y vulva. En una cantidad importante de pacientes se encuentra neutropenia que remite al suprimir el fármaco.

1.7. Genotoxicidad

1.7.1 Daño al ADN

Tanto el metronidazol como su principal metabolito, la forma hidroxilada, 1 hidroxietil-2-hidroximetil-5 nitroimidazol, son capaces de unirse al ADN (Edwards 1977, La Russo *et al.* 1977) e inducir síntesis no programada (Martelli *et al.* 1990). La inhibición de la síntesis del ADN es demostrada *in vivo* usando células de *Trichomonas vaginalis* (Ings *et al.* 1974) y el ADN de células bacterianas *Clostridium bifermentans* muestra señales de degradación después de la acción *in vivo* del MTZ (Knight *et al.* 1978).

Estudios realizados *in vitro* parecen indicar que la primera causa de daño al ADN por el MTZ es la formación de rompimientos de hebras sencilla y doble (Edwards 1977, Reitz *et al.* 1991). Por otro lado, La Russo *et al.* (1977) describen que el MTZ en su forma reducida es capaz de originar uniones covalentes en el ADN de células bacterianas, de mamíferos y en fagos. Cualquiera de estos dos mecanismos (unión covalente y degradación) pueden ser los responsables de la actividad citotóxica del MTZ *in vivo* (Edwards 1977, Edwards *et al.* 1980).

Las opiniones acerca del mecanismo que provoca las alteraciones al ADN por el MTZ tienden a variar. Sin embargo, una conclusión general es que su acción al estar en forma reducida causa rompimiento de la hebra y pérdida de la hélice del ADN (Knight *et al.* 1978), lo que conduce a la formación de huecos, principalmente en las hebras sencillas y el grado de este daño afectará la

complementariedad de las bases, específicamente en los fosfatos de timina (Edwards *et al.* 1980).

El fármaco químicamente reducido desestabiliza la hélice del ADN provocando la pérdida de la estructura de la hélice y rompimientos en sus cadenas. Esto puede resultar, por ejemplo, del deterioro del mecanismo de reparación. Uno de los casos reportados para explicar este fenómeno, es el daño a la doble cadena del ADN del bacteriofago θ X174, el cual se induce por el MTZ reducido y en *E. coli* no se repara el daño por medio del sistema de reparación por escisión. En la mayoría de los casos se espera que las lesiones por agentes químicos en el ADN puedan producir tanto rompimientos sencillos o de doble hebra, como la modificación de su estructura, originada como consecuencia de uniones covalentes. Para el caso de MTZ, existe otro tipo de interacción droga-ADN que no se puede excluir, la alteración de bases en el ADN por la acción de radicales libres (Edwards *et al.* 1980, Zahoor *et al.* 1987)).

Aunque la naturaleza química de los productos de reducción del MTZ, biológicamente activos no está clara, existe una suposición general de que el mecanismo involucrado es análogo al de los nitrofuranos y a la bleomicina (Knight *et al.* 1978, Dobiás *et al.* 1994): estas drogas son radiosensibilizadoras, rompen hebras de ADN y requieren de la reducción antes que ejerzan un efecto tóxico. El MTZ, cuando se usa en combinación con la radiación, funciona como un agente radiosensibilizador específicamente para células tumorales hipóxicas. Por otro lado, la exposición a la radiación y puede acelerar la reducción del MTZ activando mecanismos radiolíticos (Zahoor *et al.* 1987)

1.7.2 Mutaciones en bacterias

Se ha demostrado que este medicamento induce principalmente sustituciones de pares de bases en *Salmonella typhimurium* cepa TA100 (Chin *et al.* 1978, Cantelli-Forti *et al.* 1983). La mutagenicidad del MTZ, se ha expresado principalmente en ausencia de activación metabólica, a pesar del incremento reportado en el efecto mutagénico después de que se agrega la fracción S9 en las cepas TA100 (Galkiewicz *et al.* 1979) y TA1535 (Andersen *et al.* 1982). Esto parece indicar que las cepas de *Salmonella typhimurium* son capaces de transformar el MTZ a metabolitos mutagénicos debido a que poseen un sistema enzimático de nitrorreductasa capaz de activar el MTZ.

Cuando se usan cepas de *Salmonella typhimurium* deficientes de nitrorreductasa (TA100-FR1, TA100-NR3), la mutagenicidad solo se manifiesta en presencia de preparaciones microsómicas de hígado (Rosenkranz y Speck 1977) o la respuesta es muy reducida en comparación al fuerte incremento positivo de revertantes en la TA100 (Dayan *et al.* 1982). Estos resultados sugieren que las enzimas de hígado de mamíferos son capaces de catalizar la conversión de MTZ a mutágenos. Algunos autores (Rosenkranz y Speck 1975, Linmark y Müller 1976) han encontrado que el efecto mutagénico del MTZ en la cepa TA100 deficiente de nitrorreductasa solo se expresa en condiciones anaeróbicas.

La prueba de mutagenicidad sobre el corrimiento del marco de lectura en *Salmonella typhimurium* aporta datos negativos (Minnich *et al.* 1976, Dobiás 1980, Cantelli-Forti *et al.* 1983), aunque los dos últimos autores muestran que hay un incremento de más de dos veces en cepas revertantes TA1538 y TA98 con 350 µg/placa y 50 µg/placa, respectivamente.

La inducción de mutaciones puntuales ha sido confirmada en *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* K12 y WP2 *uvrA*⁻ y *Citrobacter freundii* 425 (Voogd *et al.* 1974, Chessin *et al.* 1978).

El MTZ también muestra actividad mutagénica en el cromosoma SOS de *Escherichia coli* K12 y Pq37 con y sin activación metabólica (Mamber *et al.* 1986, Dayan *et al.* 1987).

1.7.3 Mutagenicidad en células de mamíferos

Existe contradicción en la literatura sobre los efectos genotóxicos producidos por MTZ en mamíferos. En células intestinales de criceto chino tratado oralmente, se encuentra una frecuencia alta de intercambios de cromátidas hermanas (Neal y Probst 1984). Por el contrario, tanto el MTZ como sus metabolitos no inducen mutaciones génicas en linfocitos de mamíferos (Dayan *et al.* 1982), tampoco aberraciones cromosómicas (Lambert *et al.* 1979, Lambert y Lindblad 1980, Hartley-Asp *et al.* 1981) ni ICH (Lambert y Lindblad 1980, Mahood y Wilson 1981) en células humanas *in vitro*. Sin embargo, en estudios recientes realizados *in vitro* por Mudri *et al.* (1994), usando células CHO para el ensayo de anafase-telofase se observan puentes anafásicos y células tripolares. En cultivo de linfocitos se nota que la frecuencia de aberraciones cromosómicas y micronúcleos es significativamente mayor y en células de médula ósea de ratón *in vivo* también se demuestra que el MTZ provoca un incremento de micronúcleos.

En individuos bajo tratamiento con este medicamento se incrementa la cinética de proliferación celular y el índice de replicación (IR) en linfocitos de sangre periférica (Elizondo *et al.* 1994).

1.8 Carcinogenicidad en animales

Se ha descrito que induce tumores, fundamentalmente adenomas (tipo de tumor que aparece espontáneamente en muchas cepas de ratones), así como una proporción elevada de linfomas malignos en ratones suizos machos y hembras (Rustia y Shubik 1972).

Cavaliere *et al.* (1983), observan incremento de tumores pulmonares en machos y linfomas en hembras de ratones BALB/c que recibieron en su dieta una dosis de 2 mg/día durante 100 días.

1.9 Carcinogenicidad en humanos

Beard *et al.* (1979), no encuentran aumento significativo en la incidencia de cánceres en 771 mujeres tratadas con MTZ por tricomoniasis entre 1960 y 1969 y en 237 mujeres con la misma enfermedad pero no tratadas. En 2,460 personas que reciben por lo menos una prescripción de MTZ entre 1960 y 1973 y que han sido seguidas a través de 1976 por el programa Kaiser-Permanente (Friedman 1980), se diagnostican 45 casos de cáncer de 33.3 que se esperaban. El exceso es debido a las frecuencias de cáncer cérvico-uterino cuya asociación con vaginitis pudo explicarse por la pobre higiene sexual. Otro estudio realizado con 12,280 personas que tienen uno o más tratamientos de MTZ entre 1977 y 1979 no evidencia incremento de riesgo para seis tipos de cáncer evaluados (endometrio, testículos, tiroides, hígado, pecho y pulmón) (Danielson *et al.* 1982). Estos resultados negativos hacen suponer que el MTZ en dosis usuales (3-6 µg/mL) no causa cáncer en humanos, aunque la exposición en su mayor parte es de corta duración. Sin embargo, algunos autores opinan que para que un agente químico induzca cáncer, el intervalo entre la exposición y la primera aparición de un tumor

se espera que sea por lo menos de 20 a 25 años (Mirer y Silvertein 1980, citado por Dobiás *et al.* 1994).

Krause *et al.* (1985), reportan 3 casos de neoplasias malignas en individuos jóvenes tratados con dosis prolongadas de MTZ para la enfermedad de Crohn. Sin embargo, su asociación con la terapia es incierta, debido a que esta enfermedad por sí misma genera neoplasias.

La IARC (1987) categoriza al MTZ en el grupo 2B, que significa que posiblemente sea carcinogénico en humanos y está suficientemente probado en animales.

2.0 Propiedades generales de los análogos al MTZ

La actividad antiparasitaria del MTZ reside en el grupo **nitro**, el cual ocupa la posición 5 del imidazol. Esta es evidenciada por su mecanismo de acción a través de la eliminación del potencial reductor de microorganismos anaerobios. El grupo nitro es reducido en dos etapas durante las cuales captura cuatro electrones del ciclo metabólico e impide, en esta forma, el abastecimiento energético del microorganismo. Por esta razón dicho grupo farmacóforo (**grupo nitro**) se convierte en un elemento estructural indispensable en la elaboración de compuestos análogos al metronidazol (Pérez-Reyes *et al.* 1982)

En la primera etapa del proceso metabólico el grupo nitro es transformado en un reactivo intermedio parcialmente reducido (-NHOH) para posteriormente captar dos electrones más. Con este antecedente es posible disminuir la toxicidad si se integra un grupo parcialmente reducido al anillo heterocíclico (Breccia *et al.* 1982).

Otros requerimientos estructurales importantes para disminuir la toxicidad del metronidazol incluyen la presencia de un sustituyente **alquílico** en la posición **C-2** (metilo en este caso particular) que le permita interaccionar con el sitio receptor, así como un sustituyente de tipo hidrofílico en la posición **N-1** que modere su absorción y distribución en el sistema biológico (Ross 1979).

Sin lugar a dudas, la sustitución del hidrógeno base del alcohol (sustituyente de la posición **N-1**) en el MTZ es posible que modifique algunas de sus propiedades fisicoquímicas y altere la conducta farmacológica de los nuevos compuestos así formados.

Con base en estos antecedentes son sintetizados los compuestos arilcetonas **A**, **B** y **C** (Fig. 2) para estudiar su posible actividad biológica (capacidad de una sustancia química de inducir algunas respuestas biológicas a nivel celular o subcelular) en *Entamoeba histolytica* en concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 16.0 y 30.0 $\mu\text{g/mL}$ y se nota que el derivado **C** logra una máxima actividad antimicrobiana a una concentración relativamente baja (0.05 $\mu\text{g/mL}$) comparada con los otros antimicrobianos y el MTZ (1.0-5.0 $\mu\text{g/mL}$). Para el caso de los compuestos **B** y **A** tienen una actividad semejante a la del MTZ pero requieren de una concentración mínima (1.0-2.0 $\mu\text{g/mL}$). La curva de dosis-respuesta, permite calcular la concentración que cada compuesto requiere para producir el efecto amebicida 50% ($\text{AC}_{50\text{M}}$) comparándolo con el MTZ y de esta manera se obtiene el siguiente orden: **B** > **A** > **C** > **MTZ**. Así, 0.5-2 $\mu\text{g/mL}$ son suficientes para inducir aproximadamente la mitad de la actividad del MTZ (Campos *et al.* 1995).

Con respecto al potencial de reducción (caída de potencial que acompaña a la reducción de un ión cargado positivamente a su forma neutra o a la de un ión menos fuertemente cargado, o la de un átomo neutro a un ión cargado negativamente), se observa que los compuestos **A** (-1676.01 mV) y **B** (-1523.64 mV) están cercanos al del MTZ (-1566.40 mV) y para el **C** no es posible obtenerlo debido a problemas de disolución. Estos resultados indican que entre menor sea el potencial de reducción, mayor actividad amebicida tendrán los compuestos, serán más liposolubles y menos reactivos a macromoléculas.

La actividad antimicrobiana de estos compuestos puede atribuirse al carácter lipofílico dado por los sustituyentes aromáticos acoplados a un potencial de reducción adecuado. La función del grupo nitro entonces juega un papel

importante en la acción antimicrobiana confirmando un mecanismo redox aceptable.

Por otro lado, la actividad amebicida también se analiza con base en las propiedades fisicoquímicas como son: afinidad electrónica, densidades electrónicas y calor de formación (Salgado *et al.* 1994).

La afinidad electrónica y la energía E_{LUMO} (energía del orbital más bajo desocupado) de las cetonas son menores en comparación con el MTZ. El mecanismo de acción del MTZ es una reacción de oxido-reducción en la cual éste acepta electrones de ferredoxinas o de flavoproteínas reduciéndolo a un compuesto intermedio inestable que ejerce una acción letal sobre los microorganismos, por lo tanto, a menor energía en el orbital E_{LUMO} aumenta el carácter electrofílico de la molécula (facilidad que tiene una molécula para aceptar un electrón de más en su estructura), mientras menor sea aquella, mayor facilidad de aceptar al electrón. También se observa densidad electrónica más baja en el grupo nitro de los derivados imidazoles con respecto al MTZ, lo que permite una mayor biodisponibilidad y capacidad electrónica que explicaría la acción amebicida encontrada.

Los valores de calor de formación para los análogos al MTZ son los siguientes: 31.470, 0.493, -6.887 y -7.774 Kcal/mol en los compuestos **A**, **B**, **C** y MTZ, respectivamente. En este caso, mientras mayor sea el calor de formación mayor estabilidad termodinámica tendrán los compuestos y por lo tanto habrá una correlación entre la energía de unión y la actividad biológica.

