

03086

1
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

SUSCEPTIBILIDAD INDIVIDUAL A LOS EFECTOS
INMUNOESTIMULADORES DEL METRONIDAZOL.
POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A
M. en C. GUILLERMO ELIZONDO AZUELA

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman. Su realización estuvo apoyada por los donativos 030383 y 030304 de PADEP. El sustentante es becario del CONACyT.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

A mis padres Susana y Jorge
A mis hermanas Gabriela y Renata

A Libia

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Ostrosky por sus enseñanzas, confianza y apoyo, pero sobretodo por su amistad.

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dra. Ana Flisser y Dr. Enrique Hong por sus valiosos comentarios, críticas y orientación durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del Jurado: Dra. María Eugenia Gonsebatt, Dra. Ana Flisser, Dr. Enrique Hong, Dr. Gonzalo Martínez, Dr. Rafael Saavedra y Dr. Ismael Lares por sus sugerencias y correcciones al presente trabajo.

Al Dr. Rafael Saavedra por obsequiarme las células CTLL-2 y por su orientación en el manejo de éstas y los estudios en los que fueron utilizadas.

A Daniel Menéndez por su ayuda y valiosa colaboración.

A la Dra. Sofia Díaz por su eficiente labor como Coordinadora del Proyecto de Ciencias Fisiológicas, gracias al cual la presente tesis llegó a buen término.

A mis compañeros de laboratorio: Auro, Maricha, Regina, Silvia, Monse, Angélica, Rosaelena, Libia, Paty R., Paty G., Patricia R., Ana, Mahara, Miriam, Vicky, Gabi, Rocío, Carol, Tzutzuy, Juliana, Martha Laura, Martha, Esperanza, Emilio, Luis, Pavel, Daniel, Isidro, Cuauhtémoc y Alejandro, con quienes me divertí trabajando todos los días de los últimos 4 años.

A Diego y a Ramírez por su amistad y su siempre disposición a ayudarme.

A Lupita, Irma y Celis por su apoyo, ayuda y amistad incondicional.

INDICE

	Página
RESUMEN -----	1
SUMMARY-----	2
INTRODUCCION-----	3
Biotransformación-----	3
Farmacogenética-----	5
El metronidazol-----	7
Mecanismos de acción-----	7
Farmacocinética-----	8
Toxicidad-----	9
El sistema inmune-----	10
Los linfocitos B-----	11
Los linfocitos T-----	11
La histamina-----	14
La histamina y el sistema inmune-----	16
El factor de supresión dependiente de histamina (HSF)-----	17
El sistema inmune e imidazoles-----	18
HIPOTESIS-----	21
PROPOSITO Y OBJETIVOS-----	23
MATERIAL Y METODOS-----	25
Cultivos de sangre entera-----	25
Tratamientos-----	25
Preparación de laminillas-----	26
Tinción de laminillas-----	26
Análisis de laminillas-----	27
Estimación de la Bmax y Kd-----	28
Evaluación de los diferentes tipos de leucocitos-----	28
Cultivo de linfocitos-----	29
Determinación de interleucina 2-----	29
Cultivo de células CTLL-2-----	30
Tratamientos-----	31
Determinación del HSF-----	31
Tratamientos-----	32
Estadística-----	33
RESULTADOS-----	34
Efecto de los imidazoles sobre la proliferación linfocitaria-----	34
Efecto de la histamina y la cimetidina sobre el índice mitótico y el índice de replicación-----	34
Efecto del metronidazol, sus metabolitos y el imidazol sobre el índice mitótico y el índice de replicación-----	38
Evaluación de la actividad mitogénica de los compuestos imidazólicos-----	41

Determinación de las frecuencias de los diferentes tipos de leucocitos-----	41
Determinación de la Kd y Bmax de la histamina, cimetidina, metronidazol, el metabolito metil-hidroxiado y el imidazol-----	42
Estudios de antagonismo-----	43
Efecto bloqueador de la cimetidina sobre la inhibición histaminérgica-----	43
Efecto bloqueador del metronidazol sobre la inhibición histaminérgica-----	46
Efecto bloqueador del metabolito metil-hidroxiado sobre la inhibición histaminérgica-----	48
Km y Bmax de la histamina obtenidas de los estudios de antagonismo-----	51
Acción de los compuestos imidazólicos sobre la secreción de IL-2-----	52
Efecto de la histamina, cimetidina, metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado sobre la respuesta de las células CTLL-2 a la IL-2-----	52
Determinación del tiempo óptimo de cultivo para el ensayo de IL-2-----	53
Efecto de la histamina, cimetidina, metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado sobre la secreción de la IL-2-----	54
Acción de los compuestos imidazólicos sobre la liberación del HSF-----	57
Evaluación del efecto del medio de cultivo tratado con los diferentes compuestos imidazólicos sobre la proliferación linfocitaria-----	57
Efecto de los compuestos imidazólicos sobre la liberación del HSF-----	58
DISCUSION-----	61
Conclusiones-----	72
Perspectivas-----	73
BIBLIOGRAFIA-----	76
APENDICE-----	82

RESUMEN

El metronidazol es un agente usado para el tratamiento de infecciones parasitarias, generalmente para la amibiasis. Estudios recientes muestran que el tratamiento con este medicamento incrementa la respuesta mitogénica de los linfocitos a la fitohemaglutinina (PHA). También se observó una susceptibilidad individual a dicho efecto.

La susceptibilidad a los efectos inmunoestimuladores del metronidazol pudieran deberse a un polimorfismo en su biotransformación ya que ésta es llevada a cabo por el citocromo P-450 polimórfico 1A1. El producto de dicha biotransformación es el metabolito metil-hidroxilado, el cual es más potente en sus efectos inmunoestimuladores que el compuesto original.

El metronidazol y sus metabolitos comparten estructuras químicas similares con la histamina (anillo de imidazol) y funcionales y estructurales con la cimetidina (antagonista H₂), por lo que el metronidazol y sus metabolitos podrían actuar a través de un bloqueo de la actividad inhibitoria de la histamina sobre el sistema inmune. Esta inhibición histaminérgica está mediada por receptores H₂ a través de la inhibición de la síntesis de la interleucina 2 (IL-2) y del interferón gama en los linfocitos TH1 y de la liberación del factor de supresión dependiente de histamina (HSF) de los linfocitos T-supresores.

En el presente estudio se evaluaron los efectos de la cimetidina, el imidazol, el metronidazol y sus metabolitos metil-hidroxilado y carboxilado sobre la respuesta mitogénica de los linfocitos a la PHA. También se evaluaron los posibles efectos bloqueadores de la cimetidina, el metronidazol y su metabolito metil-hidroxilado sobre la supresión inmunológica de la histamina a nivel de la respuesta mitogénica, síntesis de IL-2 y secreción del HSF.

La cimetidina, el metronidazol y el metabolito metil-hidroxilado bloquean los efectos inhibidores de la histamina de una manera no-competitiva, por lo que no están actuando a nivel del sitio activo del receptor H₂. A excepción del metabolito carboxilado, el resto de los compuestos incrementan la respuesta mitogénica de los linfocitos con el siguiente orden respecto a su potencia: cimetidina > imidazol = metabolito metil-hidroxilado > metronidazol.

Sólo la cimetidina bloquea los efectos inhibitorios de la histamina sobre la síntesis de IL-2. También bloquea, junto con el metabolito metil hidroxilado, la liberación del HSF. Sin embargo, respecto a este último punto, se observó una importante variabilidad interindividual a los efectos bloqueadores del metronidazol y su metabolito metil-hidroxilado.

SUMMARY

Metronidazole is an agent used for the treatment of amebiasis. Recent studies have shown that metronidazole treatment increases the lymphocyte mitogenic response to phytohemmagglutinin (PHA). Also, it has been observed an individual susceptibility to such effect.

The susceptibility to the metronidazole immunostimulatory effects could be due to its polymorphic biotransformation, since it is carried on by the 1A1 polymorphic P-450 cytochrome. The biotransformation product is the hydroxy-methyl metabolite which is more potent on the immunostimulatory effects than the parental compound.

Since metronidazole and its metabolites have similar structures with the histamine (imidazole ring) and functional and structural similarities with cimetidine (H_2 antagonist), they could act through the blockage of the histamine inhibitory activity on the immune system. This histaminergic inhibition is through the interaction of H_2 receptors by the interleukin 2 (IL-2), and interferon gamma synthesis inhibition on TH1 lymphocytes and through the histamine suppressor factor (HSF) release from T suppressor lymphocytes.

In the present study were evaluated the cimetidine, imidazole, metronidazole and its hydroxy-methyl and carboxy metabolites effects on the lymphocyte mitogenic response to PHA. Also, were evaluated the possible blockage of histaminergic effects on the mitogenic response, IL-2 synthesis and HSF release by cimetidine, metronidazole and the hydroxy-methyl metabolite.

The cimetidine, metronidazole and the hydroxy-methyl metabolite block the histamine inhibitory effects in a no-competitive way, so they are not acting at H_2 active site level. Except for the carboxy metabolite the rest of the compounds increases the lymphocyte mitogenic response in the next potency order: cimetidine > imidazole = hydroxy-methyl metabolite > metronidazole.

Only cimetidine blocks the histamine inhibitory effects on the IL-2 synthesis. Cimetidine and the hydroxy-methyl metabolite block the HSF release. However an important interindividual variability to the metronidazole and its hidroxy-methyl metabolite block effects, respect to HSF release, was observed.

INTRODUCCION

Los seres humanos estamos expuestos a una gran cantidad de agentes químicos contenidos en desechos industriales, medicamentos y alimentos. Algunos de ellos son tóxicos, mutagénicos o carcinogénicos. Estos químicos o xenobióticos pueden ser de origen natural o artificial. En general, aquéllos con características lipofílicas son más fácil y rápidamente absorbidos por la piel, el sistema gastrointestinal o los pulmones. La exposición a estos agentes, ya sea de una manera constante o intermitente, resultará en una acumulación de los mismos en el cuerpo humano a menos que haya una eliminación efectiva. La eliminación o excreción de químicos depende, entre otras cosas, de su grado de solubilidad en el agua. Los compuestos lipofílicos tienden a penetrar las membranas celulares siendo difícil su eliminación, mientras que los compuestos hidrofílicos son más fácilmente excretados.

Las células presentan mecanismos bioquímicos a través de los cuales es posible convertir un compuesto lipofílico a un producto hidrofílico. Este proceso enzimático es conocido como biotransformación, cuyo producto, el metabolito, es más hidrofílico que el compuesto original y por lo tanto con menor capacidad de penetrar las membranas celulares, disminuyendo su reabsorción, distribución y aumentando su eliminación.

Biotransformación

Una gran cantidad de enzimas son capaces de llevar a cabo la biotransformación de compuestos extraños al cuerpo humano (xenobióticos). Las reacciones enzimáticas

catalizadas por estas enzimas han sido clasificadas en dos tipos: de Fase I y de Fase II. Las primeras 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 reacciones de Fase II son reacciones biosintéticas en las que un xenobiótico o un metabolito derivado de las reacciones de Fase I es unido a moléculas endógenas como el ácido glucurónico, glutatión y sulfato, entre otras, formando los llamados conjugados, aún más hidrofílicos y por lo mismo más fácilmente eliminables.

El sistema enzimático más importante involucrado en las reacciones de Fase I, es el citocromo P-450. Se le denomina así porque en su estado reducido forma un complejo con monóxido de carbono cuya absorbancia máxima de luz es a 450 nm. Este sistema enzimático está constituido por la NADPH-Citocromo P-450 reductasa y el citocromo P-450 que contiene un grupo hemo. Las 2 enzimas se encuentran embebidas en la membrana del retículo endoplásmico liso.

Existen varias isoenzimas del citocromo P-450 con diferentes afinidades por diferentes sustratos. En mamíferos, el número de genes que codifican para los diferentes citocromos P-450 va de 60 a más de 200. Se piensa que estos genes han surgido por un mecanismo evolutivo divergente de un gene ancestral hace más de 2,500 millones de años (Gonzalez y Nebert, 1990). Aunque aún no ha sido demostrado experimentalmente, se tiene la idea de que los citocromos no tienen un papel

fisiológico importante en la oxidación de endobióticos, lo que indica que su principal actividad metabolizadora es sobre sustancias presentes en el medio ambiente y en la dieta. Si la exposición a estos compuestos orientaron la evolución de los citocromos P-450, no pudieron haber sido compuestos sintetizados o manufacturados por el hombre, ya que estas actividades no tienen más de 100 años y los procesos evolutivos involucran millones de años. La única explicación posible, hasta ahora, es la interacción planta-animal, permitiendo que estos últimos desarrollaran mecanismos de detoxificación con una mayor variedad de citocromos P-450. Otro resultado de dicha divergencia evolutiva ha sido las diferencias genéticas entre poblaciones, lo que ha dado lugar a lo que conocemos como polimorfismo.