Con el propósito de conocer algunos elementos estructurales involucrados en la interacción molécula-receptor, se efectúa además un estudio conformacional de los compuestos con relación a los confórmeros obtenidos al realizar diferentes

giros en los enlaces hasta lograr la estabilidad. En el caso del MTZ, los grupos nitro e hidroxilo se encuentran opuestos y alejados, por el contrario, en las cetonas se observa una repulsión electrónica del oxígeno del carbonilo con respecto al MTZ, debido al acercamiento del grupo carbonilo al grupo nitro. Sin embargo, a pesar de las diferencias conformacionales entre las series y el MTZ, el grupo responsable de la actividad biológica queda expuesto o disponible para realizar su función (Salgado *et al.* 1994).

Finalmente, es posible argumentar que el efecto inductor (atracción de electrones) a larga distancia por parte del sustituyente en el arilo queda manifestado en el derivado (Ar= p-fluor fenilo) sustituyente farmacológicamente más activo (Salgado *et al.* 1994).

3.0 Sistemas de pruebas para evaluar genotoxicidad

Actualmente existen diversos sistemas biológicos de prueba que abarcan gran variedad de organismos desde bacterias hasta mamíferos, los cuales han sido desarrollados para estimar el efecto citogenético inducido por mutágenos tanto físicos como químicos con el fin de obtener una visión más completa del riesgo que implica para el ser humano (Environmental Mutagen Society 1975, Carrano y Natajaran 1988). No obstante, el nivel de organización y los sistemas metabólicos de los modelos utilizados difieren de los del hombre y esto ha constituido una fuente de error en la toma de decisiones, ya que se ha comprobado que una sustancia que puede provocar daño mutagénico en un sistema bacteriano, no necesariamente lo produce en células humanas (Ashby 1988). Pero cuando un agente dado induce alteraciones en varios organismos, incluyendo mamíferos debe considerarse que constituye un riesgo potencial.

El análisis del efecto de la exposición a agentes mutagénicos tanto *in vitro* como en individuos ocupacionalmente expuestos también es posible mediante el uso de modelos celulares, como fibroblastos de piel, células epiteliales de descamación de mucosa (oral y vejiga), células de la médula ósea, así como eritrocitos y linfocitos de sangre periférica en los que es posible evaluar numerosos tipos de daño al ADN, a nivel cromosómico, con el estudio de aberraciones cromosómicas, ICH ó de micronúcleos (WHO/IPC1985).

3.1. Linfocitos humanos

El sistema de linfocitos de sangre periférica ha demostrado ser un indicador extremadamente sensible tanto *in vitro* como en individuos ocupacionalmente expuestos a diversos agentes para el análisis de alteraciones cromosómicas estructurales, ya que presenta las ventajas siguientes (Evans y O'Riordan 1975, Das 1988) :

- ◆ Fácil disponibilidad de gran cantidad de células cuya obtención es sencilla, ya que 1 ml de sangre puede contener de 1 a 3 millones de linfocitos.
- ◆ Generalmente permanecen en estado G₀/G₁ en la circulación periférica y normalmente no se dividen *in vivo*, así que las lesiones que se inducen permiten la formación de ICH ó de aberraciones que pueden permanecer en estas células por varios días, meses o años.
- ◆ Son fáciles de estimular para crecer en cultivo, agregando un mitógeno, la fitohemaglutinina (FHA).

- ◆ Tienen una proporción baja de aberraciones cromosómicas espontáneas.
- ◆ Bajo ciertas condiciones carece de activación metabólica, sin embargo, se induce agregándole la fracción S9.

En experimentos *in vitro* se puede trabajar con un amplio rango de concentraciones de la sustancia a verificar. Esto da la oportunidad de evaluar más exactamente la dependencia concentración-efecto y también el espectro de aberraciones inducidas (Zurkov y Yakovenko 1976).

3.2 Intercambios de cromátidas hermanas (ICH)

Uno de los métodos recomendables para la detección de daño primario al ADN es el ICH tanto *in vitro* como en individuos ocupacionalmente expuestos a mutágenos y/o carcinógenos, ya que se ha considerado, desde el punto de vista citogenético, una prueba sumamente sensible, más rápida y sencilla que la de aberraciones cromosómicas. También se ha usado para detectar y diferenciar gran cantidad de enfermedades en la fragilidad de cromosomas que predisponen a la neoplasia, especialmente en cultivos humanos de sangre periférica (Das 1988)

Los ICH son cambios recíprocos de secuencias de ADN en un locus homólogo de dos cromátidas del mismo cromosoma durante la replicación del ADN. Este intercambio molecular puede ser fácilmente visualizado en un microscopio de luz en células en metafase mediante el método de fluorescencia más Giemsa (FPG), que consiste en dejar a las células durante dos ciclos de replicación en presencia de un análogo de la timina, la 5-bromodesoxiuridina (BrdU) y teñirlas con los colorantes Hoechst 33258 y Giemsa. Las cromátidas bifilarmente sustituidas con BrdU se teñirán más débiles que las unifilares (Fig. 5). En esta metodología es

necesaria la aplicación de luz ultravioleta o de mercurio por distintos períodos después de la tinción con Hoechst, ya que la exposición a la luz produce una reacción de fotólisis en el ADN doblemente sustituido con BrdU lo que reduce la tinción con Giemsa mientras que en la cromátida unifilarmente sustituida esta reacción es menor y el colorante tiñe intensamente (Perry y Wolff 1974).

El ICH es un fenómeno dependiente de la replicación del ADN, por lo tanto, una célula somática normal puede producir un cierto nivel basal de ICH pero no es posible observar en células que no pasan por replicación en presencia de precursores. Aunque el mecanismo molecular en el proceso de intercambio aún no se ha resuelto, involucra rompimiento y reunión de 4 hebras de ADN, una conexión entre las hebras de uno y de otro brazos del mismo cromosoma y la reunión de las hebras en su nueva localización. Sin embargo, es importante reconocer si el rompimiento y la reunión ocurren sin producir modificaciones en el material genético. Sobre ello hay gran cantidad de información de la relación entre los ICH inducidos y otros efectos genéticos *in vitro* e *in vivo*.

Varios estudios han demostrado que la frecuencia de ICH aumenta dramáticamente cuando los cultivos de células o animales completos, incluyendo al hombre, se exponen a mutágenos y/o carcinógenos conocidos. Cuando células de criceto chino en cultivo se exponen experimentalmente, se describe que la inducción de ICH está linealmente relacionada con el incremento de mutaciones en un sólo gen pero si las células se exponen a varios agentes químicos, entonces difieren del tipo de lesión al ADN que se produce (Carrano *et al.* 1978 Nishi *et al.* 1984). La relación entre los ICH inducidos y la frecuencia de mutaciones es distinta con cada uno de esos agentes, sugiriendo que cada tipo de lesión formada se desarrolla de manera diferente en la célula, favoreciendo así la formación de ICH ó mutaciones. Es posible que la misma lesión sea capaz

de producir mutaciones y/o alteraciones que inducen ICH y que este fenómeno sea un subgrupo de aquellas que originan mutaciones.

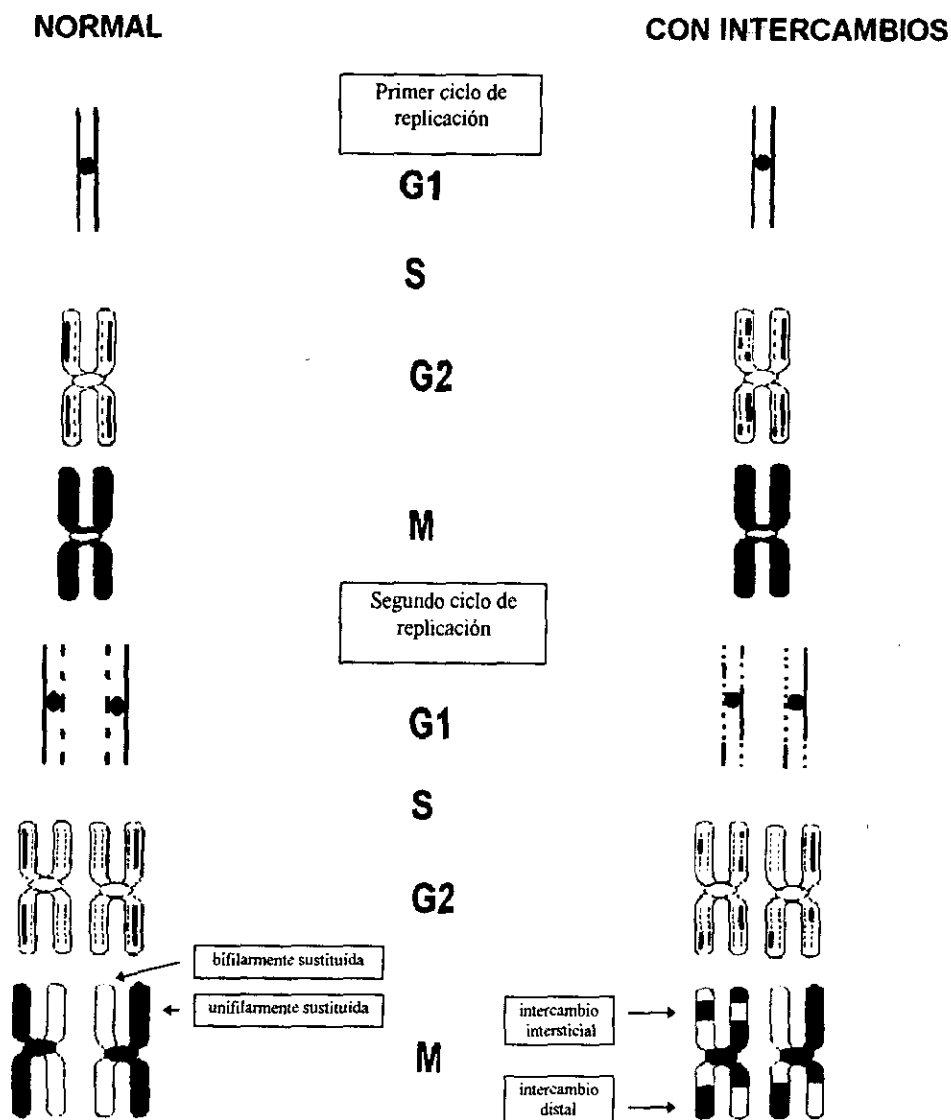


Fig. 5 Mecanismo de intercambio de cromátidas hermanas incluyendo la replicación cromosómica y la incorporación de 5-BrdU durante dos ciclos de replicación (I y II).

En otros trabajos realizados, se compara la transformación celular *in vitro* o de tumores *in vivo*, demostrándose que la formación de ICH está correlacionada positiva y directamente con la inducción de la transformación *in vitro* de células embrionarias de criceto sirio. Esta relación se menciona para 5 agentes químicos pero no para radiación X. La tasa de ICH inducidos/frecuencia de transformación varía para cada agente (Popescu *et al.* 1981).

También ha sido evidente el incremento en la frecuencia de ICH en fumadores y en individuos bajo quimioterapia. Dichos resultados sugieren que una población de linfocitos con frecuencia elevada de ICH puede permanecer durante largos períodos después de terminar la exposición, lo que puede representar un daño persistente en los linfocitos con vida media larga o en una subpoblación sensible. Si esto es cierto, sería un medio apropiado para cuantificar el daño persistente *in vivo* (Lambert *et al.* 1978, Musilova *et al.* 1979, Hopkin y Evans 1980, Carrano y Moore 1982).

Varios factores biológicos o físicos varían la frecuencia normal de ICH, pero en general se acepta que son normales de 6 a 12 ICH por célula. Algunos investigadores han comparado las frecuencias basales de ICH entre hombres y mujeres y no han observado diferencias significativas (Alhadeff y Cohen 1976, Crossen *et al.* 1977, Carrano y Moore 1982).

Existen varios modelos para explicar la formación de los ICH y su significado biológico. El más aceptado hasta el momento es el propuesto por Painter (1980) que considera que los ICH se presentan con mayor frecuencia en las zonas de unión entre grupos de replicones durante la replicación (Fig.6). Este principio está apoyado por la evidencia de que ciertas enzimas, las topoisomerasas, inducen y reúnen los rompimientos. Agentes como la mitomicina C (MMC) y la luz ultravioleta inhiben la síntesis de ADN por bloqueo de la elongación de la cadena y sus efectos se encuentran en varios estadios de la duplicación, de manera que

estos compuestos reducen la velocidad de desplazamiento de la horquilla de duplicación, pueden generar una situación en donde existan 4 extremos libres (dos nacientes y dos paternos) de un grupo de replicones completamente duplicados y éstos pueden estar opuestos a los dos extremos libres (ambos paternos) del replicón adyacente que se encuentra parcialmente duplicado. Esto conduce a la conexión entre grupos de replicones en los cuales un segmento duplicado se encuentra al lado de un segmento no duplicado (Fig. 6).

Se sugiere que los rompimientos de la doble hebra de ADN en estas conexiones son formados y reunidos por la acción de las topisomerasas I y II que se encuentran localizadas en las células de mamífero (Liu *et al.* 1980). Ocasionalmente, en lugar de una reunión normal, el rompimiento es sellado por la reunión de hebras hijas de una molécula duplicada a la molécula no duplicada. Por lo tanto, el ICH es iniciado cuando las hebras hijas nacientes de un grupo duplicado se combinan con hebras progenitoras de un grupo parcialmente duplicado y el ICH se termina de formar cuando estos últimos grupos completan la duplicación. Este intercambio requiere de un solo evento, el rompimiento de la doble hebra; esto es consistente con los datos que sugieren que la formación de los ICH está en función lineal con la dosis del agente (Perry y Evans 1975, Carrano *et al.* 1978).