Farmacogenética

El estudio de la exposición a fármacos, sus efectos, mecanismos de acción y las respuestas que éstos provocan en el organismo es un área de amplia investigación cuya información es necesaria para la evaluación del riesgo a dichas exposiciones.

Independientemente de los diseños experimentales usados en estos estudios, la variabilidad individual ha sido un fenómeno constante en todos ellos. Esta información ha generado disciplinas como la farmacogenética (subespecialidad de la farmacología), que como su nombre lo indica, se dedica al estudio de los efectos de la variabilidad genética en la respuesta del organismo a fármacos.

Aunque la farmacogenética comienza a consolidarse como una disciplina, no es un nuevo campo de estudio. La relación entre las diferencias genéticas y las respuestas a fármacos se describieron al determinarse bioquímicamente variaciones enzimáticas entre los humanos, dando origen a la idea de que la variación genética es un componente importante en la respuesta no uniforme a muchos medicamentos. Esta idea se concretó cuando se demostró que los gemelos idénticos tenían un comportamiento similar en los efectos provocados por los fármacos (Vesell, 1978), sugiriendo una homogeneidad genética en la respuesta a los medicamentos.

La variabilidad genética puede influir en la biotransformación de un fármaco. Variaciones en este proceso se pueden reflejar, por ejemplo, en los niveles plasmáticos de los medicamentos, habiendo individuos con niveles bajos o altos a cierta dosis suministrada, observándose la falta de efectos terapéuticos en los primeros y efectos tóxicos en los segundos.

Ahora existen numerosos ejemplos de dichas variaciones como son las deficiencias en la aldehído deshidrogenasa y el rubor provocado por el alcohol, en la lactasa y la intolerancia a la lactosa y en la pseudocolinesterasa y la inactivación de la succinilcolina. Deficiencias en la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa provoca la falta del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido y en consecuencia del glutatión reducido. Este último es necesario para evitar la oxidación de la membrana celular y mantener su integridad. Esta deficiencia la presentan más de 100 millones de personas

(Beiguelman, 1983), las cuales corren el riesgo de sufrir crisis hemolíticas.

Algunos otros polimorfismos se han identificados a nivel de los citocromos P-450 1A1, 2D6 y de enzimas de segunda fase como la N-acetil transferasa, los cuales se han relacionado con susceptibilidades a efectos tóxicos por exposición a xenobióticos.

El Metronidazol

En 1955 se descubrió que la azomicina (2-nitroimidazol) tenía actividad microbica contra *Trichomonas vaginalis*. A partir de este descubrimiento se inició la síntesis de nuevos fármacos derivados de nitroimidazoles. En 1959 Cosar y Juloue sintetizaron al metronidazol (1-(β -hidroxiethyl)-2-metil-5-nitroimidazol), también con actividad microbica contra *Trichomonas vaginalis*. Su eficiencia terapéutica tuvo tanto éxito que a partir de éste se sintetizaron, usando como base al 5-nitroimidazol, nuevos fármacos como son el tinidazol y el nimorazole. Con el tiempo se observó que el metronidazol también era efectivo para el tratamiento de la amibiasis y giardiasis. Más recientemente se descubrió que actuaba como microbica en varias bacterias anaerobias como son las especies del género *Bacteroides*, lo que incrementó su espectro de acción y su uso.

Mecanismos de acción

Se propone que el mecanismo de acción del metronidazol es a través de la eliminación del potencial reductor de microorganismos anaerobios y microaerofilicos. Esto ocurre mediante la reducción del grupo nitro del metronidazol, llevada a cabo por proteínas

transportadoras de electrones como la ferredoxina, disminuyendo así los equivalentes reductores del microorganismo. Su especificidad sobre microorganismos anaerobios, microaerofílicos y células hipóxicas se debe precisamente a que las reacciones nitroreductoras son favorecidas en ambientes anaerobios. Sin embargo éste no es el único mecanismo de acción del metronidazol, también se ha propuesto que la forma nitroreducida produce lesiones bioquímicas y actúa a nivel del ADN al inhibir su síntesis, provocar la pérdida de su estructura helicoidal y rompimientos en sus cadenas. Debido a estos mecanismos de acción, el metronidazol también ha sido usado como adyuvante en radioterapias ya que existen células tumorales con un metabolismo hipóxico (Edwards 1977).

Farmacocinética

Después de la administración oral, algunos pacientes no responden al tratamiento con metronidazol y se ha observado, en dichos individuos, bajas concentraciones sistémicas de la droga. Esto puede deberse a una absorción baja a nivel del tracto gastrointestinal y/o a una rápida transformación metabólica. Su vida media en plasma es de aproximadamente 8 hr. Después de una administración oral es excretado en la orina junto con varios de sus metabolitos en diferentes proporciones. Se han identificado 4 metabolitos, además del compuesto original, en la orina de individuos tratados con metronidazol. La forma metil-hidroxiada, resultado de la oxidación del grupo metilo, representa más del 50 %. El resto está compuesto por el metabolito carboxilado y 2 glucurónidos. La biotransformación del metronidazol a sus formas

oxidadas es llevada a cabo por el sistema de citocromos P-450. Se cuenta con evidencia para pensar que la metil-hidroxilación del metronidazol es realizada por la familia de citocromos P-450 1A, específicamente el 1A1, ya que en hepatocitos de rata pretratados con 3-metilcolantreno (inductor de la familia 1A) se observa un incremento en la formación del metabolito metil-hidroxilado. Esta inducción, a su vez, es inhibida por la α -naftoflavona (inhibidor del citocromo 1A1, Loft and Poulsen, 1989).

Toxicidad

Los efectos secundarios que se han observado en individuos bajo tratamiento con metronidazol están relacionados con el tracto intestinal y son náusea, anorexia, diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza y vómito. Debido a que el metronidazol atraviesa la barrera hematoencefálica se ha observado, ocasionalmente, efectos neurotóxicos como vértigo, ataxia y pérdida de la coordinación. También se han reportado efectos genotóxicos como son la inducción de tumores en roedores (Rustia y Shubik, 1972) y mutagénesis en bacterias (Voogd *et.al.*, 1974). Muestras de orina de pacientes tratados con el medicamento inducen mutaciones en sistemas microbianos (Connor *et.al.*, 1977). Aunque la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer considera al metronidazol como un compuesto genotóxico (IARC, 1987), debido a resultados contradictorios respecto a su genotoxicidad en individuos bajo tratamiento, aún no se cuenta con una idea clara respecto a dichos efectos en humanos.

El sistema inmune

El sistema inmune es responsable, entre otras cosas, de las respuestas contra microorganismos patógenos. Su ausencia o deficiencia por enfermedades genéticas o adquiridas pone en manifiesto su relevancia en la protección contra microorganismos. Este sistema está constituido por órganos y tejidos como son el bazo, nódulos linfáticos, timo, médula ósea y sangre.

El sistema inmune está compuesto por una gran diversidad de tipos celulares, cada uno de ellos con una función importante. Los linfocitos ocupan un papel central en la maquinaria inmunológica ya que en ellos se determina la inmunidad específica. Las células que interactúan con los linfocitos tienen una importancia crítica debido a que son éstas las que llevan a cabo la presentación de los antígenos y la mediación de las funciones inmunológicas. Dentro de estos últimos tipos celulares encontramos a los monocitos, macrófagos, basófilos, células cebadas y células asesinas naturales.

Respecto a sus funciones, los linfocitos se pueden dividir en 2 clases. Los linfocitos B, que son los precursores de las células secretoras de anticuerpos, y los linfocitos T con funciones regulatorias en la activación o inhibición de ciertos tipos de respuestas inmunes, producción de anticuerpos, activación de la actividad microbicida de los macrófagos, lisis de células blanco y activación de las respuestas inflamatorias.

Los Linfocitos B

Los linfocitos B poseen proteínas membranales denominadas inmunoglobulinas (Ig), cuya función es el reconocimiento de antígenos. Estas están compuestas por 2 diferentes tipos de cadenas, unas grandes (pesadas) y otras pequeñas (ligeras). La translocación a nivel de los genes que codifican para dichas cadenas ha dado lugar a una gran variedad de Ig's y por lo tanto a un amplio espectro en la protección inmunológica. La activación de los linfocitos B ocurre cuando las Ig's reconocen los epítopes expresados por los antígenos. La activación de los linfocitos B también ocurre indirectamente a través de la ayuda de los linfocitos T y el complejo de histocompatibilidad (MHC). Cuando no es reconocido más de un epítipo del antígeno, los linfocitos B endocitan al antígeno, el cual es desnaturalizado, por lisosomas y endosomas, en pequeños fragmentos. Algunas de éstas fracciones son unidas al MHC. Existen 2 tipos de MHC, los de clase I que están asociados a péptidos provenientes de síntesis protéica interna como algunos péptidos virales, y los de clase II asociados a péptidos de proteínas extracelulares. Este complejo es la señal para que los linfocitos T activen a los linfocitos B y estos últimos se diferencien en células secretoras de anticuerpos o de memoria, reguladas por linfocinas secretadas por los linfocitos T (Weiss, 1993).

Los Linfocitos T

Los linfocitos T se derivan del tejido hematopoyético y se diferencian en el timo. Estos se subdividen en 2 grupos respecto a sus receptores membranales (Figura 1): aquéllos

cuyos receptores de células T (TCR) están compuestos por las cadenas α y β , que son la mayoría, y los que están compuestos por las cadenas γ y δ . El primer grupo se subdivide en CD4 y CD8, los primeros expresan el co-receptor CD4 y los segundos el CD8. Los CD4 llevan a cabo la regulación del sistema inmune a través de la secreción de linfocinas. Estos se dividen, a su vez, en 2 grupos respecto a las linfocinas que secretan: los TH2 secretan las interleucinas 4, 5, 6 y 10, y los TH1 la interleucina 2 (IL-2), Interferón γ y linfotoxinas (Figura 1).

Los linfocitos TH2 se encargan de la regulación de los linfocitos B mientras que los TH1 inducen la respuesta celular inmune al incrementar la actividad microbicida de los monocitos y macrófagos, aunque también tienen funciones regulatorias sobre los linfocitos B a través de las linfocinas que secretan.

Los linfocitos CD8 pueden dar origen a los linfocitos T citotóxicos (CTL) cuya función es lisar células blanco que expresen antígenos reconocidos por éstos. La lisis la llevan a cabo, entre otros mecanismos, a través de la secreción de la perforina, la cual perfora las membranas celulares, y a través de la inducción de la apoptosis en las células blanco (Weiss, 1993).

Los mecanismos inhibitorios de la respuesta inmune son tan importantes como los mecanismos activadores. Sin embargo los primeros están menos entendidos que los segundos. Los linfocitos T supresores son una subpoblación de los linfocitos CD8 cuya

función principal es la de suprimir la respuesta inmune. Esto se logra a través de la

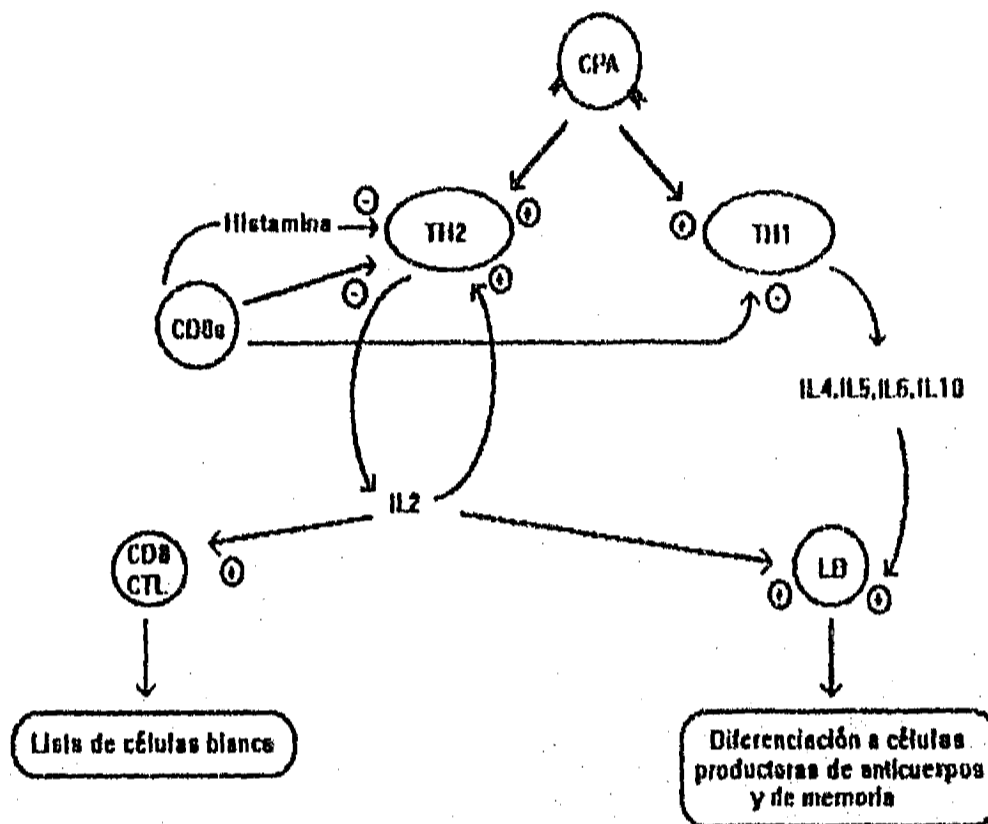


Figura 1. Interacción entre los diferentes tipos de linfocitos.
 CPA. Células presentadoras de antígenos.
 LB. Linfocitos B.
 IL. Interleucina
 CD8s. Linfocitos T supresores
 CD8-CTL. Linfocitos T citotóxicos.
 TH2, TH1. Linfocitos T ayudadores.
 + Efectos activadores
 - Efectos inhibidores.

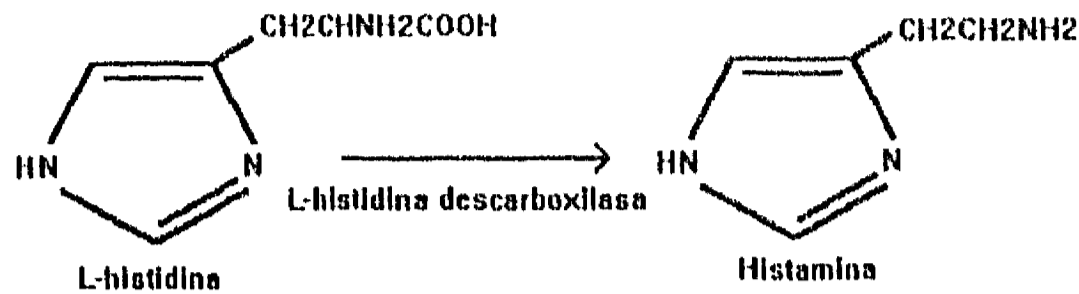
secreción de factores supresores que aún no han sido caracterizados a nivel molecular. La secreción de algunos de estos factores supresores es promovida por la histamina. También se ha sugerido que la supresión puede ser mediada por los linfocitos T citotóxicos a través de la lisis de las células presentadoras de antígenos.

La histamina

La histamina fue aislada de tejidos biológicos aproximadamente hace 60 años (Beavan, 1982). Se almacena, en la mayoría de los tejidos, en las células cebadas y se le considera como un mediador de procesos inflamatorios. También es almacenada en los basófilos (Graham *et.al.*, 1985), y se le ha asociado con plaquetas (Saxena *et.al.*, 1989), células endoteliales (Karnushina *et.al.*, 1980) y neuronas (Schwartz *et.al.*, 1980).

Además de su papel en la inflamación celular, la histamina provoca la contracción de algunos músculos lisos, como los presentes en bronquios, y la relajación de otros como los que revisten los vasos. Es un potente estimulador de la secreción del jugo gástrico y se cuenta con evidencia de que tiene un papel central como neurotransmisor y neuromodulador en el sistema nervioso (Schwartz *et.al.*, 1986).

La histamina es sintetizada por la descarboxilación de la histidina, reacción catalizada por la L-histidina descarboxilasa:



Es almacenada, formando un complejo con polisacáridos, en las células cebadas y en los basófilos. La histamina actúa a través de al menos tres receptores: H₁, H₂ y H₃. Los receptores H₁ median la contracción de músculo liso como en la tráquea, útero e íleo. La secreción de ácido de la mucosa gástrica, la respuesta cronotrópica del atrio derecho de cobayo y la inhibición de las funciones secretoras de leucocitos son algunas de las respuestas moduladas por la histamina a través de los receptores de tipo H₂. Los receptores de tipo 3 controlan la liberación de la histamina de la corteza cerebral de rata (Arrang *et.al.*, 1983).

La histamina es liberada por los basófilos y las células cebadas. Tanto los basófilos como las células cebadas tienen la capacidad de unir anticuerpos IgE a su membrana celular. Antígenos específicos para este anticuerpo incrementan la permeabilidad de la membrana, permitiendo la entrada de Ca⁺⁺ extracelular, lo que se traduce en la liberación de la histamina por exocitosis. Además de la entrada de calcio, se ha observado una reducción del AMP cíclico (AMPc) y un incremento del GMP cíclico (GMPc).

La histamina y el sistema inmune

La histamina es un mediador de las reacciones de hipersensibilidad inmediata, sin embargo también juega un papel importante como modulador de la respuesta inmune (Melmon y Khan, 1987). Inhibe las respuestas quimiotácticas de los basófilos o la liberación de la histamina de las células cebadas y basófilos a través de receptores histaminérgicos de tipo H₂ (Plaut y Lichtestein, 1982). Más recientemente se ha observado que la histamina tiene, a través de los receptores H₂, varios efectos sobre los diferentes tipos de linfocitos. Inhibe la respuesta proliferativa a mitógenos (Plaut y Lichtestein, 1982), la síntesis de anticuerpos por las células B (Melmon *et.al.*, 1981) y la producción de linfocinas (Bourne *et.al.*, 1976) como la IL-2 e interferón γ (Dohlsten *et.al.*, 1987). También inhibe la liberación de la enzima lisosomal de los neutrófilos (Weissman *et.al.*, 1974) y suprime la liberación del factor inhibitorio de la migración inducida por antígenos (Rocklin, 1976). Estos efectos inhibidores, acompañados de un incremento en el AMPc (Khan *et.al.*, 1985), no son bloqueados por antagonistas histaminérgicos de tipo H₁ pero si lo son por antagonistas histaminérgicos de tipo H₂ como la cimetidina (Suzuki y Hutchet, 1981). La histamina también puede iniciar la actividad supresora de los linfocitos T supresores al inducir la liberación del factor de supresión dependiente de histamina (HSF, Rocklin *et.al.*, 1979), el cual inhibe la respuesta proliferativa de los linfocitos T ayudadores a la estimulación mitogénica (Sansoni *et.al.*, 1985).

Estos datos indican que la histamina juega un papel importante en la regulación y

modulación inmunológica y plantea la posibilidad del uso de agonistas/antagonistas H₂ histaminérgicos en el tratamiento de enfermedades inmunes.

El factor de supresión dependiente de histamina (HSF)

Los linfocitos T pueden inhibir las funciones de los linfocitos B a través de factores supresores de antígenos (Feldmann, 1974), factores no específicos que inhiben la síntesis de ADN (Namba *et.al.*, 1977), del factor soluble supresor de la respuesta inmune (SIRS, Tadamura *et.al.*, 1976), inhibidores de IL-2 (Alam *et.al.*, 1988) y del HSF.

La histamina puede activar a los linfocitos T supresores y promover la liberación del HSF (Rocklin *et.al.*, 1979). Este factor tiene la capacidad de inhibir la producción de linfocinas (Rocklin, 1977, Rigal *et.al.*, 1979), la estimulación mitogénica (Rocklin *et.al.*, 1980) y promueve la liberación del factor inhibitorio de la migración inducida por antígenos (Rocklin, 1977). Disminuye la respuesta de hipersensibilidad retardada (Rocklin, 1976) e inhibe el desarrollo de las inmunoglobulinas de tipo G, M y A (Garavoy *et.al.*, 1983).

Todos estos efectos tienen un comportamiento dosis-respuesta y son reversibles. La secreción del HSF es promovida, también, por agonistas H₂ como la 4-metilhistamina y no así por agonistas de tipo H₁ como es la 2-metil-histamina (Rocklin *et.al.*, 1979). Por otro lado se ha observado que la cimetidina y la ranitidina, antagonistas H₂, bloquean

la liberación del HSF. Esto provoca un incremento en la proliferación de los linfocitos T. De lo anterior se deduce que estos efectos están mediados a través de receptores H₂ (Ogden y Hill, 1980, Griswold *et.al.*, 1984).

La naturaleza molecular del HSF aún no ha sido caracterizada del todo. Su peso molecular va de 25 a 40 kilodaltones. Tiene propiedades de glicoproteína ya que es sensible a la neuraminidasa, periodato de sodio, quimiotripsina y tripsina. Tiene una amplia estabilidad entre pH 3-10 y es sensible a temperaturas mayores de 80 °C (Rocklin *et.al.*, 1982).

El sistema inmune e imidazoles

Dentro de los compuestos sintéticos que modulan la respuesta inmune se encuentran algunos imidazoles. El levamisol (fenilimidazotiazol), que fue desarrollado como un agente antihelmítico, ha sido de los más estudiados. En 1971 Renoux y Renoux descubrieron que dicho imidazol aumentaba la protección de la vacuna contra la *Brucella*. Además observaron que animales tratados con esta droga, debido a infecciones provocadas por nemátodos, eran menos susceptibles a adquirir otras enfermedades de tipo infeccioso. A partir de aquí se estudio con más detalle sus posibles propiedades inmunoregulatorias. Se observó que aumentaba la respuesta de los linfocitos humanos a mitógenos o antígenos *in vitro* (Sunshine *et.al.*, 1977), la síntesis de DNA de timocitos (Merluzzi *et.al.*, 1975), y la producción de linfocinas (Whitcomb *et.al.*, 1976). Estos efectos en la proliferación de los linfocitos también son

provocados por el imidazol u otros agentes que incrementen los niveles de GMPc como lo hace el levamisol (Hadden *et.al.*, 1975). Se ha propuesto que el levamisol actúa sobre la nucleótido cíclico fosfodiesterasa, incrementando el rompimiento de AMPc y disminuyendo el rompimiento del GMPc. Este efecto, al menos, no es mediado por la inhibición de la liberación de la histamina ya que drogas como el isoproterenol y la tiofilina inhiben la liberación de la histamina en preparaciones de linfocitos mediante el incremento en la producción del AMPc (Lichtestein y Margolis, 1968), el isoproterenol a través de receptores B- adrenérgicos y la teofilina al inhibir a la AMPc fosfodiesterasa.

Varios compuestos que incrementan los niveles del AMPc también inhiben la liberación de la histamina de los basófilos, como catecolaminas, metilxantinas, prostaglandinas, la enterotoxina del cólera (Bourne *et.al.*, 1973) e incluso la histamina como un proceso de retroalimentación negativa. Esta última lo hace a través de receptores H₂ ya que la burimamida y la metiamida, antagonistas histaminérgicos de tipo 2, bloquean dichos efectos (Bourne *et.al.*, 1971). Sin embargo algunos agentes antihistamínicos como la imipramina o clorpromacina que inhiben la liberación de la histamina no incrementan los niveles de AMPc (Lichtestein y Gillespie, 1973).

Otros imidazoles han sido reportados con características inmunoregulatoras como son el tinidazol, cimetidina y metronidazol (Sen *et.al.*, 1991). Respecto a los efectos que produce el metronidazol sobre el sistema inmune se ha reportado que éste suprime la reacción de hipersensibilidad tardía como lo hacen algunos otros imidazoles (Sen

et.al., 1991). Bahr y Ullmann (1983) reportaron que el metronidazol y su metabolito metil-hidroxiado incrementan la incorporación de ³H-timidina en linfocitos de ratón, el primero 7.4 y el segundo 40.5 veces más respecto al control.

Estudios recientes, realizados en el departamento de Genética y Toxicología Ambiental del IIB, demuestran que el metronidazol incrementa la cinética de proliferación celular (Elizondo *et.al.*, 1994) y produce efectos clastogénicos (Elizondo *et.al.*, en prensa) en linfocitos de sangre periférica de individuos tratados con el medicamento. Además de los resultados anteriormente comentados se observó que, aunque hay un claro incremento en los parámetros determinados (cinética de proliferación celular y aberraciones cromosómicas), hay una variabilidad individual reflejada en individuos con una mayor sensibilidad al metronidazol respecto a los parámetros evaluados.

De estos resultados se desprenden las siguientes preguntas:

¿cuáles son los mecanismos de acción por los que el metronidazol induce un incremento en la proliferación linfocitaria?

¿la susceptibilidad individual observada se debe a diferencias inmunoregulatoras entre el metronidazol y sus metabolitos?

HIPOTESIS

El metronidazol es metabolizado a las formas metil-hidroxilada y carboxilada por el sistema de citocromos P-450. Existen reportes cuyos datos sugieren que dicha biotransformación es polimórfica (Loft *et.al.*, 1990, Stambaugh *et.al.*, 1968). También se han observado diferencias entre el compuesto original y sus metabolitos, respecto a sus efectos inmunoreguladores (Bahr y Ullmann, 1983). Debido a lo anterior, la susceptibilidad a los efectos inmunoestimuladores del metronidazol podría deberse a diferencias individuales en la biotransformación del compuesto.