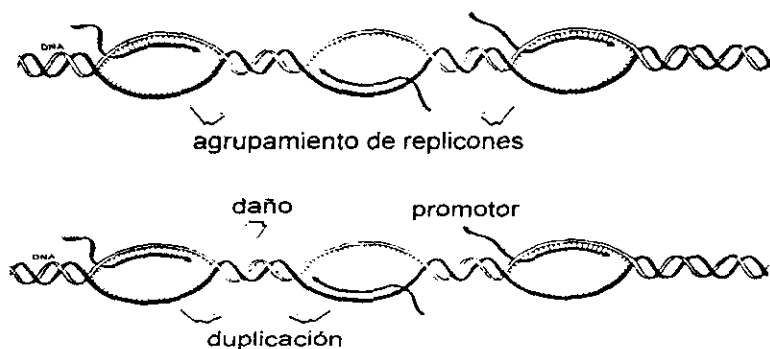
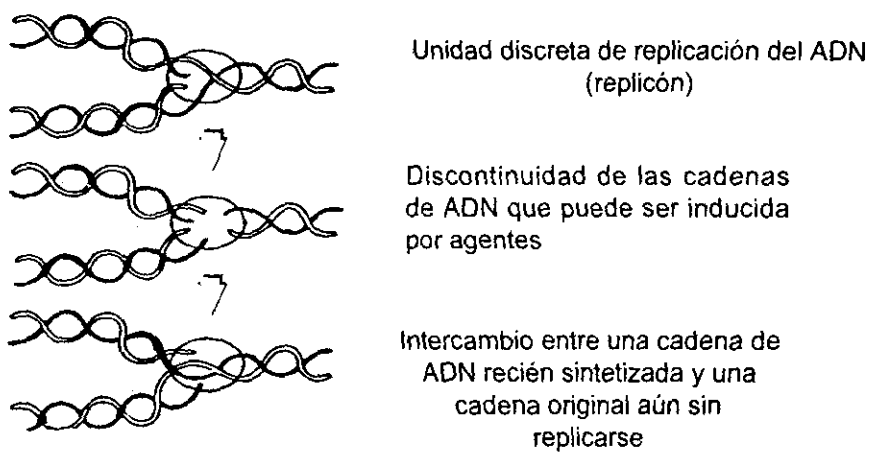


Fig. 6 Modelo de replicación de doble hebra en la unión entre los grupos de replicones para el intercambio de cromátidas hermanas (Painter 1982).

3.3 Cinética de proliferación celular e índice mitótico

Se llama ciclo celular a los diferentes estados subsecuentes de una célula eucariótica en división e involucra dos procesos fundamentales: la interfase y la mitosis, esta última produce dos células hijas idénticas a partir de una célula precursora. La interfase comprende: G_1 , S y G_2 . En la fase G_1 la célula se prepara para la síntesis del ADN. Las enzimas y proteínas que se requieren para iniciar y efectuar la replicación del ADN se sintetizan al final de las fases G_1 y al inicio de S. La fase S es el período de síntesis del ADN durante el cual se genera una segunda copia del genoma entero. En la fase G_2 la célula se prepara para la división, sintetizando moléculas que se requieren para la mitosis. El tiempo que transcurre entre una mitosis y otra se denomina período de interfase. Existe además, la fase denominada G_0 , la cual se considera como un estado de "reposo" de las células que no se encuentran en proliferación. En esta etapa, el metabolismo principal de la célula está disminuido, incluyendo muchos de los procesos usualmente activos como la transcripción y la síntesis de proteínas (Draetta 1990, Graña y Redy 1995).

El orden de los eventos que se llevan a cabo en el ciclo celular se asegura por la dependencia que existe entre cada uno de ellos, es decir, que los eventos finales no se llevan a cabo sino hasta que los iniciales se han completado. Por ejemplo, deben retrasar el inicio de la mitosis o la meiosis hasta que se haya finalizado la replicación del ADN; un error en la espera puede producir células menguadas en un cromosoma, alteración capaz de provocar la muerte celular (apoptosis) o cáncer (Kirschner 1992, Murray 1992).

Los principales eventos del ciclo celular en eucariotes se inician por proteínas cinasas cuyas actividades dependen de la unión a ciclinas (cinasas dependientes de ciclinas ó CDKs). Por ejemplo, la fase M (mitosis) se inicia por la activación repentina del factor promotor de la maduración (FPM), el cual tiene un dímero de

cdc2 (la subunidad cinasa) y una ciclina mitótica. Similarmente, la fase S se inicia por cdc2 (un homólogo de la cinasa) en asociación con diferentes ciclinas. Hay tres mecanismos para activar y desactivar el complejo ciclina-CDK: (1) la actividad de los dímeros puede regularse alterando el estado de fosforilación de la subunidad cinasa; (2) los dímeros pueden crearse y destruirse mediante la síntesis y la degradación de la ciclina y (3) las proteínas unidas al dímero pueden proteger o inhibir la actividad CDK (Tyson *et al.* 1996).

La síntesis y la degradación de cdc2 es balanceada, así que su concentración permanece constante durante el ciclo. La actividad de cdc2, sin embargo, fluctúa debido a su interacción con la ciclina y a la fosforilación de dos residuos, un inhibidor de tirosina y un activador de treonina (Tyr15 y Thr161). La unión de la ciclina promueve la fosforilación de cdc2 en ambos sitios. Si el dímero cdc2-ciclina se interrumpe por la degradación de la ciclina, entonces el monómero cdc2 es rápida y completamente desfosforilado. El estado de fosforilación de Tyr15 es determinado por una cinasa (*wee1*) y una fosfatasa (*cdc25*). Así que tanto *wee1* como *cdc25* son regulados por la fosforilación: hay una disminución de la actividad cinasa de *wee1* y un incremento de la actividad fosfatasa de *cdc25* para que las células entren a mitosis. Aunque parece que el FPM activo está involucrado directa o indirectamente en la regulación de *wee1* y de *cdc25* (Tyson *et al.* 1996).

La degradación de la ciclina es regulada por la vía de ubiquitinación, ésta se activa cuando las células salen de la mitosis y entran a la fase G₁, pero es mucho menos activa en las fases S, G₂ y M. El FPM activo puede acelerar la degradación de las ciclinas mediada por ubiquitina y la señal parece ser indirecta ya que hay un significativo retraso de tiempo entre la adición del FPM y el cambio en el porcentaje de la degradación de las ciclinas (Tyson *et al.* 1996).

El ADN de todas las células, aún de las que no están en crecimiento, se encuentra sujeto a daño físico o químico. Los cambios incorrectos en las bases del ADN de las células que no están en crecimiento, podrían generar la producción de proteínas defectuosas a una cantidad inaceptable. Una mutación puede hacer que una célula de apariencia normal, no reciba correctamente los mensajes externos y altere su proceso de división. Si bien es cierto que la célula tiene sistemas que detectan y llegan a corregir mutaciones, algunos daños pasan inadvertidos. La acumulación de alteraciones genéticas puede transformar a la célula en tumorigénica que, a diferencia de una célula normal ya no responde a las señales inhibitoras que controlan su crecimiento, cambia su morfología y adquiere la propiedad de replicarse sin medida. Finalmente, las células cancerosas invaden los tejidos sanos en cualquier zona corporal, se habla entonces de metástasis (Nasmyth 1990, Kirschner 1992, Murray 1992).

La formación del complejo ciclina-CDK permite la interacción con otras proteínas que son codificadas por oncogenes y genes supresores de tumores y entonces modifican o controlan el ciclo celular (Graña y Reddy 1995, Tyson *et al.* 1996). Se han descrito dos tipos de mutaciones que pueden desregular la división celular: **dominantes** de función adquirida en genes que normalmente juegan un papel importante en el curso del ciclo celular (por ejemplo, CLN3) y **recesivas** en pérdida de función en genes como FAR1 y FUS3 que aunque no participan en la progresión del ciclo celular son necesarios para la regulación de factores externos. Por lo tanto, el mecanismo molecular por el cual estas mutaciones actúan puede relacionarse con las dos clases de genes involucrados en la tumorigénesis: los oncogenes y anti-oncogenes (o genes supresores de tumores). Se considera que la mayoría de los proto-oncogenes están involucrados en los procesos necesarios para la división celular y pueden convertirse en oncogénicos por las mutaciones dominantes de función adquirida. Por otro lado, los genes supresores de tumores son indispensables para la división celular pero a la vez son requeridos para la regulación normal (Nasmyth 1990, Graña y Reddi

1995). Las mutaciones en estos genes dan como resultado la desregulación de la división celular. Los genes supresores mutados son recesivos, de modo que se requiere que existan alteraciones en ambos alelos normales para eliminar su función. Muchas de las formas de cánceres humanos hereditarios, tales como el retinoblastoma y el síndrome de Ly-Fraumeni, son ocasionados por la transmisión de genes supresores defectuosos, Rb y p53, respectivamente. Las pruebas experimentales recientes sobre la restauración de la función de estos genes en algunas células tumorales han demostrado el detenimiento del ciclo celular o bien la muerte de la célula, lo cual confirma la importancia de estos genes en la biología del cáncer (Levine 1993, 1995, Muller *et al.* 1993).

El gen supresor de tumores p53, se localiza en el cromosoma 17, banda p13.1 del genoma humano. Consta de 11 exones, que abarcan aproximadamente 20 kb, 10 de éstos, del 2 al 11, comprenden la región que codifica para una fosfoproteína de 393 aminoácidos, con localización primordialmente nuclear. El ARN mensajero totalmente procesado, es de 2.2 a 2.5 kb y se expresa en todas las células del cuerpo, presentándose los niveles más elevados en las del bazo y del timo (Levine 1993). Las mutaciones en este gen supresor se presentan con una frecuencia muy alta, más del 50 % de gran variedad de tumores y cánceres (Hollstein *et al.* 1991). En la mayoría de los casos, ambos alelos están inactivados, uno por mutaciones puntuales y el otro por una delección parcial o total (con la consecuente pérdida de la expresión del gene). Dentro de las mutaciones puntuales, el 90 % son denominadas de sentido equivocado, muchas de las cuales ocurren en sitios evolutivamente conservados de la proteína y algunos se han llegado a considerar, sitios con alta mutabilidad. Esta clase de mutaciones cambia un aminoácido por otro, implicando una posible alteración en la conformación de la proteína y en algunas ocasiones el incremento de su estabilidad. En ambos casos se provoca la pérdida de la función de p53 (Harris 1993).

La pérdida de este gen supresor predispone al cáncer, lo cual sugiere que p53 actúa principalmente mediando la respuesta celular ante un daño al ADN, evitando la acumulación de mutaciones potencialmente oncogénicas y la inestabilidad genómica. Se han identificado dos mecanismos a través de los cuales p53 puede ejercer tal efecto supresor, ya sea individualmente o por combinación de ambos. Estos son, el arresto del ciclo celular y la apoptosis. A esto hay que agregar la relación que tienen otras funciones adicionales de p53, como por ejemplo, la inhibición de la angiogénesis y su participación en el envejecimiento celular con su actividad supresora de tumores (Dameron *et al.* 1994, Atadja *et al.* 1995).

La respuesta celular ante un daño al ADN, consiste en un rápido y adecuado incremento en los niveles totales de p53, debido a la estabilización de la proteína, es prontamente degradada. En este sentido, la expresión de p53 tiene como efecto primario detener la progresión del ciclo celular; se ha demostrado que dicha proteína está involucrada en los tres puntos de restricción (G_1 , S y G_2), aunque se tiene más información sobre G_1 , el cual está mediado principalmente por: 1) la inhibición del PCNA, que es una subunidad reguladora de la ADN polimerasa delta y que participa en la replicación del ADN y 2) la inhibición del complejo ciclina G_1 /CDKs, evitando la fosforilación de proteínas tipo-Rb, tales como p107, p130 y aún la misma Rb, lo cual impide activar la transcripción de los genes requeridos para la progresión de G_1 a S. Sin embargo, p53 no sólo funciona como freno del ciclo celular, sino que la regulación de la supervivencia celular es aún más importante que el mantener la estabilidad genómica. La apoptosis, además de ser considerada como un proceso dentro de la fisiología de las células, puede inducirse por la acción de estímulos traumáticos o estresantes para éstas, tales como la radiación ionizante, exposición a drogas y la sobreexpresión de proteínas celulares y virales. Sin embargo, es poco lo que se ha logrado esclarecer de esta función de p53. La introducción de su forma funcional en algunas líneas celulares tumorales ha resultado en la activación del

mecanismo de muerte apoptótica. Aunque la apoptosis y la supresión de la proliferación celular son dos fenómenos diferentes, la finalidad de ambos, es la misma, prevenir la propagación de mutaciones a la progenie celular (Shaw *et al.* 1992, Aloni *et al.* 1995, Levine 1995).

En comparación con otras pruebas biológicas, tales como el ICH y las aberraciones cromosómicas, la cinética de proliferación de linfocitos estimulados por un mitógeno ha sido empleada principalmente por investigadores en toxicología genética, para evitar la evaluación de genotoxicidad a concentraciones citotóxicas de agentes químicos. La adición de BrdU a los cultivos de linfocitos permite que al incorporarse este análogo en lugar de la timina en el ADN de nueva formación, se diferencien las cromátidas hermanas y se pueda identificar las células en metafase que se han duplicado una, dos o más veces, haciendo el examen de la cinética de proliferación de las células en división.

La valoración preclínica de compuestos sintéticos o de productos naturales para probar la actividad antitumoral generalmente conduce a evaluar la muerte celular. Esto puede evaluarse con el uso de dos parámetros biológicos, tales como el índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC).

3.4 Mitomicina C y Ciclofosfamida

La MMC es un agente alquilante bifuncional cuya propiedad la adquiere cuando es activado por reductasas intracelulares. Su mecanismo de acción consiste en formar enlaces cruzados de ADN actuando en la guanina o en la citosina, este fenómeno ocurre de manera importante durante las fases S y G₂ del ciclo celular, también a dosis altas inhibe la síntesis del ARN y de las proteínas. En distintos sistemas de prueba ha demostrado ser mutagénico e inductor efectivo de ICH en células tratadas tanto *in vitro* como *in vivo* a concentraciones que provocan muy pocas aberraciones cromosómicas estructurales. Cuando los

tratamientos producen una frecuencia alta de intercambios también causan retraso en el ciclo celular (Crooke y Bradner 1976, Morimoto 1984, Katzung 1994). En este trabajo se confirma el efecto de la MMC sobre ICH, CPC e IR sin que se involucre activación metabólica.

La ciclofosfamida es un mutágeno indirecto que ejerce su acción sobre el ADN después de que ha sido metabolizado y principalmente induce monoadductos y entrecruzamientos. Su exposición en los linfocitos junto con la mezcla S9 incrementa la producción de ICH con respecto a su aplicación directa (White y Hesketh 1980, Hortmann *et al.* 1995). En este trabajo la CP muestra un comportamiento similar al reportado por White y Hesketh (1980) en los linfocitos de la sangre periférica *in vitro* lo que indica que el sistema microsómico utilizado es efectivo. Este compuesto es utilizado como tratamiento en algunos tipos de cáncer y se describe que el sistema de oxidasas de función mixta del citocromo P-450 microsómico hepático transforma la CP a 4-hidroxiciclofosfamida que se encuentra en equilibrio con la aldofosfamida. Estos metabolitos activos son transportados por el torrente sanguíneo al tumor y a las células normales, donde se presenta la fragmentación no enzimática de la aldofosfamida a las formas citotóxicas, mostaza de fosforamida y acroleína (Katzung 1994).

3.5 Metabolismo de mamíferos

El cultivo de linfocitos humanos *per se* tiende a tener muy bajos niveles de algunas enzimas involucradas en la activación metabólica, en particular, la población de citocromos P-450. Por tal motivo, las preparaciones de hígado de rata son usadas como suplementos metabólicos para sistemas de cultivos celulares, que incluyen homogeneizados completos, sobrenadantes de 9 000 g (S9, sobrenadante post mitocóndrico), 15 000 g (S15), 104 000 g (fracción microsómica) o células intactas (generalmente hepatocitos) para probar mutágenos indirectos o promutágenos, ya que se ha descrito que algunos

compuestos químicos requieren ser transformados por el hígado para provocar el daño (White y Hesketh 1980, Snell y Mullock 1987). Sin embargo, se requiere de una fuerte adición de cofactores para optimizar las condiciones de una determinada ruta metabólica, por ejemplo, la oxidación.

El hígado es el principal sitio del metabolismo de xenobióticos, pero existen otros tejidos como el intestino, pulmón, riñón y piel que también son importantes. Dentro de un tejido particular, las enzimas pueden concentrarse en diferentes células específicas (por ejemplo, los hepatocitos en el hígado, las células epiteliales tipo II en el pulmón). En estas células, diferentes enzimas están asociadas a distintos organelos subcelulares o compartimientos intracelulares. Las enzimas dependientes del citocromo P-450 se localizan en el retículo endoplásmico, mientras que las enzimas de conjugación (metabolismo fase II), como glutatión y sulfuro transferasas son predominantemente citosólicas. Se considera que la oxidación dependiente de citocromo P-450 es normalmente una ruta de activación y la de conjugación una ruta de desintoxicación (Snell y Mullock 1987).

Los citocromos P-450 (P-450s) fueron descritos inicialmente como pigmentos de naturaleza hemoproteica que muestran una intensa banda de absorción a 450 nm cuando se reducen usando ditionato de sodio y el complejo de monóxido de carbono. Esta superfamilia de hemoproteínas están unidas a membrana y tienen un tamaño de 45 a 65 kD. La función principal de P-450s es convertir compuestos químicos a derivados que pueden ser fácilmente eliminados del cuerpo. Esto generalmente ocurre a través de oxidaciones de sustancias hidrofóbicas mediada por P-450, seguido por reacciones de conjugación. Para algunos compuestos extraños, el metabolismo por P-450 resulta en la producción de metabolitos "activados" que pueden causar muerte celular y mutaciones génicas (González y Gelboin 1993, Goepfert *et al.* 1995).

Todos los P-450s poseen una unión no covalente hemo-hierro en forma de protoporfirina IX (Fig. 7) y se han encontrado en bacterias, levaduras, plantas y animales. En mamíferos, una cantidad limitada de P-450s están involucradas en vías metabólicas de síntesis de esteroides, mientras que la mayoría intervienen en el metabolismo de compuestos extraños. Los P-450s esteroidogénicos llevan reacciones muy específicas y no metabolizan sustratos no relacionados. Los P-450s que metabolizan compuestos xenobióticos se localizan en el retículo endoplásmico celular y se unen a esta red de membrana por un péptido amino-terminal hidrofóbico. Se cree que una porción de la estructura globular de la enzima es embebida en la bicapa lipídica (Fig. 7). Esta localización de membrana es ideal para la función de los P-450s en la transformación de sustratos hidrofóbicos. Algunas enzimas de conjugación se localizan en las membranas, pero otras se encuentran en el compartimiento citosólico de la célula, facilitando las conversiones de estos sustratos a derivados hidrofílicos (González y Gelboin 1993).

Al considerar a todos los organismos la cantidad de familias de P-450s es 35. Los mamíferos solo poseen 12 familias y 22 subfamilias. Los P-450s que metabolizan compuestos extraños comprenden solo las familias 1, 2, 3 y 4 (Nelson *et al.* 1993).

La mayoría de los agentes químicos extraños no son solubles en agua, por lo que las enzimas celulares los convierten a derivados hidrofílicos que pueden ser fácilmente eliminados del cuerpo. Esto generalmente ocurre por dos vías diferentes, llamadas **Fases I ó de funcionalización** y **II ó derivación**. Las reacciones de **fase I** llevan a cabo oxidaciones, reducciones e hidrólisis, agregando o exponiendo grupos funcionales (-OH, -SH, -NH₂, -COOH), aumentando la solubilidad del compuesto en el agua y constituyendo el sustrato para las reacciones de Fase II. Las enzimas de **fase II** ó también llamadas de **conjugación**, usan grupos hidroxilos como sustratos para la adición de

cosubstratos hidrofílicos que incluyen, UDP-glucuronosiltransferasas, sulfotransferasas, N-acetiltransferasas, N-aciltransferasas, metiltransferasas y glutatión transferasas. Las reacciones de conjugación originan productos muy solubles en agua que son reabsorbidos en el tracto intestinal (circulación enterohepática) y finalmente son excretados por el cuerpo (González y Gelboin 1993).

Las reacciones de **Fase I** eventualmente conducen a la formación de metabolitos reactivos que logran unirse covalentemente a macromoléculas de varios tejidos causando mutaciones génicas y muerte celular y. Sin embargo, las reacciones metabólicas mencionadas anteriormente pueden cambiar un compuesto xenobiótico a una forma menos tóxica que el compuesto químico original (Huggett *et al.* 1992).

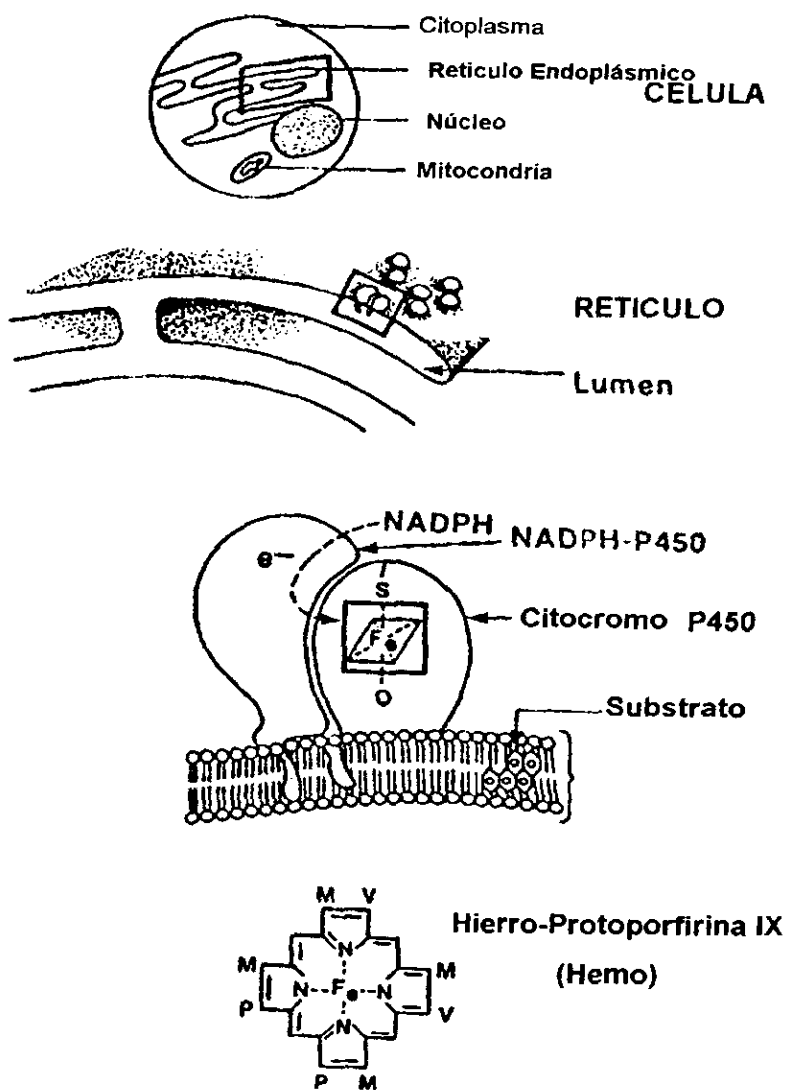


Fig. 7. Representación esquemática del citocromo P450 metabolizando compuestos extraños.

II. HIPOTESIS

Si los nuevos análogos al metronidazol tienen cambios conformacionales importantes en sus moléculas que disminuyan su toxicidad con respecto al MTZ, esto se verá reflejado en la reducción del efecto sobre la cinética de proliferación celular, índices de replicación y mitótico y una acción similar en la inducción de intercambios de cromátidas hermanas.

III. OBJETIVOS

- Evaluar la genotoxicidad de 1-(p-metilfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol, 1-(p-metoxifenacil)-2-metil-5-nitroimidazol y 1-(p-flúorfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol, mediante el análisis de ICH en cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica con y sin activación metabólica, de forma comparativa con el MTZ.
- Estimar la acción de estos fármacos sobre la cinética de proliferación celular, índices de replicación (IR) y mitótico (IM).

II. HIPOTESIS

Si los nuevos análogos al metronidazol tienen cambios conformacionales importantes en sus moléculas que disminuyan su toxicidad con respecto al MTZ, esto se verá reflejado en la reducción del efecto sobre la cinética de proliferación celular, índices de replicación y mitótico y una acción similar en la inducción de intercambios de cromátidas hermanas.

III. OBJETIVOS

- Evaluar la genotoxicidad de 1-(p-metilfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol, 1-(p-metoxifenacil)-2-metil-5-nitroimidazol y 1-(p-flúorfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol, mediante el análisis de ICH en cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica con y sin activación metabólica, de forma comparativa con el MTZ.
- Estimar la acción de estos fármacos sobre la cinética de proliferación celular, índices de replicación (IR) y mitótico (IM).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Preparación de soluciones

Con base en las dosis establecidas *in vitro* de la actividad biológica sobre cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica*, se establecieron las siguientes concentraciones: 2.03×10^{-6} , 4.06×10^{-6} , 8.13×10^{-6} , 2.03×10^{-5} , 4.06×10^{-5} , 6.50×10^{-5} y 1.22×10^{-4} M para 1-(p-metilfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (A), 1.91×10^{-6} , 3.82×10^{-6} , 7.63×10^{-6} , 1.91×10^{-5} , 3.82×10^{-5} , 6.11×10^{-5} y 1.15×10^{-5} M para 1-(p-metoxifenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (B), 2×10^{-6} , 4×10^{-6} , 8×10^{-6} , 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 6.4×10^{-5} y 1.2×10^{-4} M para 1-(p-flúorfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (C) y 2.92×10^{-6} , 5.84×10^{-6} , 1.17×10^{-5} , 2.92×10^{-5} , 5.84×10^{-5} , 9.35×10^{-5} y 1.75×10^{-4} para el MTZ.

Se utilizó como disolvente el dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) a una concentración final de 1.78 %, debido a la insolubilidad de los compuestos en agua.

4.2 Cultivo de Linfocitos

4.2.1 Sin Activación Metabólica

Se obtuvo sangre, de un donador aparentemente sano, por punción venosa en jeringa heparinizada (0.3 ml), se agregaron 8 gotas en un tubo de ensayo estéril que contenía 5 ml de medio RPMI 1640 con L-glutamina (GIBCO) complementado con 0.12 ml de fitohemaglutinina (GIBCO), esterilizados por filtración usando membranas "Millipore" de $0.45 \mu\text{m}$ y se incubaron por 24 horas a 37°C , transcurrido ese tiempo se aplicaron las diversas concentraciones antes

mencionadas, tanto del MTZ y sus tres análogos como del testigo y el disolvente y se agregaron 100 µl de 5-Bromodesoxiuridina (6.5×10^{-6} M BrdU, Merck) a todos los cultivos.

4.2.2 Adición de la Mitomicina C (MMC) en ausencia de la fracción S9

Como testigo positivo se utilizó la MMC (Sigma) a una concentración final de 1×10^{-7} M ya que se ha comprobado que es un mutágeno directo.

4.2.3 Cosecha y Tinción diferencial

A las 70 horas de iniciado el cultivo se agregaron 100 µl (5×10^{-6}) de colchicina (Merck) a cada tubo. Al transcurrir las 72 horas los cultivos se centrifugaron a 1,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante e inmediatamente el botón se resuspendió con una solución hipotónica de KCl (Merck) 0.075 M a 37°C y se dejó por 20 minutos en la incubadora, se centrifugaron nuevamente y el botón se lavó con 10 ml del fijador metanol-ácido acético (3:1), después de 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón con el fijador permaneciendo en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó finalmente el botón y se resuspendió en 0.5 ml de fijador (Purrot y Lloyd 1972) para preparar las laminillas. Por cada concentración se elaboraron 4 laminillas por goteo y se dejaron secar al aire. Se revisaron al microscopio de contraste de fases con los objetivos de 16X y 40X para seleccionar las que tuvieran mayor cantidad de metafases.

Para la tinción se utilizó el método de fluorescencia más Giemsa (Perry y Wolff 1974), las laminillas con metafases se colocaron en el colorante fluorocromado

Hoechst-33258-agua destilada (1:9) por 40 minutos en la oscuridad en cajas de Coplin. Posteriormente se pusieron en solución de citrato de sodio salino (2X CSS, Baker) a 60 °C y se irradiaron con luz negra durante una hora, después se introdujeron en CSS por una hora a 60°C y se tiñeron con Giemsa (Merck), diluida en una solución Sorensen (pH 6.8) (1:10) a 60 °C durante 2 minutos.