Uno de los mecanismos antihelmínticos del levamisol consiste en provocar un efecto inotrópico positivo en los ganglios del helminto. El equivalente de los ganglios en los mamíferos es el corazón, en el que el efecto inotrópico positivo está mediado por receptores H_2 . Además, al igual que la cimetidina, el levamisol se usó como adyuvante en el tratamiento de cáncer debido a sus propiedades inmunoestimuladoras (Tripodi *et.al.*, 1973). El mecanismo por el cual el metronidazol y sus metabolitos inducen un incremento en la cinética de proliferación linfóide podría ser a través del bloqueo de la inhibición histaminérgica a nivel del receptor H_2 . Esta hipótesis se basa en las similitudes entre el metronidazol y sus metabolitos con la cimetidina y la histamina. Sus estructuras químicas están constituidas por un anillo de imidazol (Figura 2). El metronidazol y la cimetidina inhiben de una manera similar la reacción de hipersensibilidad retardada (Sen *et.al.*, 1991) y tienen comportamientos paralelos en su potencial inmunoestimulador y en su efecto como adyuvante en el tratamiento del

cáncer (Gifford *et al.*, 1981, Osband *et al.*, 1981). También se ha reportado que el metronidazol posee actividad antiulcerosa (Gupta *et al.*, 1976).

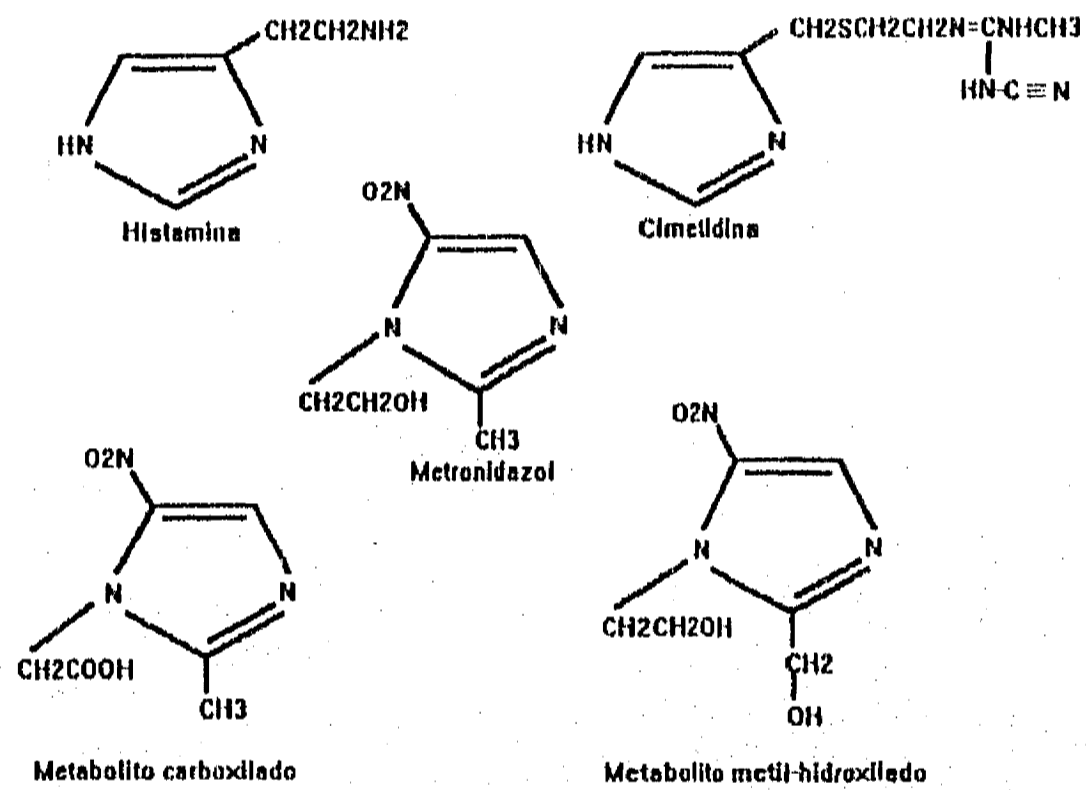


Figura 2. Estructuras químicas de la histamina, cimetidina, metronidazol y sus dos principales metabolitos, el carboxilado y el metil-hidroxilado.

PROPOSITO Y OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es estudiar y comparar los efectos inmunoestimuladores del metronidazol con sus metabolitos con el fin de determinar diferencias que pudieran explicar la susceptibilidad individual a dichos efectos. Determinar si la actividad inmunoreguladora de los compuestos usados está relacionada con la estructura de imidazol y evaluar si el metronidazol y sus metabolitos incrementan la proliferación linfocitaria a través del bloqueo de los efectos inhibitorios producidos por la histamina. Esto se llevará a cabo a través de la siguiente estrategia experimental:

-Evaluar los efectos de la histamina, el metronidazol, el metabolito metil-hidroxilado, el metabolito carboxilado, la cimetidina y el imidazol sobre la cinética de proliferación celular a través de la determinación del índice mitótico e índice de replicación en cultivos de sangre humana.

-Realizar estudios de antagonismo entre la histamina y la cimetidina, metronidazol y sus dos principales metabolitos, a través de la evaluación de la cinética de proliferación celular en cultivos de sangre humana.

-Determinar si la cimetidina, el metronidazol y sus metabolitos bloquean la liberación histaminérgica del factor de supresión dependiente de histamina en cultivos de

linfocitos humanos.

-Determinar si la cimetidina, el metronidazol y sus metabolitos bloquean los efectos inhibitorios de la histamina sobre la secreción de la interleucina 2 en cultivos de linfocitos humanos.

MATERIAL Y METODOS

Cultivos de sangre entera

En condiciones estériles, 0.5 ml de sangre se cultivaron en 6 ml de medio RPMI-1640 (Sigma) pH 6.8, suplementado con aminoácidos no esenciales (10 mM, Gibco), L-glutamina (2 mM, Sigma), Hepes (25 mM, Sigma), 5-bromodeoxiuridina (32 μ M, Sigma) y 0.2 ml de fitohemaglutinina M (PHA, Gibco).

Los cultivos se mantuvieron, por 72 hr, en una estufa a 37°C. Dos hr antes de cosechar se agregó 0.2 ml de colcemid (Gibco). Se centrifugó a 1,200 rpm (revoluciones por minuto) por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 ml de KCl 75 mM. La suspensión se mantuvo, por 20 min, en un baño a 37°C. Se centrifugó a 1,200 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en una solución fijadora (metanol-ácido acético, 3:1) y se centrifugó a 1,200 rpm por 10 min. El lavado con la solución fijadora se repitió hasta obtener un botón blanco, el cual se resuspendió en 5.0 ml de la solución fijadora y se guardó a 4°C (Ostrosky *et.al.*, 1986).

Tratamientos

Los cultivos de sangre entera fueron tratados, al inicio del cultivo, con diferentes concentraciones (ver resultados) de histamina, cimetidina, metronidazol, los metabolitos metil-hidroxilado y carboxilado, y el imidazol. Las soluciones y diluciones de los compuestos fueron preparadas en medio de cultivo RPMI. A los controles se les

agregó un volumen equivalente, de medio de cultivo RPMI, al de las soluciones de los compuestos agregados a los cultivos tratados.

En los estudios de antagonismo se agregaron, al mismo tiempo, la histamina y la cimetidina o el metronidazol o el metabolito metil-hidroxilado. Las concentraciones usadas se indican en los resultados.

Preparación de laminillas

24 hr después de fijar los botones celulares se centrifugaron a 1,200 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 0.5 ml de la solución fijadora. Con una pipeta Pasteur se homogenizó la suspensión y se goteó sobre un portaobjetos previamente enfriado en alcohol, se secó a la flama y se observó al microscopio para asegurarse de la obtención de metafases (Moorhead *et.al.*, 1960).

Tinción de laminillas

En una solución de Hoescht (1 mg/ml) preparada en agua destilada se sumergieron las laminillas por 30 min en ausencia de luz, se enjuagaron en agua y se secaron con una corriente de aire. Posteriormente se cubrieron en un amortiguador de fosfatos (Na_2HPO_4 66mM, KH_2PO_4 66 mM, pH 6.8) y se expusieron a luz negra por 1.5 hr. Las laminillas se enjuagaron en el mismo amortiguador y se sumergieron en una solución de Giemsa (Sigma) al 4% en amortiguador de fosfatos por 3 min. Se enjuagaron en agua y se secaron con una corriente de aire (Perry y Wolff, 1974).

Análisis de laminillas

La evaluación de los índices mitótico y de replicación se llevó a cabo de la siguiente manera:

-Índice mitótico (I.M.). Las preparaciones se leyeron en un microscopio fotónico a 20 aumentos. Se contaron 5,000 núcleos y se evaluó cuántos de ellos se hallaban en metafases. El valor del I.M. se determinó de la siguiente manera:

$$\text{I.M.} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de metafases}}{5,000 \text{ núcleos}}$$

-Cinética de proliferación celular. Se leyeron 100 metafases consecutivas en un microscopio fotónico a 40 aumentos, en las que se determinó primeras (M1), segundas (M2) y terceras (M3) divisiones. Se consideró primera división aquella cuyos cromosomas se encontraban teñidos completamente de oscuro, segunda división aquella cuyos cromosomas estaban conformados por una cromátida oscura y una clara, y tercera división a metafases con los dos patrones anteriormente mencionados. Con los datos obtenidos se calculó el índice de replicación (I.R.) a partir de la siguiente ecuación (Ivett y Tice, 1982):

$$\text{I.R.} = (1 (\#M1) + 2 (\#M2) + 3 (\#M3)) / \text{N}^\circ \text{ de metafases leídas}$$

Estimación de las constantes de unión máxima (Bmax) y de disociación (Kd)

La Bmax y la Kd fueron determinadas de la siguiente manera. Los valores promedios junto con sus desviaciones estándares, obtenidos de las curvas dosis-efecto, se vertieron en un programa de cómputo estadístico y gráfico llamado Instat e Inplot. Este, a través de un ajuste a la ecuación 1, calculó los valores de la Bmax y Kd.

$$1. Y = B_{max} \left[\frac{X}{K_d + X} \right],$$

donde Y representa los valores del efecto medido (índice mitótico o de replicación), X las concentraciones del compuesto, Bmax la constante de unión máxima y Kd la constante de disociación.

Evaluación de los diferentes tipos de leucocitos

Para la evaluación de los diferentes tipos de leucocitos se siguió la tinción de Wright. Se hicieron frotis de sangre de los diferentes voluntarios. La sangre se obtuvo por punción del dedo. Los frotis se fijaron en metanol absoluto por 5 min y se cubrieron de 1 a 3 min en la solución de Wright, la cual está constituida por los siguientes compuestos:

Para 200 ml: 0.6 gr de reactivo de Wright.

3.6 gr de fosfato de sodio.

2.4 gr de fosfato de potasio.

200 ml de metanol.

Posteriormente se sumergieron en una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 por 10 min, se lavaron con agua destilada y se secaron con una corriente de aire. Los diferentes tipos de leucocitos se identificaron a través de sus diferentes morfologías utilizando un microscopio fotónico a 40 aumentos.

Cultivo de linfocitos

20 ml de sangre se centrifugaron a 1,600 rpm por 30 min en un gradiente de Fycoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed). Se recuperó el plasma y el anillo con las células blancas. Estas últimas se lavaron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con aminoácidos no esenciales (10 mM, Gibco) y L-glutamina (2 mM, Gibco). Se centrifugaron a 1,200 rpm por 10 min y se resuspendieron en 2 ml de medio de cultivo RPMI-1640. Se tomaron 20 μ l del resuspendido celular, se mezcló con 1 ml de colorante vital azul de tripano (diluido 1:10 en medio RPMI) y se contó, en un hemocitómetro, el número de células recuperadas. Se llevaron a una concentración de 1×10^6 células por ml en medio de cultivo RPMI-1640 y se sembraron 3 ml por tubo. Se les agregó 200 μ l de PHA y se incubaron en una incubadora a 37 °C, 5 % de CO₂ por 48 hr. Los cultivos se centrifugaron a 1,200 rpm por 10 min, se obtuvieron los sobrenadantes y se guardaron a -20 °C.

Determinación de interleucina 2 (IL-2)

La determinación de IL-2 se realizó a través de la evaluación de la proliferación de la línea celular CTLL-2 dependiente de IL-2 según la técnica de Gillis *et al.* (1978).

Cultivo de las células CTLL-2

Las células CTLL-2 se crecieron en cajas para cultivo en un medio constituido por los siguientes elementos:

-Medio RPMI-1640

-Hepes 25 mM

-L-glutamina 2 mM

-Piruvato de sodio 2 mM

- β -mercaptoetanol 50 μ M

-10 % de suero fetal de bovino

El medio se ajustó a pH 7.4

Además se agregó al medio de cultivo 2 unidades por ml de IL-2 humana (Boehringer) preparada y diluida en el medio de cultivo. Una vez que los cultivos alcanzaron la fase logarítmica tardía se lavaron 2 veces en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, 25 mM de Hepes, pH 7.4. Se resuspendieron en el medio de cultivo a una concentración de 1×10^5 células por ml. Se incubaron por 4 hr a 37 °C. Se sembraron 100 μ l (10,000 células), por pozo, en una microplaca. Se adicionaron 100 μ l de las diluciones de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de linfocitos (previamente descongelados en un baño a 37°C). Para la curva control, en lugar de los sobrenadantes, se agregaron 100 μ l de las diluciones (hechas en medio de cultivo) de IL-2 (0.03, 0.1, 0.3 y 1.0 unidades de IL-2). Se incubaron en una incubadora a 37°C, 5 % CO₂ por 30 hr, se agregó 0.5 μ Ci de ³H-timidina por pozo y se incubaron por 18 hr

más. Se cosecharon con una cosechadora automática y se determinó la incorporación de ^3H -timidina en un contador de centelleo.