Para el registro de ICH se observaron 25 metafases de segunda división de cada una de las concentraciones así como de los testigos negativo y positivo. Se realizaron dos experimentos. Los ICH intersticiales se cuantificaron como dos eventos y los terminales como uno. La CPC se determinó en cada experimento examinando células de primera (M1), segunda (M2) y tercera (M3) divisiones en 100 metafases consecutivas, las cuales se clasificaron de acuerdo con su patrón de tinción (Fig.8). El índice de replicación (IR) se calculó de acuerdo con la fórmula (Lamberti *et al.* 1983):

$$IR = M1 + 2(M2) + 3(M3) / 100$$

El índice mitótico (IM) se analizó en 2,000 células y se evaluó como sigue:

$$IM = (\text{No. de metafases} / \text{células en interfase}) \times 100$$

Para evitar los prejuicios en el registro, se reetiquetaron todas las preparaciones de tal manera que no se tuvo conocimiento del grupo al cual pertenecían.

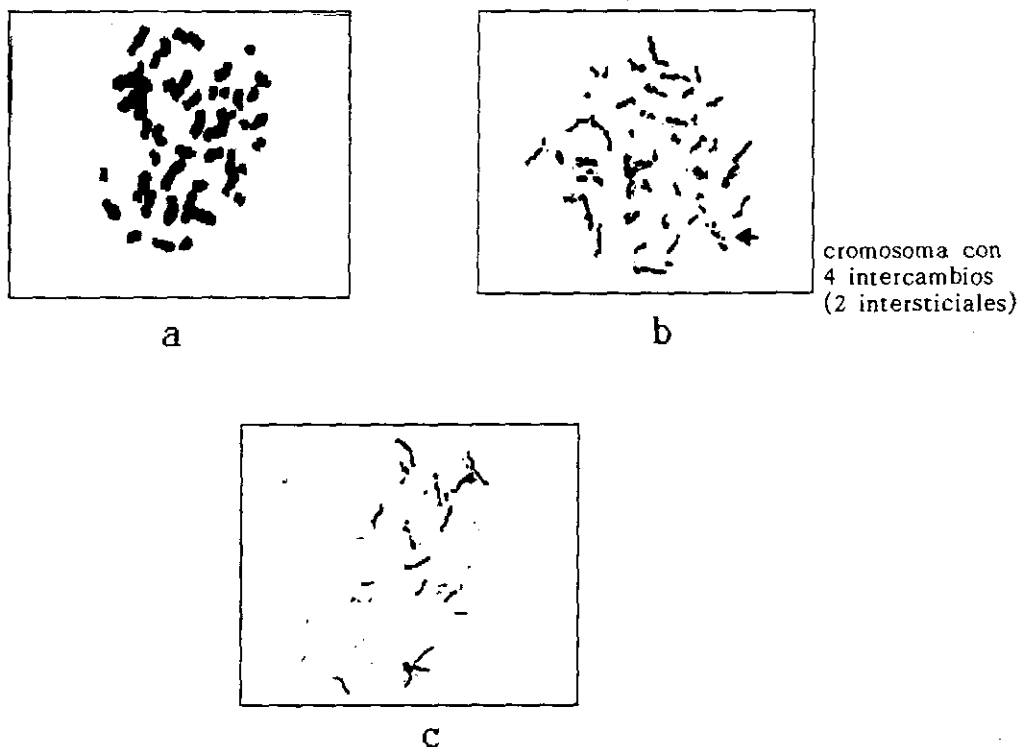


Fig. 8 Cinética de proliferación celular: metafases de primera (a), segunda (b) y tercera (c) divisiones.

4.2.4 Con activación Metabólica (S9)

4.2.4.1 Extracto S9

La adición de enzimas involucrada en la actividad metabólica de mamíferos, aplicada de manera exógena al ensayo de cultivo de linfocitos, tiene un valor complementario en la evaluación mutagénica. Se utilizó la fracción microsómica

S9 de hígado de rata en su forma comercial (Mol Tox) preparada de acuerdo con Ames *et al.* (1975) y Frantz y Malling (1975). El liofilizado fue reconstituido con 0.15 M de KCl (Merck) estéril. Las características del control de calidad de la fracción S9 que se utilizó en los experimentos se incluye en la tabla II.

TABLA II. Control de calidad de la fracción S9 utilizada en este trabajo.

Lote No. 0370	Agente inductor: Aroclor 1254 (KL615)
BIOQUIMICA	
Proteína: 35 mg/ml	
Actividad de Alcoxirresorufin-o-alquilasa	
Isoenzima	Actividad específica (picomoles de resorufina/min/mg proteína)
Etoxrresorufin-o-dietilasa	29170
Pentoxirresorufin-o-dipentilasa	2248
Benziloxirresorufin-o-alquilasa	No detectado

4.2.4.2 Mezcla S9

Se realizó de acuerdo con Ames *et al.* (1975): se prepararon 10 ml de mezcla S9 se preparó conteniendo 1 ml del extracto S9 junto con un sistema generador de NADPH, que consistió en cofactores estériles: 0.2 ml de $MgCl_2$ (0.4 M, Baker), 5 ml de amortiguador de fosfatos (0.2 M Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 (Baker), pH 7.4), 3.35 ml de agua destilada, 0.4 ml de NADP (0.1 M, Sigma) y 0.05 ml de Glucosa-6-fosfato (1M, Sigma) recién preparados (White y Hesketh 1980).

De la misma manera que para los tratamientos directos se agregaron 8 gotas de sangre en un tubo de ensayo estéril que contenía 5 ml de medio RPMI 1640 con L-glutamina (GIBCO) complementado con 0.12 ml de PHA (GIBCO) esterilizados por filtración "Millipore" de 0.45 μm . Los cultivos se incubaron durante 72 horas: a las 24 horas de iniciado el cultivo se aplicaron 100 μl ($6.5 \times 10^{-6} \text{ M}$) de 5-BrdU. A las 48 horas se agregaron 500 μl de la mezcla S9 al testigo, al disolvente y a las distintas concentraciones de los compuestos A, B y C, manteniéndose por 2 horas (1 hora en reposo y 1 hora en agitación). Después del tratamiento las células se lavaron dos veces con 10 ml de cloruro de sodio al 0.9 % (Pisa) y se adicionó de nuevo 5 ml de medio GIBCO complementado con 0.12 ml de PHA y $6.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ de 5-BrdU, se dejaron por 24 horas más. A las 70 horas de iniciado el cultivo se añadieron 100 μl ($5 \times 10^{-6} \text{ M}$) de colchicina tanto al testigo como a las diferentes soluciones de los tres compuestos análogos al metronidazol.

4.2.4.3 Adición de ciclofosfamida (CP) en presencia y ausencia de la fracción S9.

Se usó la CP como testigo positivo. Se agregaron 50 μl ($4 \times 10^{-5} \text{ M}$) de CP sin y junto con 500 μl de la mezcla S9 a las 48 horas de iniciado el cultivo y se dejaron durante 2 horas. Posteriormente se lavaron con cloruro de sodio al 0.9 % (Pisa) y se les agregó nuevamente 5 ml de medio GIBCO complementado con 0.12 ml de FHA.

4.2.4.4 Análisis estadístico

Para ICH e IR se aplicó el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls, para la cinética de proliferación (CPC) y para el IM se empleó la prueba de χ^2 .

V. RESULTADOS

Los datos que aparecen en las tablas III y IV, corresponden a un experimento y a su repetición tanto del testigo como de los diversos tratamientos del MTZ, sus 3 análogos y el disolvente, en cultivos de linfocitos de 72 horas con y sin activación metabólica.

El DMSO, aplicado en los experimentos como disolvente al 1.78 % con y sin activación metabólica no incrementó significativamente la frecuencia basal de ICH, CPC, IM e IR (Tablas III y IV).

La exposición de los cultivos de linfocitos humanos sin activación metabólica tanto al MTZ como a sus compuestos análogos, 1-(*p*-metilfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (A), 1-(*p*-metoxifenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (B) y 1-(*p*-flúorfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (C) en concentraciones de 2×10^{-6} a 1.75×10^{-4} M durante 72 horas, no revelaron diferencias significativas en la incidencia de ICH con respecto al testigo (Tabla III).

Por otro lado, la tinción diferencial de las cromátidas permitió el análisis de la cinética de proliferación celular (CPC), notándose que tampoco el MTZ y sus 3 análogos produjeron diferencias estadísticamente significativas con relación al testigo (Tabla III). Estas observaciones también se reflejaron en el índice de replicación (IR) ya que los valores fueron similares al testigo y a los del disolvente.

Como se esperaba, las células cultivadas en presencia de mitomicina C (testigo positivo) sin S9, manifestaron un incremento importante en la presencia de ICH y disminuciones significativas en el IM y en el IR (Tabla III).

Cuando se agregó la mezcla S9 a los cultivos de linfocitos humanos no hubo incremento significativo de los ICH en ninguna de las concentraciones de los

fármacos y del disolvente. La ciclofosfamida (CP) produjo a la concentración aplicada (4×10^{-5} M) una frecuencia muy elevada de ICH (63.32 ± 3.67), lo que demostró que el sistema microsómico utilizado fue efectivo (Tabla IV).

Por lo que se refiere al índice de replicación, al aplicar la prueba estadística de χ^2 , se observó aceleración del ciclo celular a partir de las concentraciones 5.84×10^{-6} M con MTZ y a 8.13×10^{-6} , 1.91×10^{-5} y 6.4×10^{-4} M, para los compuestos **A**, **B** y **C**, respectivamente, con el sistema de activación metabólica.

Con respecto al IM, en la tabla IV se observa que con la fracción microsómica de hígado de rata no se encontraron diferencias significativas después de los tratamientos con los 3 análogos y con el MTZ. Sin embargo, para el MTZ y el análogo **B** solo en las concentraciones más altas 1.75×10^{-4} y 3.82×10^{-5} a 1.15×10^{-4} M, respectivamente, sucedió la inhibición (0.032 vs 0.045 del testigo).

La exposición directa de los linfocitos a la CP con y sin la mezcla S9 no causó incremento significativo en la CPC y en los IM e IR (Tabla IV).

TABLA III. ESTUDIO CITOGENETICO DE TRES COMPUESTOS ANALOGOS AL METRONIDAZOL (MTZ) EN LINFOCITOS HUMANOS *in vitro* SIN S9

Concentración Molaridad	ICH $\bar{X} \pm E.E.$	Metafases			IR	IM
		1ª	2ª	3ª		
T	3.88 ± 0.25	57	92	51	1.97	0.047
DMSO (1.78 %)	5.42 ± 0.44	55	86	59	2.02	0.025
MMC	16.92 ± 1.06*	80*	69	51	1.86*	0.025
MTZ+DMSO						
2.92 X 10 ⁻⁶	4.92 ± 0.31	52	96	52	2.00.	0.021
5.84 X 10 ⁻⁶	4.44 ± 0.27	52	85	63	2.06	0.024
1.17 X 10 ⁻⁶	5.26 ± 0.31	46	94	60	2.07	0.023
2.92 X 10 ⁻⁵	5.20 ± 0.30	50	88	62	2.06	0.022
5.84 X 10 ⁻⁵	5.20 ± 0.30	58	82	60	2.01	0.021
9.35 X 10 ⁻⁵	4.66 ± 0.23	56	86	58	2.01	0.023
1.75 X 10 ⁻⁴	4.34 ± 0.26	57	84	59	2.01	0.022
p-Me+DMSO (A)						
2.03 X 10 ⁻⁶	3.70 ± 0.30	55	90	55	2.00.	0.024
4.06 X 10 ⁻⁶	4.72 ± 0.33	60	87	53	1.97	0.024
8.13 X 10 ⁻⁶	3.38 ± 0.22	58	92	50	1.96	0.027
2.03 X 10 ⁻⁵	4.12 ± 0.36	59	93	48	1.95	0.026
4.06 X 10 ⁻⁵	5.32 ± 0.23	59	86	55	1.98	0.022
6.50 X 10 ⁻⁵	3.84 ± 0.22	54	87	59	2.03	0.022
1.22 X 10 ⁻⁴	3.58 ± 0.22	58	86	56	1.99	0.022
p-MeO+DMSO (B)						
1.91 X 10 ⁻⁶	3.86 ± 0.30	59	86	55	1.98	0.026
3.82 X 10 ⁻⁶	5.02 ± 0.28	56	89	55	2.00.	0.031
7.63 X 10 ⁻⁶	3.62 ± 0.16	57	93	50	1.97	0.032
1.91 X 10 ⁻⁵	3.98 ± 0.20	59	91	50	1.96	0.032
3.82 X 10 ⁻⁵	4.28 ± 0.24	59	90	51	1.96	0.029
6.11 X 10 ⁻⁵	4.08 ± 0.20	58	90	52	1.97	0.031
1.15 X 10 ⁻⁴	4.28 ± 0.28	55	88	57	2.01	0.028
p-F+DMSO (C)						
2 X 10 ⁻⁶	3.70 ± 0.25	52	91	57	2.03	0.023
4 X 10 ⁻⁶	4.08 ± 0.20	54	91	55	2.01	0.023
8 X 10 ⁻⁶	5.20 ± 0.35	58	89	53	1.98	0.023
2 X 10 ⁻⁵	4.60 ± 0.35	57	89	54	1.99	0.025
4 X 10 ⁻⁵	4.26 ± 0.30	54	92	54	2.00.	0.026
6.4 X 10 ⁻⁴	5.16 ± 0.36	56	88	56	2.00.	0.025
1.2 X 10 ⁻⁴	5.20 ± 0.35	55	89	56	2.01	0.025