Tratamientos

Las muestras experimentales (sobrenadantes) se obtuvieron de los cultivos de linfocitos que fueron tratados con histamina, histamina + cimetidina, histamina + metronidazol e histamina + el metabolito metil-hidroxilado. Los tratamientos se hicieron al inicio del cultivo y las concentraciones usadas se indican en los resultados. Cuarenta y ocho hr después de iniciado el cultivo de linfocitos se centrifugaron a 1,200 rpm 10 min, se obtuvieron los sobrenadantes por decantación, se filtraron a través de un filtro milipore (0.22 μ) y se guardaron a -20 °C hasta ser usados.

Determinación del Factor de Supresión dependiente de Histamina (HSF)

El HSF se determinó a través del microensayo reportado por Rocklin (1977). Se cultivaron linfocitos sin PHA y con 5 % de suero autólogo. Cuarenta y ocho hr después se centrifugaron a 1,200 rpm por 10 min. Se obtuvo el sobrenadante y se dializó, a través de una membrana con un poro de 3,500 de PM, contra una solución salina 0.1 N durante 24 hr, con 2 cambios de la solución cada 12 hr. Se re-dializaron contra medio RPMI 1640 por 18 hr, se obtuvieron los dializados y se filtraron a través de un filtro milipore (0.22 μ). Los filtrados fueron suplementados con L-glutamina (2.0 mM) y suero fetal de bovino al 15 %. Se congelaron a -20 °C. El dializado se descongeló en un baño

a 37 °C, se diluyó 1:1 con medio RPMI-1640 y se usó como medio de cultivo para los linfocitos, previamente obtenidos. Estos se llevaron a una concentración de 1×10^6 células por ml. Doscientos μl del resuspendido celular (200, 000 células) más 10 μl de PHA se sembraron, por pozo, en una microplaca de cultivo y se incubaron a 37°C, 5 % CO_2 por 54 hr. Se agregó 0.5 μCi de ^3H -timidina y a las 18 hr se cosecharon con un cosechador automático. Se determinó la incorporación de ^3H -timidina en un contador de centelleo.

Tratamientos

Los cultivos de linfocitos de donde se obtuvieron los sobrenadantes fueron tratados al inicio del cultivo con histamina, histamina + cimetidina, histamina + metronidazol o histamina + metabolito metil-hidroxilado, a las concentraciones indicadas en los resultados. Los controles corresponden a los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos que no recibieron tratamiento pero sí un volumen equivalente de medio RPMI al agregado a los grupos tratados. Con la finalidad de asegurarse de que los compuestos usados fueron dializados de los sobrenadantes provenientes de los cultivos tratados, se contó con otros controles en los que se trató a los sobrenadantes provenientes de los cultivos de linfocitos sin tratamiento con los diferentes compuestos usados. Estos fueron dializados y utilizados para evaluar la proliferación linfocitaria.

Estadística

Para comparar los grupos tratados con sus respectivos controles, en los que se evaluó del índice mitótico, índice de replicación, IL-2 y HSF, se usó la prueba de *t* de Student, pareada. Para evaluar la existencia de una relación dosis-efecto se ajustaron las curvas a una línea recta y se determinó si ésta era o no estadísticamente diferente de cero. Para los estudios de antagonismo se usó un análisis de varianza.

RESULTADOS

Efecto de los imidazoles sobre la proliferación linfocitaria

Efecto de la histamina y la cimetidina sobre el índice mitótico e índice de replicación

Se determinó el efecto de la histamina sobre el índice de replicación e índice mitótico de linfocitos de sangre periférica proveniente de 3 voluntarios. En la tabla I y figuras 3 y 4 se muestran los efectos de la histamina sobre los índices mitótico y de replicación.

Tabla I. Efecto de la histamina sobre el índice mitótico e índice de replicación de linfocitos de sangre periférica.

	Índice Mitótico		Índice de Replicación	
	X	E.S.	X	E.S.
Control	0.028	± 0.003	2.11	± 0.06
Histamina (µM)				
0.01	0.025	± 0.003	2.10	± 0.05
0.10	0.022*	± 0.003	2.03*	± 0.06
1.00	0.016*	± 0.003	1.88*	± 0.01
10.00	0.011*	± 0.003	1.88*	± 0.05
100.00	0.008*	± 0.001	1.80*	± 0.04
1000.00	0.007*	± 0.001	1.68*	± 0.02

Cultivos de sangre entera, 72 hr. X = promedio, E.S. = error estándar, µM = micromolar. Promedios y errores n = 3. *p < 0.05, prueba de t de Student.

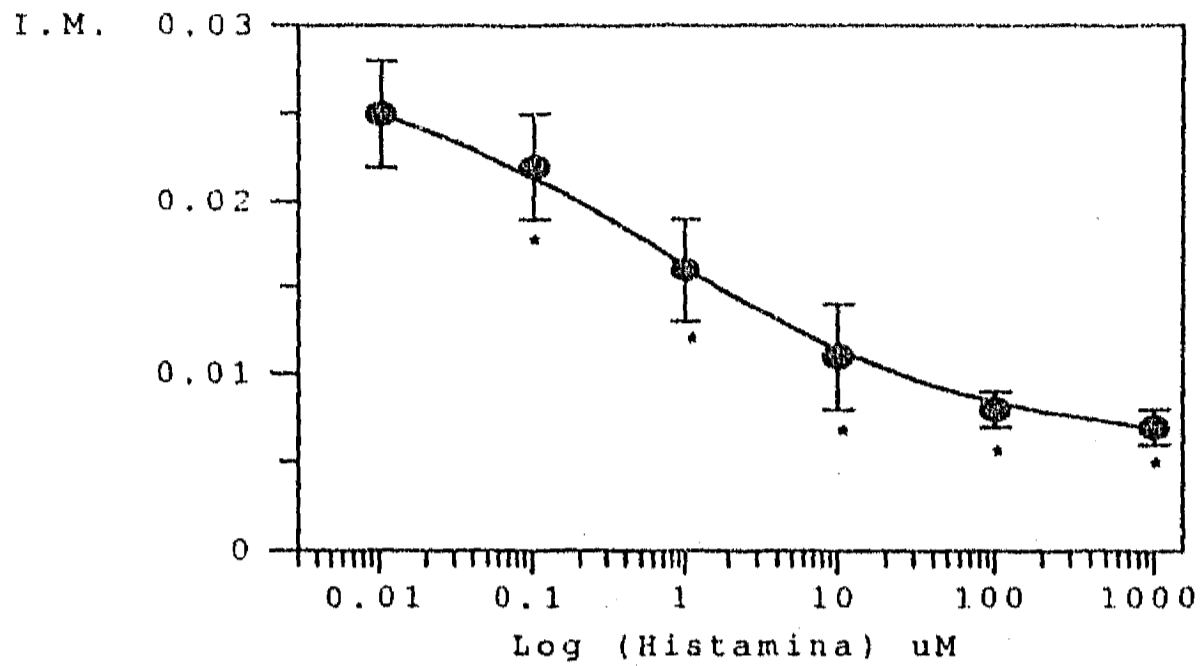


FIGURA 3. Curva dosis-respuesta del efecto de la histamina sobre la proliferación de linfocitos humanos, cultivados por 72 hr, evaluada a través del índice mitótico (I.M.). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos, correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado. Las barras de errores representan el error estándar. * $p < 0.05$, prueba de *t* de Student.

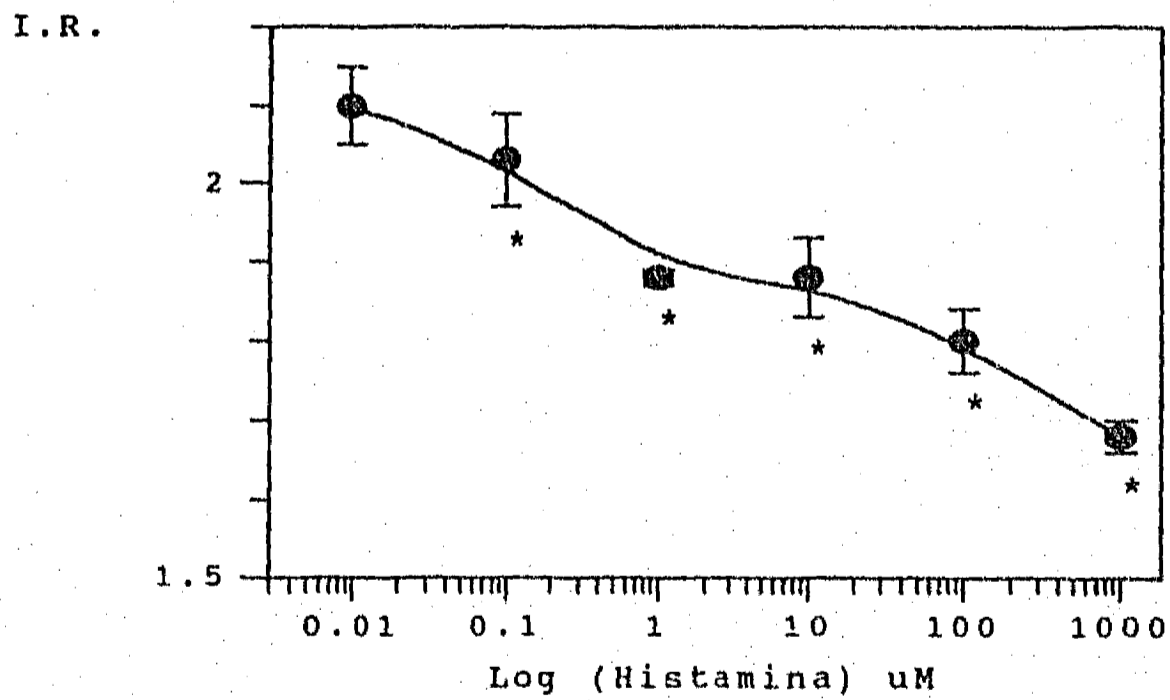


FIGURA 4. Curva dosis-respuesta del efecto de la histamina sobre la proliferación de linfocitos humanos, cultivados por 72 hr, evaluada a través del índice de replicación (I.R.). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos, correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado. Las barras de errores representan el error estándar. * $p < 0.05$, prueba de *t* de Student.

El efecto de la cimetidina sobre el índice de replicación e índice mitótico de linfocitos de sangre periférica proveniente de 3 voluntarios se presenta en la tabla II y figuras 5 y 6.

Tabla II. Efecto de la cimetidina sobre el índice mitótico e índice de replicación de linfocitos de sangre periférica.

	Índice Mitótico		Índice de Replicación	
	X	E.S.	X	E.S.
Control	0.027	± 0.005	2.11	± 0.06
Cimetidina (µM)				
0.01	0.032	± 0.006	2.19	± 0.10
1.00	0.039*	± 0.009	2.36*	± 0.03
100.00	0.045*	± 0.008	2.48*	± 0.09
1000.00	0.052*	± 0.005	2.51*	± 0.10

Cultivos de sangre entera, 72 hr. X = promedio, E.S. = error estándar, µM = micromolar. Promedios y errores n = 3. *p < 0.05, prueba de t de Student.

La histamina inhibe al índice mitótico y al índice de replicación de una manera dosis-respuesta (Figuras 3 y 4). Esta inhibición, tanto para el índice mitótico como para el de replicación, es significativa a partir de la concentración 0.10 µM (Tabla I). La cimetidina también induce sus efectos con un comportamiento dosis-respuesta, pero a diferencia de la histamina produce un incremento en los índices mitótico y de replicación (Figuras 5 y 6). Este efecto es significativo, respecto al control, a partir de la concentración 1.0 µM (Tabla II).

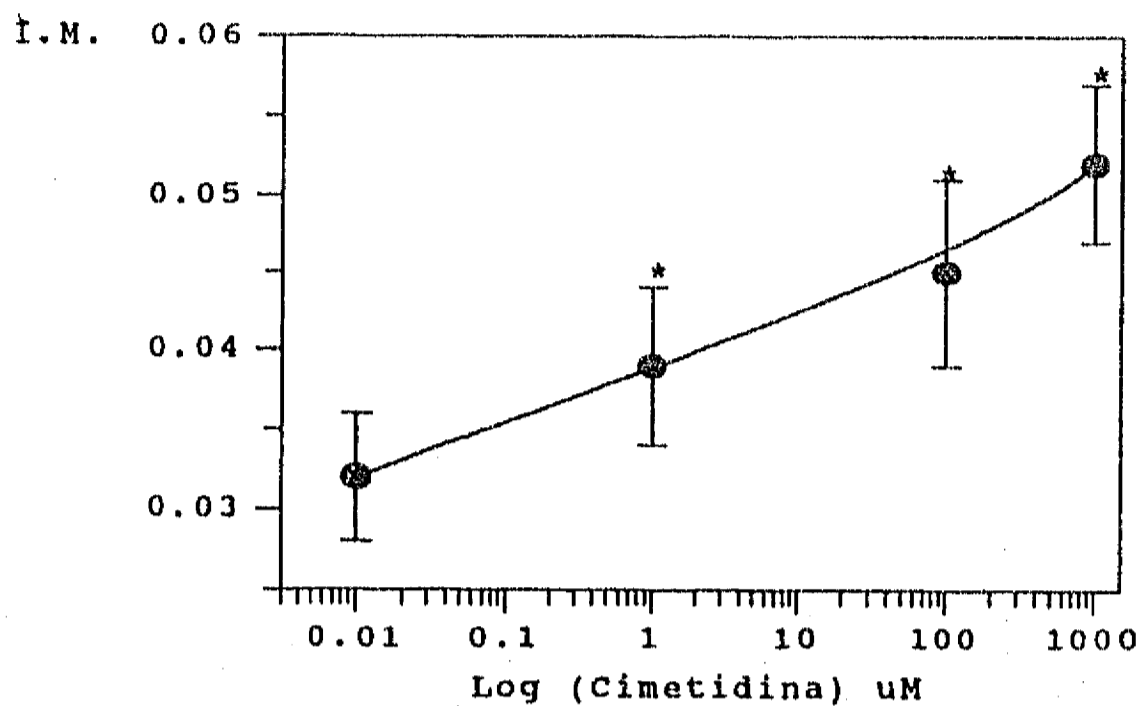


FIGURA 5. Curva dosis-respuesta del efecto de la cimetidina sobre la proliferación de linfocitos humanos, cultivados por 72 hr, evaluada a través del índice mitótico (I.M.). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos, correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado. Las barras de errores representan el error estándar. * $p < 0.05$, prueba de t de Student.

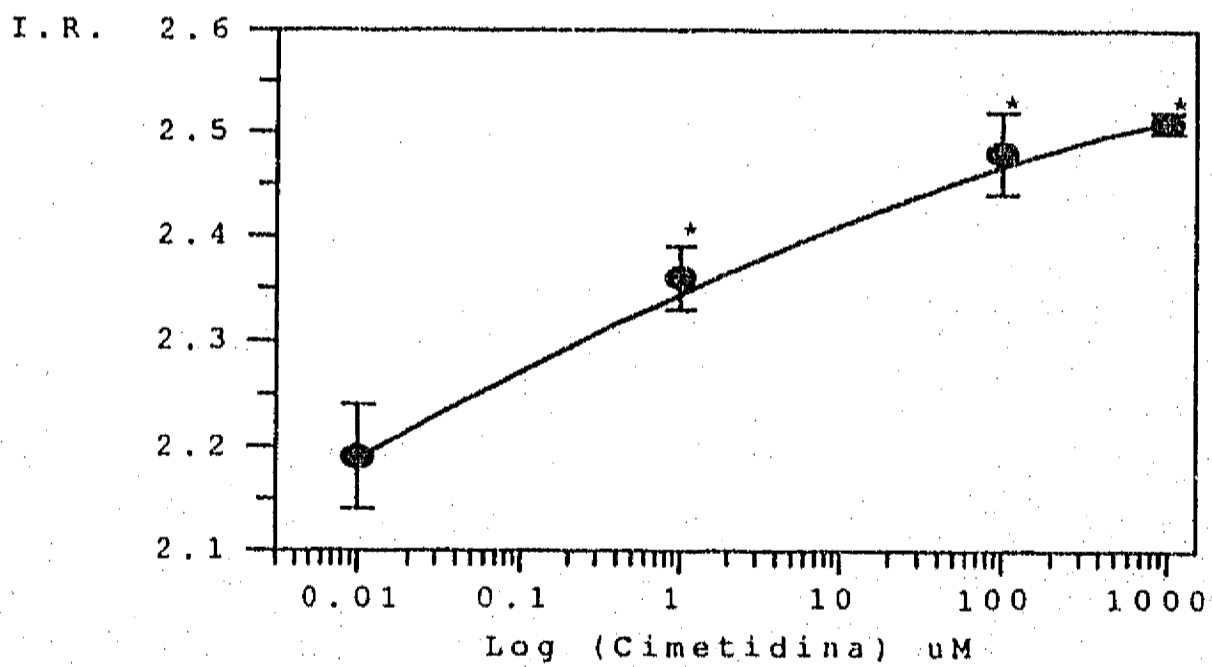


FIGURA 6. Curva dosis-respuesta del efecto de la cimetidina sobre la proliferación de linfocitos humanos, cultivados por 72 hr, evaluada a través del índice de replicación (I.R.). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos, correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado. Las barras de errores representan el error estándar. * $p < 0.05$, prueba de t de Student.

Efecto del metronidazol, sus metabolitos y el imidazol sobre el indice mitótico y el indice de replicación

Se determinó el efecto del metronidazol, sus dos principales metabolitos (las formas metil-hidroxiada y carboxilada) y el imidazol sobre el índice de replicación e índice mitótico de linfocitos de sangre periférica proveniente de 3 voluntarios. En la tabla III y IV, figuras 7 y 8 se muestran los efectos de dichos imidazoles sobre los índices proliferativos.

Tabla III. Efecto del metronidazol, sus metabolitos y el imidazol sobre el indice mitótico de linfocitos de sangre periférica.

μM	Metronidazol		MTZ-COOH		MTZ-OH		Imidazol	
	X	E.S.	X	E.S.	X	E.S.	X	E.S.
3.0	-	-	-	-	0.034*	± 0.002	0.038*	± 0.002
6.0	-	-	-	-	0.042*	± 0.001	0.043*	± 0.003
12.0	-	-	-	-	0.044*	± 0.001	0.045*	± 0.003
25.0	0.034	± 0.010	0.023	± 0.002	0.040*	± 0.001	0.048*	± 0.003
100.0	0.040	± 0.015	0.020	± 0.001	0.044*	± 0.005	0.046*	± 0.004
200.0	0.046*	± 0.009	0.021	± 0.002	0.040*	± 0.003	0.049*	± 0.004
400.0	0.057*	± 0.014	0.021	± 0.001	0.041*	± 0.002	0.049*	± 0.005
Control	0.027	± 0.005	0.022	± 0.005	0.021	± 0.001	0.021	± 0.001

Cultivos de sangre entera, 72 hr. MTZ-COOH = metabolito carboxilado, MTZ-OH = metabolito metil-hidroxiado, X = promedio, E.S. = error estándar, μM = micromolar. Promedios y errores n = 3. *p < 0.05, prueba de t de Student.

Tabla IV. Efecto del metronidazol, sus metabolitos y el imidazol sobre el índice de replicación de linfocitos de sangre periférica.

μM	Metronidazol		MTZ-COOH		MTZ-OH		Imidazol	
	X	E.S.	X	E.S.	X	E.S.	X	E.S.
3.0	-	-	-	-	2.15*	± 0.10	2.22*	± 0.05
6.0	-	-	-	-	2.26*	± 0.06	2.28*	± 0.04
12.0	-	-	-	-	2.30*	± 0.04	2.31*	± 0.04
25.0	2.23	± 0.06	2.15	± 0.04	2.34*	± 0.02	2.31*	± 0.03
100.0	2.35	± 0.11	2.17	± 0.08	2.33*	± 0.02	2.35*	± 0.03
200.0	2.38*	± 0.07	2.15	± 0.08	2.29*	± 0.06	2.37*	± 0.02
400.0	2.51*	± 0.06	2.15	± 0.09	2.26*	± 0.05	2.32*	± 0.02
Control	2.11	± 0.08	2.08	± 0.07	1.92	± 0.04	1.92	± 0.04

Cultivos de sangre entera, 72 hr. MTZ-COOH = metabolito carboxilado, MTZ-OH = metabolito metil-hidroxiado, X = promedio, E.S. = error estándar, μM = micromolar. Promedios y errores n = 3. *p < 0.05, prueba de t de Student.

El imidazol, el metronidazol y su metabolito metil-hidroxiado incrementan los índices mitótico y de replicación. Sin embargo para el metabolito metil-hidroxiado no hay un comportamiento dosis-respuesta como lo hay para el metronidazol y el imidazol. El metabolito carboxilado no provoca efectos en dichos parámetros proliferativos (Figuras 7 y 8). El imidazol y el metabolito metil-hidroxiado actúan con mayor potencia que el metronidazol ya que los primeros incrementan significativamente a los índices mitótico y de replicación desde la concentración 3 μM mientras que el metronidazol lo hace a partir de 200 μM (Tabla III y IV).

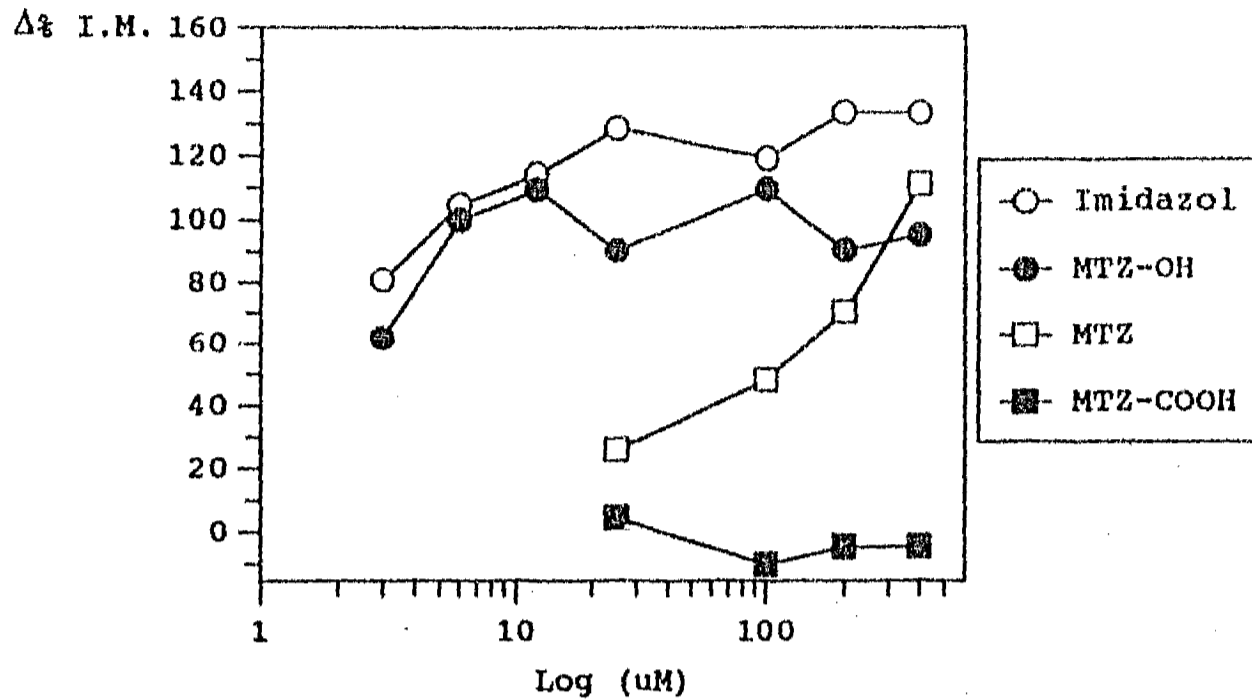


FIGURA 7. Efecto del imidazol, metronidazol (MTZ) y sus metabolitos metil-hidroxiado (MTZ-OH) y carboxilado (MTZ-COOH) sobre la proliferación de linfocitos humanos, cultivados por 72 hr, evaluada como el porcentaje del índice mitótico (I.M.) respecto al control. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado.