Intercambios de cromátidas hermanas en 50 metafases de 2 experimentos

Para la CPC (n= 200 metafases consecutivas) se aplicó X² con P> 0.05 y

para el IM, X² con P< 0.05

Análisis de varianza para ICH e IR, P > 0.05

* Significativo

TABLA IV. ESTUDIO CITOGENETICO DE TRES COMPUESTOS ANALOGOS AL METRONIDAZOL (MTZ) EN LINFOCITOS HUMANOS *in vitro* CON S9

Concentración Molaridad	ICH $\bar{X} \pm E.E.$	Metafases			IR	IM
		1ª	2ª	3ª		
T	3.92 ± 0.27	51	93	56	2.03	0.045
DMSO+S9 (1.78 %)	5.14 ± 0.23	55	93	52	1.99	0.042
S9	5.46 ± 0.33	55	96	49	1.97	0.041
CP+S9	63.32 ± 3.67*	52	92	56	2.02	0.040
CP	3.98 ± 0.21	58	91	51	1.97	0.041
MTZ+DMSO+S9						
2.92 X 10 ⁻⁶	5.54 ± 0.34	44	89	67	2.12	0.040
5.84 X 10 ⁻⁶	5.04 ± 0.33	39	82	79*	2.20*	0.042
1.17 X 10 ⁻⁵	4.48 ± 0.30	38	82	80*	2.21*	0.043
2.92 X 10 ⁻⁵	4.44 ± 0.29	35	85	80*	2.23*	0.040
5.84 X 10 ⁻⁵	5.04 ± 0.27	31	80	89*	2.29	0.043
9.35 X 10 ⁻⁵	4.72 ± 0.32	39	69	92*	2.27*	0.042
1.75 X 10 ⁻⁴	4.54 ± 0.34	40	69	91*	2.26*	0.032*
p-Me+DMSO+S9 (A)						
2.03 X 10 ⁻⁶	5.02 ± 0.25	48	82	70	2.16	0.040
4.06 X 10 ⁻⁶	4.94 ± 0.30	44	85	71	2.14	0.037
8.13 X 10 ⁻⁶	5.20 ± 0.34	40	85	75*	2.18*	0.037
2.03 X 10 ⁻⁵	4.98 ± 0.35	31	83	86*	2.28*	0.036
4.06 X 10 ⁻⁵	5.18 ± 0.31	25	88	87*	2.31*	0.037
6.50 X 10 ⁻⁵	6.08 ± 0.37	36	79	85*	2.25*	0.039
1.22 X 10 ⁻⁴	5.32 ± 0.38	37	82	81*	2.27*	0.039
p-MeO+DMSO+S9 (B)						
1.91 X 10 ⁻⁶	5.18 ± 0.29	53	84	63	2.05	0.039
3.82 X 10 ⁻⁶	4.28 ± 0.29	51	92	57	2.03	0.038
7.63 X 10 ⁻⁶	3.96 ± 0.23	47	91	62	2.08	0.038
1.91 X 10 ⁻⁵	4.58 ± 0.20	38	88	74*	2.20*	0.037
3.82 X 10 ⁻⁵	4.68 ± 0.21	35	82	83*	2.24*	0.032*
6.11 X 10 ⁻⁵	4.96 ± 0.35	36	80	84*	2.24*	0.032*
1.15 X 10 ⁻⁴	4.70 ± 0.27	38	80	82*	2.22*	0.032*
p-F+DMSO+S9 (C)						
2 X 10 ⁻⁶	4.98 ± 0.27	43	89	68	2.13	0.045
4 X 10 ⁻⁶	5.14 ± 0.33	45	86	69	2.12	0.040
8 X 10 ⁻⁶	5.18 ± 0.29	42	92	66	2.12	0.041
2 X 10 ⁻⁵	4.60 ± 0.28	43	86	71	2.14	0.040
4 X 10 ⁻⁵	4.90 ± 0.15	44	84	72	2.14	0.038
6.4 X 10 ⁻⁴	4.74 ± 0.31	46	79	75*	2.15	0.039
1.2 X 10 ⁻⁴	4.84 ± 0.32	42	82	76*	2.17	0.039

Intercambios de cromátidas hermanas en 50 metafases de 2 experimentos

Para la CPC (n= 200 metafases consecutivas se aplicó χ^2 con $P < 0.05$ y para el el IM, χ^2 con $P > 0.05$

Análisis de varianza para ICH, $P > 0.05$ e IR, $P < 0.05$

*Significativo

VI. DISCUSIÓN

El MTZ ha mostrado ser un agente antiprotozoario efectivo con un amplio espectro de actividad contra organismos anaerobios. Sin embargo, la respuesta mutagénica en bacterias y carcinogénica en ratones, ha motivado la búsqueda de nuevos derivados que desarrollan una actividad semejante pero con menor toxicidad para el humano. Con este propósito se sintetizaron 3 análogos de MTZ: 1-(p-metilfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (A), 1-(p-metoxifenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (B) y 1-(p-flúorfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (C), los cuales han mostrado mayor eficacia en contra de *E. histolytica* a menores concentraciones (0.5-2 µg/mL) que las usadas con MTZ (3-6 µg/mL) (Campos *et al.* 1995).

Los resultados en este estudio han puesto de manifiesto que el MTZ y sus 3 análogos, no causan incrementos significativos sobre la frecuencia de ICH en linfocitos humanos *in vitro* con y sin activación metabólica.

La presente investigación coincide con trabajos previos realizados en linfocitos humanos tratados con MTZ tanto en concentraciones similares a las dosis terapéuticas como con mayores, donde se evidencia que la frecuencia de ICH no se eleva *in vitro* ni en pacientes a los que se les ha administrado (Hartley-Asp 1979, Lambert *et al.* 1979, Elizondo *et al.* 1994). Sin embargo, en otros sistemas de prueba se ha comprobado que este compuesto posee propiedades mutagénicas a través de sus metabolitos, ya que se han encontrado en la orina de pacientes que lo consumen diferentes compuestos que en bacterias han sido mutagénicos (Speck *et al.* 1976, Finegold *et al.* 1980). Además hay datos que indican incremento de cáncer en individuos con la enfermedad de Crohn's después del tratamiento prolongado con MTZ.

Acerca de la biotransformación de este compuesto, se ha descrito que los hepatocitos, que contienen nitrorreductasas, que reaccionan con el MTZ, originan

entre sus metabolitos, un derivado hidroxilado, 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol, que se ha considerado como activo genéticamente, ya que es capaz de unirse al ADN (Rosenckranz y Speck 1975, Connor *et al.* 1977, La Russo *et al.* 1977). Los metabolitos activos pueden penetrar el epitelio intestinal y dañar a las células de los pacientes que ingieren este medicamento.

En un estudio reciente, realizado en linfocitos humanos *in vitro* con concentraciones por debajo, en y sobre el rango terapéutico, se ha reportado que el MTZ induce rompimientos de hebras sencillas en células detenidas (linfocitos no estimulados) y en proliferación (linfocitos estimulados con FHA). El daño al ADN dependió de la concentración del MTZ y del tiempo de cultivo o del estímulo. La cantidad de rompimientos de hebras sencillas es mayor en linfocitos estimulados que en detenidos. Los autores postulan que habiendo otros sitios de activación del MTZ además de las células del hígado, la terapia con MTZ puede dañar el genoma de mamíferos (Reitz *et al.* 1991).

El hecho de no encontrar efecto sobre la frecuencia de ICH en este estudio, no significa necesariamente ausencia de daño al ADN. Cabe mencionar que el incremento de rompimientos cromosómicos y de hebras sencillas encontrados por Elizondo (1994) y Reitz *et al.* (1991) en linfocitos humanos en individuos tratados e *in vitro*, respectivamente, apoyan que el MTZ produce daño al material genético, lo que hace necesario la utilización de métodos más adecuados (aberraciones cromosómicas, micronúcleos, etc) y sensibles para una mejor comprensión del mecanismo de acción del MTZ ante el ADN. Sin embargo, el daño producido por el MTZ y sus análogos se puso de manifiesto en la cinética de proliferación celular, únicamente con activación metabólica. Con el MTZ se evidencia un incremento significativo en metafases M3 conforme aumentan las concentraciones de 5.84×10^{-6} a 1.75×10^{-4} M. Por el contrario, la proporción de M3 en los compuestos A, B y C en dosis de 8.13×10^{-6} a 1.22×10^{-4} M, 1.91×10^{-5} a 1.15×10^{-4} M y 6.4×10^{-5} a 1.2×10^{-4} M, respectivamente, no es dependiente

de la concentración, ya que la aceleración es similar. Estas observaciones se reflejan al calcular el IR (Tabla IV).

El hecho de que en el caso del MTZ y sus 3 análogos, **A**, **B** y **C** en los tratamientos con la mezcla S9, se hayan obtenido diferencias significativas (al aplicarle la prueba de X^2) en las células de tercera división (M3) implica que se está provocando aceleración del ciclo celular lo que podría significar que sus metabolitos son capaces de interactuar con proteínas claves de la regulación del ciclo celular, específicamente con las que participan en G1/S. Esta explicación puede apoyarse con base en datos descritos en la literatura que proponen que cuando existe un desequilibrio entre la relación de fosforilación y desfosforilación de proteínas, provocado por la unión de agentes químicos, conduce a desregular el ciclo celular. Esta alteración puede originarse en los sitios de unión de las proteínas (que forman dímeros con otras proteínas) ya que una vez sustituido por una molécula extraña, el sitio de unión de la proteína no es reconocido por su sustrato para pasar de un estado inactivo a activo o viceversa, lo que trae como consecuencia cambios conformacionales en dichas proteínas y por consiguiente el descontrol del ciclo celular manifestado en un arresto celular o en una aceleración (Murray y Hunt 1993).

Cabe agregar que los cambios en la fosforilación de proteínas conducen a la transcripción de **genes de respuesta temprana** que codifican a los factores de transcripción los cuales inducen a la transcripción de **genes de respuesta tardía**, cuyos productos son ciclinas de G₁ y de cdc2/28 que interactúan con otras para producir proteínas cinasas activas. Estas cinasas se cree que tienen dos funciones: inactivan los genes supresores de tumores que refrenan el ciclo celular y activan la replicación del ADN; por lo tanto, controlan los puntos de restricción de la célula (Murray y Hunt 1993).

Es importante comentar que en el trabajo realizado por Elizondo (1993), con relación al daño genotóxico que provoca el MTZ en linfocitos de sangre periférica de individuos tratados, se encontró un aumento significativo de aberraciones cromosómicas, rompimientos que ocurren en ambas cromátidas, los cuales se duplican después del tratamiento, es decir, que el MTZ actúa antes de la síntesis. Con este dato, es posible apoyar que el MTZ y sus análogos puedan unirse a proteínas claves del ciclo celular durante la fase G₁/S y que además, la falta de inducción de ICH pueda deberse a esto.

Por otro lado, este mismo autor, demuestra que existe una relación directamente proporcional entre el incremento de rompimientos y el aumento del índice de replicación.

El significado biológico de esta correlación probablemente radique en que al aumentar la velocidad de división, se incrementan la probabilidad de que la célula cometa más errores, careciendo el sistema reparativo de la eficiencia necesaria para corregirlos, tanto por el incremento en la velocidad de división como en el de los errores durante la replicación de la información genética. De hecho, se sabe que el MTZ aumenta la actividad de los mecanismos de reparación en linfocitos *in vitro* (Reitz *et al.* 1991) y en *Salmonella typhimurium* (De Meo *et al.* 1992).

A nivel bioquímico, los cambios causados por el MTZ y los compuestos A y B en la proliferación celular, únicamente en presencia de la mezcla S9, sugieren que es necesaria una biotransformación para expresar su acción. Así que el MTZ y sus análogos bajo determinada condición (concentración) probablemente al ser tóxicos para *E. histolytica*, por la actividad nitrorreductasa, también sean capaces de ocasionar este efecto en las células del huésped. Esto puede explicarse porque al citocromo P-450 generalmente se le reconoce como un catalizador de la monoxigenación y también cataliza la reducción de xenobióticos, como es el caso de compuestos nitro. Estos agentes químicos, por

ejemplo, nifurimox y benzimidazoles (N-bencil-2-nitro-1imidazol-acetamida) son usados como drogas citostáticas contra células hipóxicas de tumores y se cree que la reducción del grupo nitro es necesaria para esta actividad y/o para provocar efectos citotóxicos, siendo las enzimas que catalizan esta reacción la DT-diaforasa, la xantina oxidasa, la NADPHcitocromo P-450 reductasa y la aldehído oxidasa. Además, existen evidencias de que el P-450 participa en la reducción de ciertos compuestos nitro (Fig. 6) que involucra las siguientes etapas subsecuentes: el **grupo nitro** es reducido por la reacción de un electrón a través de NADPH-citocromo P-450 reductasa a un **radical anión nitro**. La adición de un segundo electrón y de dos protones resulta de la formación de un **compuesto nitroso**, el cual generalmente se ha considerado como un reactivo intermedio pero se ha observado raramente. Posteriormente la reducción del compuesto nitroso produce un **radical libre, hidronitróxido** y la reducción del cuarto electrón se origina de la formación de la **hidroxilamina**. Además, el P-450 interviene en la reducción de hidroxilamina a una **amina**, que es la última etapa de la nitrorreducción. Las transformaciones mediadas por el P450 de compuestos nitro tienen un significado toxicológico porque han mostrado que inducen mutaciones en bacterias y en mamíferos (Goeptar *et al.* 1995). Por tal razón, probablemente el efecto encontrado por MTZ y sus 2 análogos se debe a esta vía de nitrorreducción además de la de oxidación, ya que durante la actividad de la P-450 oxígeno reductasa se forman especies reactivas pudiendo causar daño irreversible a la célula a menos que esté presente un mecanismo efectivo de desintoxicación.

Resultados similares relacionados con el incremento en la proliferación de linfocitos *in vitro* se evidencian con otros imidazoles, tales como levamisol y cimetidina (Merluzzi *et al.* 1975, Avella *et al.* 1978). Además, se ha propuesto el uso del MTZ, levamisol y cimetidina en la inmunoterapia de tumores, porque se incrementa la respuesta inmune de los ratones. Actualmente se ha reportado una aceleración en la cinética de proliferación en individuos tratados con dosis

terapéuticas, la cual se determina en linfocitos de sangre periférica después del tratamiento con el MTZ, indicando una posible acción inmunoestimulante (Elizondo *et al.* 1994).

En resumen, por los datos obtenidos en este trabajo se puede considerar que el MTZ induce daño sobre la CPC en linfocitos humanos en concentraciones terapéuticas (3 a 6 $\mu\text{g/mL}$) (Katzung 1994) y que los compuestos **A**, **B** y **C** solo causan efecto por arriba de las dosis usuales 5-30 y 10-30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, ya que para el caso de los análogos la concentración efectiva para provocar la muerte a *E. histolytica* es de 2 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, al compararlos con el MTZ, se nota mayor daño con este.

Otra posible explicación de los efectos del MTZ relacionado con la cinética celular es la propuesta por Elizondo *et al.* (1994), de que el MTZ pueda interactuar con los receptores de histamina de los linfocitos de forma similar a la cimetidina. Esta es un antagonista del receptor de histamina tipo 2, que bloquea el factor supresor que induce la producción de histamina y origina la síntesis del interferón γ y de la interleucina-2. Por otra parte, la posible interacción del MTZ con receptores de histamina se apoya en su efecto antiulceroso y su capacidad de acrecentar la actividad contráctil del agonista histaminérgico.