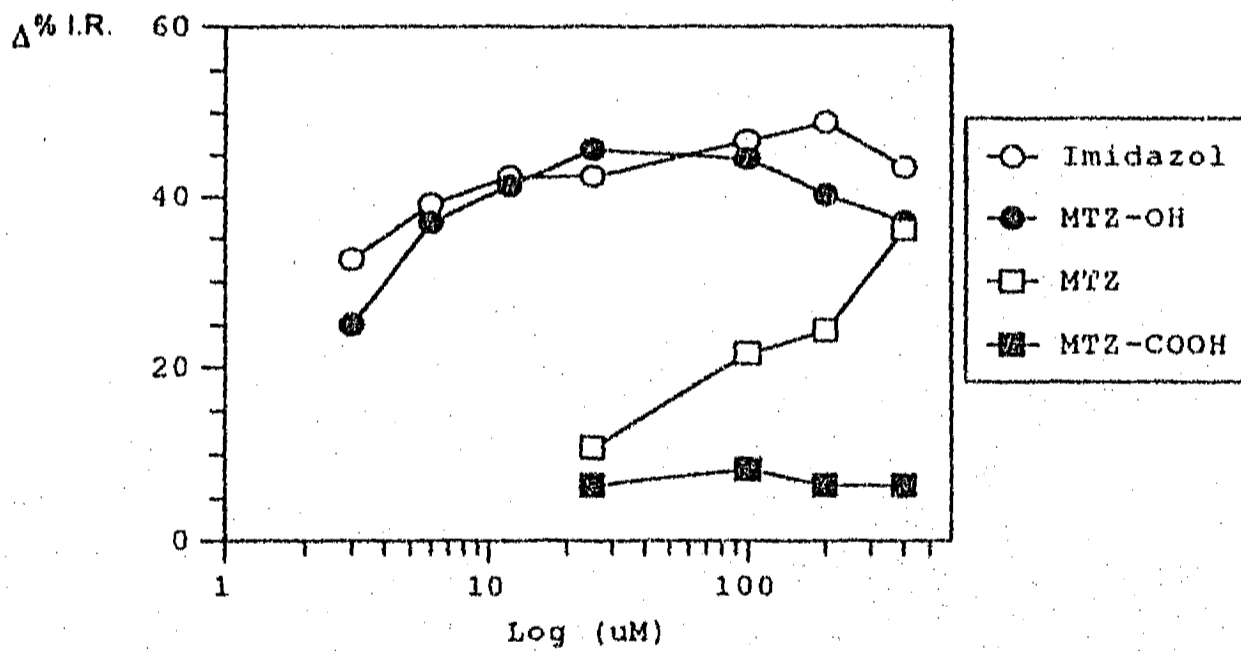


FIGURA 8. Efecto del imidazol, metronidazol (MTZ) y sus metabolitos metil-hidroxiado (MTZ-OH) y carboxilado (MTZ-COOH) sobre la proliferación de linfocitos humanos, cultivados por 72 hr, evaluada como el porcentaje del índice de replicación (I.R.) respecto al control. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado.

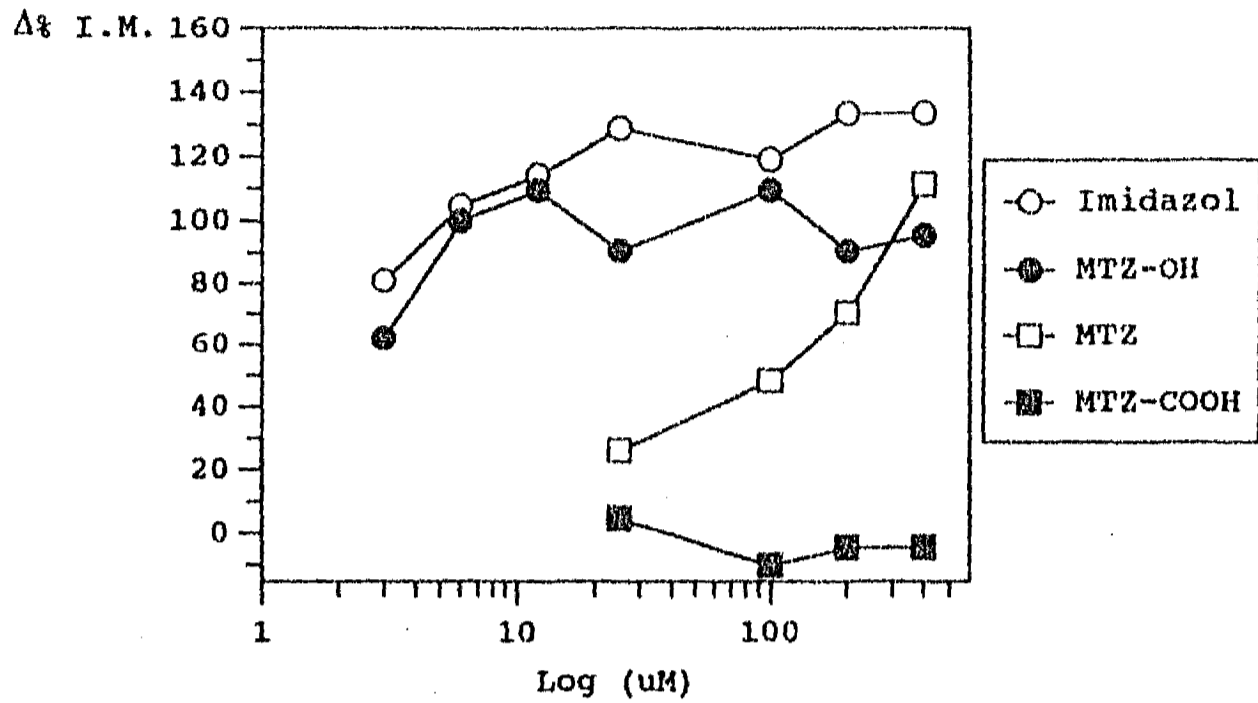


FIGURA 7. Efecto del imidazol, metronidazol (MTZ) y sus metabolitos metil-hidroxiado (MTZ-OH) y carboxilado (MTZ-COOH) sobre la proliferación de linfocitos humanos, cultivados por 72 hr, evaluada como el porcentaje del índice mitótico (I.M.) respecto al control. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado.

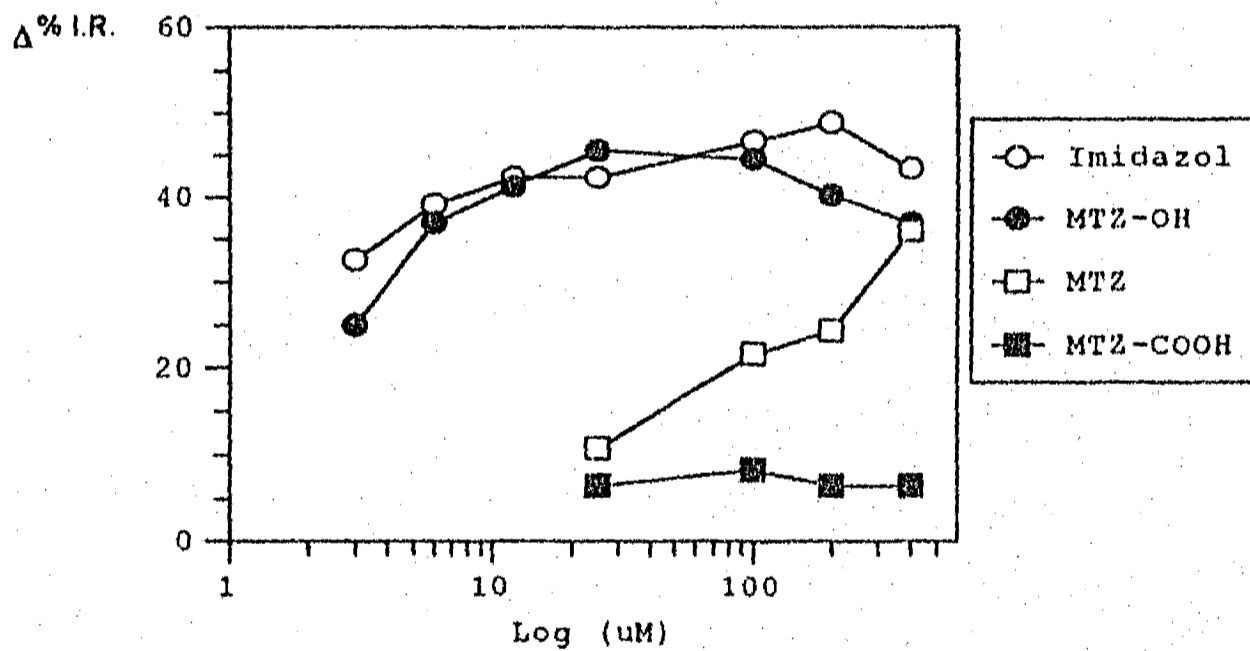


FIGURA 8. Efecto del imidazol, metronidazol (MTZ) y sus metabolitos metil-hidroxiado (MTZ-OH) y carboxilado (MTZ-COOH) sobre la proliferación de linfocitos humanos, cultivados por 72 hr, evaluada como el porcentaje del índice de replicación (I.R.) respecto al control. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado.

Evaluación de la actividad mitogénica de los compuestos imidazólicos

Para discernir si estos compuestos imidazólicos actuaban como mitógenos o como estimuladores de la respuesta mitogénica, se realizaron estudios en los que se determinó su efecto en los índices mitótico y de replicación en ausencia de PHA. Ninguno de los compuestos probados ejercen efectos mitogénicos por sí mismos. Sus efectos estimuladores en la proliferación se deben a su acción sobre la respuesta mitogénica de los linfocitos inducida por la PHA.

Determinación de las frecuencias de los diferentes tipos de leucocitos

Los compuestos probados incrementan los índices de proliferación celular de los linfocitos en cultivos de sangre periférica sin histamina exógena. Debido a que éstos carecen de actividad mitogénica y a que la hipótesis del presente estudio se basa en el bloqueo de los efectos inhibitorios de la histamina por los compuestos estudiados, se determinaron las frecuencias de los diferentes leucocitos. De entre ellos se evaluó la frecuencia de los basófilos, los cuales almacenan y secretan la histamina endógena (Tabla V).

Como se puede apreciar en dicha tabla, la frecuencia de los diferentes leucocitos de los donantes se encuentran dentro de los rangos normales. Es de especial importancia para el presente estudio que así haya sido para los basófilos.

Tabla V. Frecuencia de los diferentes tipos de leucocitos en la sangre de los donadores

	Frecuencia	Donador	Donador	Donador
	normal	1	2	3
Neutrófilos	55.0-70.0	64.5	59.0	68.0
Eosinófilos	0.5-4.0	2.0	4.0	1.5
Monocitos	4.0-8.0	7.5	8.0	9.0
Linfocitos	25-35	25.0	28.0	21.0
Basófilos	0.5-2.0	1.0	1.0	0.5

La frecuencia, por individuo, fue evaluada en 200 células.

Determinación de las constantes de disociación y de unión máxima de la histamina, cimetidina, metronidazol, el metabolito metil-hidroxiado e imidazol

En la tabla VI se presentan las constantes de disociación (K_d) y de unión máxima (B_{max}), obtenidas de los estudios en los que se evaluaron los índices mitóticos y de replicación, para los diferentes compuestos probados. No se observan diferencias entre las B_{max} de la cimetidina, metronidazol, metabolito metil-hidroxiado e imidazol. Esto ocurre tanto para las B_{max} obtenidas de los estudios en los que se determinó el índice mitótico como para las obtenidas de los estudios en los que se determinó el índice de replicación.

Tabla VI. Valores de la Bmax y Kd de los diferentes compuestos imidazólicos, obtenidos de los estudios de proliferación linfocitaria.

Compuesto	Índice Mitótico		Índice de Replicación	
	Bmax (μM)	Kd (μM)	Bmax (μM)	Kd (μM)
Histamina	0.012	0.0049	1.84	0.0012
Cimetidina	0.045	0.0042	2.18	0.2070
Imidazol	0.048	0.8120	2.34	0.1690
MTZ-OH	0.042	0.5000	2.31	0.2000
MTZ	0.053	17.6000	2.45	2.6800

MTZ = metronidazol, MTZ-OH = metabolito metil-hidroxiado, Bmax = unión máxima, Kd = constante de disociación, μM = micromolar.

Respecto a la Kd que se obtuvo a través de los estudios mitóticos se encontró el siguiente orden de afinidad: histamina = cimetidina > metabolito metil-hidroxiado > imidazol > metronidazol. El orden de afinidad observado para los estudios en los que se determinó el índice de replicación es el siguiente: histamina > imidazol > cimetidina = metabolito metil-hidroxiado > metronidazol.

Estudios de antagonismo

Efecto bloqueador de la cimetidina sobre la inhibición histaminérgica

La cimetidina tiene un efecto bloqueador sobre la actividad inhibitoria de la histamina en el índice mitótico (Tabla VII, Figura 9) e índice de replicación (Tabla VIII, Figura 10).

Dicho efecto es dosis-respuesta.

Tabla VII. Efecto bloqueador de la cimetidina sobre la inhibición histaminérgica en el índice mitótico.

(Histamina) μM	Histamina		Cimetidina 1.0 μM		Cimetidina 100 μM	
	X	E.S.	X	E.S.	X	E.S.
0.01	0.031	±0.006	0.034	±0.007	0.040	±0.008
0.1	0.026	±0.005	0.031	±0.005	0.033	±0.005
1.0	0.022	±0.003	0.028	±0.005	0.034	±0.006
10.0	0.019	±0.003	0.026	±0.005	0.032	±0.006
100.0	0.014	±0.003	0.023	±0.005	0.029	±0.006
1000.0	0.011	±0.004	0.015	±0.010	0.025	±0.006

Cultivos de sangre entera, 72 hr. X = promedio, E.S. = error estándar, μM = micromolar. Promedios y errores = 3.