Con relación al IM, sólo se presentó inhibición importante en presencia de la fracción microsómica de hígado de rata con el metronidazol y con el compuesto **B** en las concentraciones 1.75×10^{-4} M para el primero y 3.82×10^{-5} a 1.5×10^{-4} M, para el segundo. Estos datos obtenidos para el IM indican que tanto el MTZ como sus tres análogos en dosis terapéuticas no inducen citotoxicidad con y sin activación metabólica.

Con respecto al análisis cuantitativo de relación estructura-actividad (estudio de la actividad biológica de los compuestos con base en su estructura molecular

y/o propiedades fisicoquímicas) realizado por Campos *et al.* (1995) y junto con los resultados obtenidos en este trabajo se confirma que los tres análogos del MTZ tienen diferente toxicidad con relación a la del MTZ porque:

1. los tipos de sustituyente favorecen la actividad biológica debido al movimiento de electrones en las moléculas de los análogos y a la mayor disposición para ser probablemente más selectivos a las amibas que a las células del huésped.
2. los grupos de mayor tamaño que aportan un efecto estérico impiden así el giro libre de las moléculas dando como consecuencia una mayor rigidez y conformación estructural termodinámicamente diferente.
3. los productos obtenidos de la fragmentación, son distintos de los producidos con MTZ. Al colocar sustituyentes aromáticos en la posición R₁ se favorecen otros tipos de ruptura en las moléculas y por lo tanto disminuye la toxicidad y por ende el efecto genotóxico en los organismo que lo consuman.
4. no hubo efecto en la CPC e IM con el sistema de linfocitos humanos periféricos con y sin activación metabólica a dosis terapéuticas.

VII. CONCLUSIONES

Los resultados en este estudio demuestran que:

1. Los tres análogos del MTZ : 1-(p-metilfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (**A**), 1-(p-metoxifenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (**B**) y 1-(p-flúorfenacil)-2-metil-5-nitroimidazol (**C**), no presentaron efectos genotóxicos manifestados en las frecuencias de ICH en linfocitos humanos *in vitro* con y sin activación metabólica.
2. Sólo con activación metabólica los compuestos **A**, **B** y **C** revelaron un incremento significativo en la CPC e IR, aunque este efecto exclusivamente se evidenció por arriba de las dosis terapéuticas (5 a 30, 10 a 30 y 16 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente), ya que las dosis efectivas para causar la muerte a *Entamoeba histolytica* es de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para estos compuestos. Por lo tanto, se concluye que a dosis menores de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no hay efecto estimulador en la CPC sobre el huésped.
3. Los tres análogos, en presencia y en ausencia de la mezcla S9, no son citotóxicos en condiciones terapéuticas, excepto para el compuesto **B** a partir de 3.82×10^{-5} (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con activación metabólica.
4. Un solo sistema de prueba no es suficiente para asegurar que los tres análogos del MTZ sean potencialmente carcinogénicos y/o mutagénicos, ya que siguiendo las recomendaciones de la OMS, por lo menos deben usarse dos diferentes modelos de mutagenicidad para identificar carcinógenos genotóxicos que son considerados como un riesgo de cáncer en humanos.
5. Se deben utilizar métodos más adecuados y sensibles para una mejor comprensión del mecanismo de acción tanto del MTZ como de sus análogos ante el ADN.

VIII. REFERENCIAS

- Aloni-Grinstein R., Schwartz D. y Rottes V. (1995). Accumulation of wild-type p53 protein upon gamma irradiation induces a G2 arrest-dependent immunoglobulin kappa-light chain gene expression. *EMBO J.* **14**, 1392-1401.
- Ames B. N., McCann J. y Yamasaki E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**, 347-364.
- Amon Y. K., Amon G., Franke G. y Mohr C. (1981). Pharmacokinetics of metronidazole in pregnant women. *Chemotherapy* **27**, 73-79.
- Alhadeff B. y Cohen M. M. (1976). Frequency and distribution of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes. *Isr. J. Med. Sci.* **12**, 1440-1447.
- Andersen M., Binderup M. L., Jiel P. y Larsen H. (1982). Mutagenicity of metronidazole. *Arch. Pharm. Chem. Sci. Ed.* **10**, 25-44.
- Andersson K. E. (1981). Pharmacokinetics of nitroimidazoles spectrum of adverse reactions. *Scand. J. Infect. Dis.* **26**, 60-67.
- Andre L. J., Dieri F. y Abed L. (1968). Le métronidazole, amoebicide diffusable et amoebicide de contact dans le traitement de l'amibiase. *Méd. Trop. (Madr.)* **28**, 483-487.
- Ashby J. (1988). Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemical. *Mutat. Res.* **204**, 543-551.
- Atadja P., Wong H., Garkavtsev I., Veillete C. y Riabowol K. (1995). Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 8348-8352.
- Avella J., Binder H. J., Madsen J. E. y Askenase P. W. (1978). Effect of histamine H2 receptor antagonists on delayed hypersensitivity. *Lancet* **i**, 624-626.
- Bartlett J. G. (1981). Metronidazole. *Johns Hopkins Med. J.* **149**, 89-92.
- Bautz-Freese E. y Freese E. (1964). Two separable effects of hydroxylamine on transforming DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **52**, 1289 (Abstr.)
- Beard C. M., Noller K. L., O'Fallon W. M., Kurland L. T. y Dockerty M. B. (1979). Lack of evidence for cancer due to use of metronidazole. *New Engl. J. Med.* **301**, 519-522.

- Biagi F. (1988). Enfermedades parasitarias. La Prensa Médica Mexicana, México D. F. 376 p.
- Breccia A., Cavalleri B. y Adams G. E. (1982). Chemical properties and reaction mechanisms of nitroimidazoles. En: Bisgi G.L. (Ed.). The pharmacology and toxicology of 5-nitroimidazoles chemistry, application and clinical application. Plenum Press, Nueva York.
- Bruckner D. A., Bueding E. y Voge M. (1979). Lack of obligatory association between mutagenic and antitrichomonal effects of metronidazole. *J. Parasitol.* **65**, 473-474.
- Campos M. E., Meraz M., Sánchez H. y Salgado H. (1995). Amoebicidal *in vitro* activity shown by some metronidazole analogues: biological response-reduction potencial correlation. *Pharm. Res.* **12**, 639-633.
- Cantelli-Forti G., Alcardi C., Guerre M. C., Barbaro A. M. y Biagi G. L. (1983). Mutagenicity of a series of 25 nitroimidazoles and two nitrothiazoles in *Salmonella typhimurium*. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **3**, 51-63.
- Carrano A. V. y Moore D. H. (1982). The rationale and methodology for quantifying sister-chromatid exchange in humans. En: Heddle J. A. (Ed.) Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology. Academic Press., Nueva York, pp. 267-304.
- Carrano A. V. y Natajaran A. T. (1988). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.* **204**, 379-406.
- Carrano A. V., Thompson L. H., Lindl P. A. y Minkler J. L. (1978). SCE as an indicator of mutagenesis. *Nature* **271**, 551-552.
- Cavaliere A., Bacci M., Amorosi A., Del Gaudio M. y Vitali R. (1983). Induction of lung tumors and lymphomas in BALB/c mice by metronidazole. *Tumori* **69**, 379-382.
- Chessin H., McLaughlin T., Mroczkowski Z., Rupp W. D. y Low K. B. (1978). Radiosensitization, mutagenicity and toxicity of *Escherichia coli* by several nitrofurans and nitroimidazoles. *Radiat. Res.* **75**, 424-431.
- Chin J. B., Sheinin D. M. K. y Rauth A. M. (1978). Screening for the mutagenicity of nitro-group containing hypoxic cell radiosensitizers using *Salmonella typhimurium* strains TA100 and TA 98. *Mutat. Res.* **58**, 1-10.
- Connor T. H., Stoeckel M., Evrard J. y Legator M. S. (1977). The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated human and mice. *Cancer Res.* **37**, 629-633.

- Cossar P. y Julou L. (1959). Activité de 1-(hydroxy-2-ethyl)-1-méthyl-2-nitro-5-imidazole (8823RP) vis-à-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis*. Ann. Inst. Pasteur **96**, 629-633.
- Crooke S. T. y Bradner W. (1976). Mitomycin C: a review. Cancer Treat. Rev. **5**, 121-139.
- Crossen P. E., Drets M. E., Arrighi F. E. y Johnston D. A. (1977). Analysis of frequency and distribution of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. Human Genet. **35**, 345-352.
- Dameron K. M., Volpert O. V., Tainsky M. A. y Bouck N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. Science **265**, 1582-1584.
- Danielson D. A., Hannan M. T. y Jick H. (1982). Metronidazole and cancer. J. Am. Med. Assoc. **247**, 2498-2499.
- Das B. C. (1988). Factors that influence formation of sister chromatid exchanges in human blood lymphocytes. CRC Crit. Rev. Toxicol. **19**, 43-86
- Dayan J., Crajer M. C. y Deguingand S. (1982). Mutagenic activity of 4 active-principle forms of pharmaceutical drugs. Comparative study in the *Salmonella typhimurium* microsome test, and the HGPRT and Na⁺ / K⁺ ATPase systems in cultured mammalian cells. Mutat. Res. **102**, 1-12.
- Dayan J., Deguingand S., Truzman C. y Chevron M. (1987). Application of the SOS cromotest to 10 pharmaceutical agents. Mutat. Res. **187**, 55-66.
- Declerck P. J. y De Ranter C. J. (1987). Polarographic evidence for the interaction of reduced nitroimidazole derivates with DNA bases. J. Chem. Soc. Faraday Trans. I. **83**, 257-265.
- De Meo M., Vanelle P., Bernadini E., Laget M., Maldonado J., Jentzer O., Crozet M. P. y Dumenil G. (1992). Evaluation on mutagenic and genotoxic activities of 48 nitroimidazoles and related imidazol derivatives by the Ames test and the SOS chromotest. Environ. Mol. Mut. **19**, 167-170.
- Dobiás L. (1980). Human blood mutagenicity for *Salmonella typhimurium* tester strains after oral application of entizol. Mutat. Res. **77**, 357-360.
- Dobiás L., Cerná M., Rössner P. y Srám R. (1994). Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. Mutat. Res. **317**, 177-194.

- Draetta G. (1990). Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 378-383.
- Edwards D. I. y Matheson G. E. (1970). The mode of action of metronidazole against *Trichomonas vaginalis*. *J. Gen. Microbiol.* **63**, 297-302.
- Edwards D. I. (1977). The action of metronidazole in DNA. *J. Antimicrob. Chemother.* **3**, 43-48.
- Edwards D. I., Rowley D. A., Knox R. J., Skolimowski I. M. y Knight R. C. (1980). Nature of DNA damage induced by electrolytically reduced nitroimidazole drugs. En: Nelson J. D. y Grassi C. (Eds.). *Current Chemotherapy and infectious disease*. Vol I. The American Society for Microbiology. Washington, DC. 561 p.
- Elizondo A. G. (1993). Evaluación del daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica de individuos tratados con metronidazol. Tesis de Maestría. Departamento de Toxicología y Farmacología, CINVESTAV, IPN, México, D.F.
- Elizondo G., Montero R., Herrera J. E., Hong E. y Ostrosky-Wegman P. (1994). Lymphocyte proliferation kinetics and sister-chromatid exchanges in individuals treated with metronidazole. *Mutat. Res.* **305**, 133-137.
- Environmental Mutagen Society (1975). Environmental mutagenic hazards. *Science* **187**, 503-514.
- Erickson S. H., Oppenheim G. L. y Smith G. H. (1981). Metronidazole in breast milk. *Obstet. Gynecol.* **57**, 48.
- Evans H. J. y O'Riordan M. L. (1975). Human peripheral blood lymphocyte for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutat. Res.* **31**, 135-148.
- Finegold S. M. (1980). Management of anaerobic infections. *Ann. Intern. Med.* **93**, 585-587.
- Foster J. L., Conroy A. J., Searle A. J. y Wilson R. L. (1976). Metronidazole (Flagyl): characterization as a cytotoxic drug specific for hypoxic tumor cells. *Br. J. Cancer* **33**, 485-490.
- Frantz C. N. y Malling H. V. (1975). The quantitative microsomal mutagenesis assay. *Mutat. Res.* **31**, 365-380.
- Friedman F. D. (1980). Cancer after metronidazole. *New Engl. J. Med.* **302**, 519 (Abstr.)

- Galkiewicz E., Pyziak M., Chomiczewski J. y Górski T. (1979). Evaluation of mutagenicity of metronidazole and misonidazole on the base of lambda prophage induction and Ames test. *Radiobiol. Radiother.* **5**, 657-660.
- Gifford M. R., Ferguson R. M. y Voss B. V. (1981). Cimetidine reduction of tumor formation in mice. *Lancet* **21**, 638-640.
- Goeptar A. R., Scheerens H. y Vermeulen N. P. E. (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **25**, 25-65.
- Goldring J., McNaught W., Scott A. y Gillespie G. (1975). Prophylactic oral antimicrobial agents in selective colonic surgery. *Lancet* **2**, 997-101.
- González F. J. y Gelboin H. V. (1993). Role of human cytochrome P-450s in risk assessment and susceptibility to environmentally based disease. *J. Toxicol. Environ. Health* **40**, 289-308.
- Graña X. y Reddy P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth supressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKIs). *Oncogene* **11**, 211-219.
- Gray M. S., Kane P. O. y Squires P. (1961). Further observations on metronidazole. *Br. J. Vener. Dis.* **37**, 278-279.
- Harris C. C. (1993). p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assesment. *Science* **262**, 1980-1981.
- Hartley-Asp B., Mitelman F. y Ursing B. (1981). The absence of clastogenic effect during long term and short term treatment with metronidazole. *Mutat. Res.* **85**, 237-238.
- Hartmann A., Herkommer K., Glück M. y Speit G. (1995). DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with the single-cell gel test (Comet Assay). *Environ. Mol. Mutagen.* **25**, 180-187.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. y Harris C. C. (1991). p53 mutation in human cancers. *Science* **253**, 49-53.
- Hopkin J. M. y Evans H. J. (1980). Cigarette-smoke induced DNA damage and lung cancer risks. *Nature* **283**, 388-390.
- Hugget R. J., Kimerle A. R., Mehrie P. M. Jr. y Bergman H. L. (1992). *Biomarkers biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress.* Lewis Publishers, USA. 347 p.

- IARC (1987). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Suppl. 7. International Agency for Research on Cancer; Lyon France. pp. 250-251.
- Ings R. M. J., McFadzean J. A. y Ormerod W. E. (1974). The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other microorganisms. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1421-1429.
- Jokipii L. y Jokipii A. M. (1980). *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to metronidazole and tinidazole. *J. Infect. Dis.* **141**, 317-325.
- Jokipii A. M., Myllyla V. V., Hokkanen E. y Jokipii L. (1977). Penetration of the blood barrier by metronidazole and tinidazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **3**, 239-245.
- Katzung B.G. (1994). *Farmacología básica y clínica*. El manual moderno, México, D.F., 1260 p.
- Kedderis G. L. y Miwa G. T. (1988). The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. *Drug. Metab. Rev.* **19**, 33-62.
- Khambatta R. B. (1971). Metronidazole in giardiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **65**, 487-489.
- Kirschner M. (1992). The cell cycle then and now. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 281-285.
- Knight R. C., Skolimowski Y. M. y Edwards D. I. (1978). The interaction of reduced metronidazole with DNA. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 2089-2093.
- Knox R. J., Knight R. C. y Edwards D. I. (1981). Misonidazole-induced thymidine release from DNA. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1925-1929.
- Knox R. J., Knight R. C. y Edwards D. I. (1983). Studies on the action of nitroimidazole drugs. *Bioch. Pharmacol.* **32**, 2149-2156.
- Koch R. L. y Goldman P. (1979). The anaerobic metabolism of metronidazole forms N-(2-hydroxyethyl)-oxamic acid. *J. Pharmacol. Exp. Theor.* **208**, 406-410.
- Koch R. L., Beaulieu B. B. Jr., Chrystal E. J. T. y Goldman P. (1981). A metronidazole metabolite in human urine and its risk. *Science* **211**, 398-400.
- Krause J. R., Ayuyang H. Q. y Ellis L. D. (1985). Occurrence of three cases of carcinoma in individuals with Crohn's disease treated with metronidazole. *Am. J. Gastroenterol.* **80**, 978-982.

- Lambert B., Lindblad A. y Ringborg U. (1979). Absence of genotoxic effects of metronidazole and two of its urinary metabolites on human lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* **78**, 281-287.
- Lambert B. y Lindblad A. (1980). The effects of metronidazole of the frequency of sister chromatid exchanges and chromosomal aberration in human lymphocytes *in vitro in vivo*. *Mutat. Res.* **74**, 230-
- Lambert B., Ringborg U., Harper E. y Lindblad A. (1978). Sister-chromatid exchanges in lymphocytes cultures of patients receiving chemotherapy for malignant disorders. *Cancer Treat. Rep.* **62**, 1413-1419.
- Lamberti L., Bigatti P. P. y Ardito G. (1983). Cell kinetics and sister-chromatid-exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat. Res.* **120**, 193-199.
- La Russo N. F., Tomasz M., Müller M. y Lipman R. (1977). Interaction of metronidazole with nucleic acids *in vitro*. *Mol. Pharmacol.* **13**, 872-881.
- Levine A. J. (1993). The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 623-654.
- Levine A. J. (1995). Tumor suppressor genes. *Sci. Am. Science & Medicine* **1**, 28-35.
- Linmark D. G. y Müller M. (1976). Antitrichomonad action, mutagenicity and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Agents. Chemother.* **10**, 476-482.
- Liu L. F., Liu C. C. y Alberts B. A. (1980). Type II DNA topoisomerases: enzymes which unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double strands break. *Cell* **19**, 697-704.
- Loft S., Dessing M., Poulsen H. E., Sonne J., Olsen K. L., Simonsen K. y Andreasen P. B. (1986). Influence of dose and route of administration on disposition of metronidazole and its major metabolites. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **30**, 467-473.
- Loft S. (1990). Metronidazole and antipyrine as probes for the study of foreign compound metabolism. *Pharmacol. Toxicol.* **66**, Suppl 6, 3-31.
- Lumsden W. H. R., Harrison C. y Robertson D. H. H. (1988). Treatment failure in *Trichomonas vaginalis* infections in females. II. *In vitro* estimation of the sensitivity of the organism to metronidazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **21**, 555-564.

- Mahood J. S. y Wilson R. L. (1981). Failure to induced sister chromatid exchange (SCE) with metronidazole. *Toxicol. Lett.* **8**, 359-361.
- Mamber S. W., Okasinski W. G., Pinter C. D. y Tunac J. B. (1986). The *Escherichia coli* K-12 SOS chromotest agar spot test for simple, rapid detection of genotoxic agents. *Mutat. Res.* **171**, 83-90.
- Mannisto P., Karhunen M., Mattila J., Koskela O., Suikkari A. M., Heinonen P., Tuimala R. y Haataja H. (1984). Concentrations of metronidazole and tinidazole in female reproductive organs after a single intravenous infusion and after repeated oral administration. *Infect. Immun.* **12**, 197-201.
- Martelli A. A., Allavena L., Robbiano F., Mattioli F. y Giovanni B. (1990). Comparison of sensitivity of human and rat hepatocytes to the genotoxic effects of metronidazole. *Pharmacol. Toxicol.* **66**, 329-334.
- Mattila J., Nerdrum K., Rouhiainen H., Mannisto R. T., Tuovinen E., y Lamminsivu U. (1983). Penetration of metronidazole and tinidazole into the aqueous humor in man. *Chemotherapy.* **29**, 188-191.
- Merluzzi V. J., Alison M., Badger C. Kaiser W. y Cooperband R. S. (1975). *In vitro* stimulation of murine lymphoid cell cultures by levamisole. *Clin. Exp. Immunol.* **22**, 486-492.
- Meyers H. F., Jawetz E. y Goldfien A. (1978). Review of medical pharmacology. 6a. edición, 644 p.
- Minnich V., Smith M. E., Thomson D. y Kornfeld S. (1976). Detection of mutagenic activity in human urine using mutant strains of *Salmonella typhimurium*. *Cancer* **38**, 1253-1258.
- Mohtashamipur E. y Norpoth K. (1986). Excretion of mutagens in sweat and faeces of man, and in serum gastric juice and urine of rats after oral dosing of niridazole or metronidazole. *Mutagenesis* **1**, 371-374.
- Morimoto K. (1984). Proliferative kinetics and chemical induced sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. En: Tice R.R. y Hollaender A. (Eds.). Sister chromatid exchanges. 25 years of experimental research. Part B., Plenum Press, Nueva York., pp. 677-693.
- Mudri M. D., Carballo M., Labal de Vinuesa M., Gonzalez C. M. y Larripa I. (1994). Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs. III: Metronidazole (MTZ). *Mutat. Res.* **305**, 127-132.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Müller M. (1981). Action of clinically utilized 5-nitroimidazoles on microorganisms. *Scand. J. Infect. Dis.* **26**, 31-41.
- Muller R., Mumberg D. y Lucibello F. C. (1993). Signals and genes in the control of the cell-cycle progression. *Biochem. Biophys. Acta* **1155**, 151-179.
- Murray A. W. (1992). Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* **359**, 599-603.
- Murray A. y Hunt T. (1993). *The cell cycle*. Oxford University Press, Nueva York, 200 p.
- Musilova J., Michalova K. y Urban J. (1979). Sister-chromatid exchanges and chromosomal breakage in patients treated with cytostatics. *Mutat. Res.* **67**, 289-294.
- Nasmyth K. A. (1990). FAR-reaching discoveries about the regulation of START. *Cell* **63**, 117-120.
- Neal S. B. y Probst G. S. (1984). Assessment of sister chromatid exchange in spermatogonia and intestinal epithelium in Chinese hamster. *Basic Life Sci.* **29**, 613-628.
- Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyereisen R., González F. J., Coon M. J., Gunsalus Y. C., Gotah O., Okuda K. y Nebert D. W. (1993). *The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature DNA*. *Cell Biol.* **12**, 1-51.
- Nishi Y., Hasegawa M. M., Taketomi M., Ohkawa Y. e Inui N. (1984). Comparison of 6-thioguanine-resistant mutation and sister chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells with forty chemical and physical agents. *Cancer Res.* **44**, 3270-3279.
- Ostrosky-Wegman P. (1994). El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico. *Gaceta Med. Mex.* **130**, 432-437.
- Painter R. B. (1980). A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* **70**, 337-341.
- Pérez-Reyes E., Kalyanaraman E. y Mason R. P. (1980). The reductive metabolism of metronidazole and ronidazole by aerobic liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* **17**, 239-244.

- Perry P. y Wolff S. (1974). *New Giemsa method for differential staining of sister chromatids*. *Nature* **251**, 156-158.
- Popescu N. C., Amsbaugh S. C. y DiPaolo J. A. (1981). Relationship of carcinogen-induced sister chromatid exchange and neoplastic cell transformation. *Int. J. Cancer* **28**, 71-77.
- Powell S. J., McLeod I., Wilmott A. J. y Elsdon-Drew R. (1966). Metronidazole in amoebic dysentery and hepatic liver abscess. *Lancet* *ii*, 1329-1331.
- Purrott R. J. y Lloyd D. C. (1972). The study of of chromosome aberration yield in human lymphocytes as an indicator of radiation dose. 1. Techniques. *Natl. Radiol. Protect. Board, UK. NRPB-R2*.
- Ralph E. D. (1983). Pharmacokinetics of metronidazole. *Clin. Pharmacokin.* **8**, 43-62.
- Reitz M., Rumpt M. y Knitza R. (1991). DNA single strand-breaks in lymphocytes after metronidazole therapy. *Arzneim. Forch. Drug. Res.* **41**, 65-69.
- Reynolds J. E. F. (1989). *The extra pharmacopeia*. The pharmaceutical Press, Londres, pp. 666-672.
- Roe F. J. C. (1983). Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic mutagenic and teratogenic potential. *Surgery* **93**, 158-164.
- Rojas E., Herrera L. A., Monserrat S., Gonsebatt M. E., Montero R., Rodríguez R. y Ostrosky Wegman P. (1993). Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs* **4**, 637-640.
- Rosenblatt J. E. y Edson R. S. (1983). Metronidazole. *Mayo Clin. Proc.* **58**, 154-157.
- Rosenkranz H. S. y Speck W. T. (1975). Mutagenicity of metronidazole: activation by mammalian liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 520-525.
- Rosenkranz H. S. y Speck W. T. (1977). *Studies on the significance of the mutagenicity of metronidazole of Salmonella typhimurium*. En: Finegold S.M. (Ed.). *Metronidazole/proceedings of the International Metronidazole Conference, Montreal*.

- Ross W. J. (1979). *Burger's Medicinal Chemistry*. Wolf, M.E. (Ed.), Wiley, Nueva York, Part. II, pp. 428-431
- Rowland Y. R. (1988). Factors affecting metabolic activity of the intestinal microflora. *Drug. Metab. Rev.* **193**, 243-261.
- Rowley A., Knight C., Skolimowski M. y Edwards D. I. (1980). The relationship between misonidazole cytotoxicity and base composition of DNA. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 2095-2098.
- Rustia M. y Shubik P. (1972). Induction of lung tumours and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J. Natl. Cancer Inst.* **48**, 721-729.
- Salgado H. Campos M. E., y Rencillas G. (1994). Cálculo de algunos parámetros fisicoquímicos de análogos al metronidazol relacionados con su actividad biológica. *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. Mex.* **39**, 133-142.
- Shaw P., Boverly R., Tardy S., Sahli R., Sordat R. y Costa M. (1994). Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4495-4499.
- Snell K. y Mullock B. (1987). *Biochemical toxicology*. IRL Press., Washinton D.C. 1era. Edic. 286 p.
- Speck W. T., Stein A. B. y Rosenkranz H. S. (1976). Mutagenicity of metronidazole activation of mammalian liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 520-525.
- Stone H. B. y Whithers H. R. (1974). Tumor and normal tissue response to metronidazole and irradiation in mice. *Radiology* **113**, 441-445.
- Takehisa S. (1982). Induction of sister chromatid exchange by chemical agents. En: *Sister chromatid exchange*. S. Wolff (Ed.) Wiley, Nueva York, pp. 87-143
- Tally F. P., Sutter V. L. y Finegold F. I. (1975). Treatment of anaerobic infections with metronidazole. *Antimicrobial Agents Chemother.* **236**, 662-670.
- Templeton R. (1977). Metabolism and pharmacokinetics of metronidazole. En: S.M. Finegold (ed.). *Metronidazole*. Excerpta Medica, Amsterdam, 28 p.
- Tu Y. H., Wang Y., Allen L. V. Jr., Albers D. D. y Gorgin M. K. (1990). Pharmacokinetics of metronidazole administered intravenously to male rats. *Int. J. Pharmaceut.* **61**, 119-125.

- Tyson J., Novak B., Odell G. M., Chen K. y Thron C. D. (1996). Chemical kinetic theory: understanding cell-cycle regulation. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 89-106.
- Voogd C. E., Van der Stel J. J. y Jacobs J. A. (1974). The mutagenic action of nitroimidazoles, I. metronidazole, nimorazole, dimetridazole and ronidazole. *Mutat. Res.* **26**, 483-490.
- White A. D. y Hesketh L. C. (1980). Method utilizing human lymphocytes with *in vitro* metabolic activation for assessing chemical mutagenicity by sister chromatid exchange analysis. *Mutat. Res.* **18**, 885-893.
- Willson R. L., Cramp W. A. e Ings R. M. J. (1974). Metronidazole ("Flagyl"): mechanism of radiosensitization. *Int. J. Radiat. Biol.* **26**, 557-569.
- WHO/IPCS (1985). Environmental Health Criteria 46. Guidelines for the study of genetic effects in human populations. Introduction. 110 p.
- Wood B. A. y Monro A. M. (1975). Pharmacokinetics of tinidazole and metronidazole after single large oral doses. *Br. J. Vener. Dis.* **51**, 51-60.
- Zahoor A., Lafleur M. V. M., Knight R. C., Loman H. y Edwards D. I. (1987). DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 3299-3304.
- Zurkov V.S. y Yakovenko K.N. (1976). The culture of human lymphocytes as a test subject for evaluation of mutagenic activity of chemicals. *Mutat. Res.* **41**, 108-112.