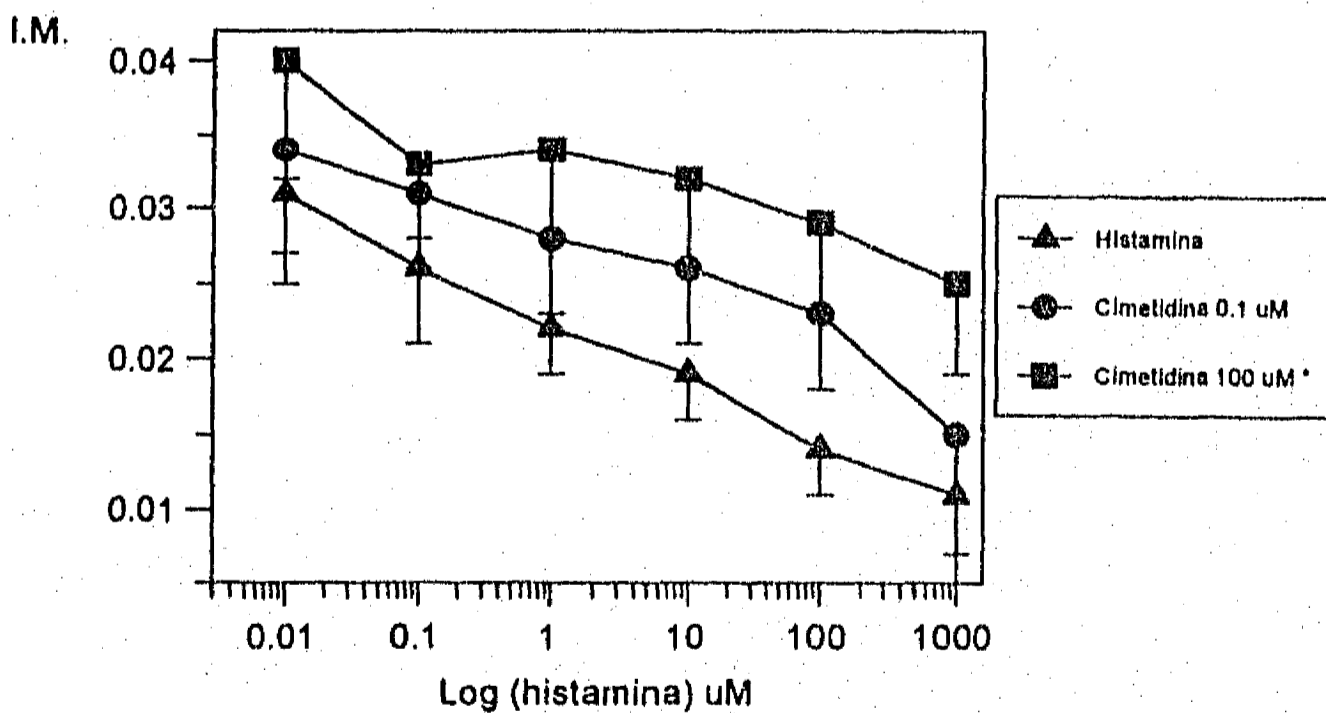


FIGURA 9. Efecto bloqueador de la cimetidina sobre la inhibición histaminérgica en el índice mitótico (I.M.). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado. Las barras de errores representan el error estándar. *p < 0.05.

Tabla VIII. Efecto bloqueador de la cimetidina sobre la inhibición histaminérgica en el índice de replicación.

	Histamina		Cimetidina 1.0 μM		Cimetidina 100 μM	
(Histamina) μM	X	E.S.	X	E.S.	X	E.S.
0.01	2.20	± 0.08	2.22	± 0.14	2.47	± 0.03
0.1	2.13	± 0.04	2.25	± 0.07	2.40	± 0.02
1.0	1.92	± 0.10	2.19	± 0.04	2.36	± 0.07
10.0	1.81	± 0.12	2.09	± 0.10	2.35	± 0.08
100.0	1.73	± 0.13	2.10	± 0.08	2.30	± 0.16
1000.0	1.69	± 0.15	1.98	± 0.11	2.26	± 0.13

Cultivos de sangre entera, 72 hr. X = promedio, E.S. = error estándar, μM = micromolar. Promedios y errores = 3.

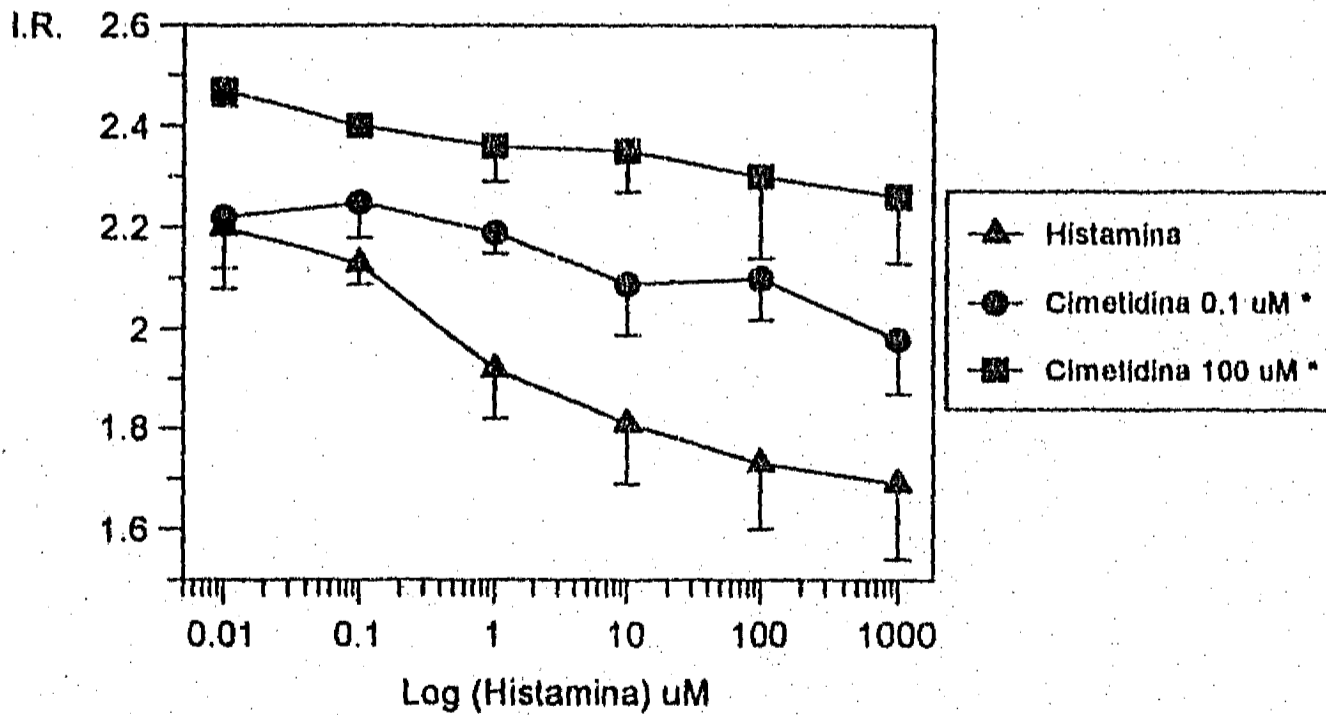


FIGURA 10. Efecto bloqueador de la cimetidina sobre la inhibición histaminérgica en el índice de replicación (I.R.). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado. Las barras de errores representan el error estándar. * $p < 0.05$.

Efecto bloqueador del metronidazol sobre la inhibición histaminérgica

En la tabla IX y en la figura 11 se presentan los resultados concernientes al efecto bloqueador del metronidazol en la inhibición histaminérgica sobre el índice mitótico. En la tabla X y figura 12 se muestran los resultados en los que se evaluó el índice de replicación.

Al igual que la cimetidina, el metronidazol bloquea la actividad inhibitoria de la histamina sobre la proliferación linfocitaria. El efecto bloqueador que se observa se comporta en forma de dosis-respuesta.

Tabla IX. Efecto bloqueador del metronidazol sobre la inhibición histaminérgica en el índice mitótico.

(Histamina) μM	Histamina		Metronidazol 200 μM		Metronidazol 400 μM	
	X	E.S.	X	E.S.	X	E.S.
0.01	0.031	± 0.006	0.034	± 0.007	0.039	± 0.005
0.1	0.026	± 0.005	0.033	± 0.006	0.041	± 0.009
1.0	0.022	± 0.003	0.028	± 0.005	0.035	± 0.006
10.0	0.019	± 0.003	0.031	± 0.009	0.036	± 0.008
100.0	0.014	± 0.003	0.025	± 0.007	0.033	± 0.005
1000.0	0.011	± 0.004	0.015	± 0.008	0.028	± 0.006

Cultivos de sangre entera, 72 hr. X = promedio, E.S. = error estándar, μM = micromolar. Promedios y errores = 3.

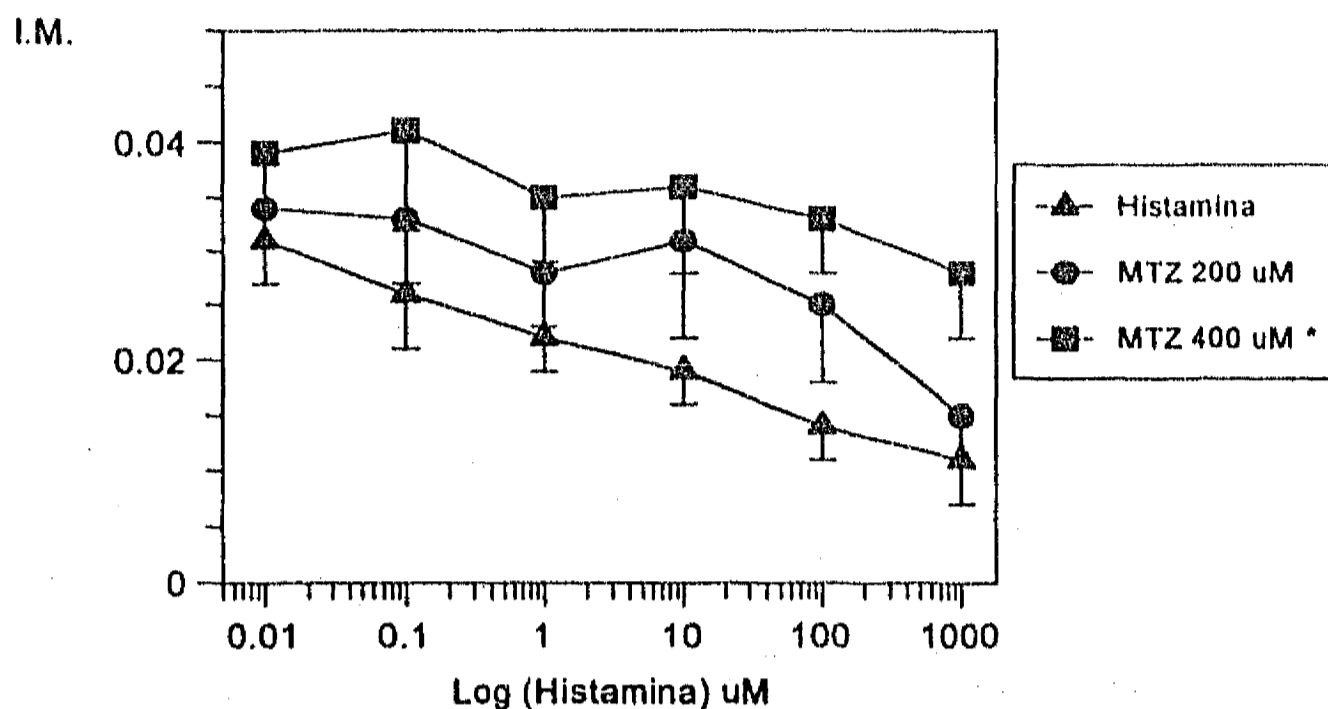


FIGURA 11. Efecto bloqueador del metronidazol (MTZ) sobre la inhibición histaminérgica en el índice mitótico (I.M.). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado. Las barras de errores representan el error estándar. *p < 0.05.

Tabla X. Efecto bloqueador del metronidazol sobre la inhibición histaminérgica en el índice de replicación.

(Histamina) μM	Histamina		Metronidazol 200 μM		Metronidazol 400 μM	
	X	E.S.	X	E.S.	X	E.S.
0.01	2.20	±0.08	2.21	±0.13	2.38	±0.05
0.1	2.13	±0.04	2.20	±0.08	2.40	±0.02
1.0	1.92	±0.10	2.13	±0.14	2.27	±0.12
10.0	1.81	±0.12	2.10	±0.12	2.26	±0.12
100.0	1.73	±0.13	2.06	±0.13	2.27	±0.04
1000.0	1.69	±0.15	2.09	±0.08	2.24	±0.03

Cultivos de sangre entera, 72 hr. X = promedio, E.S. = error estándar, μM = micromolar. Promedios y errores = 3.

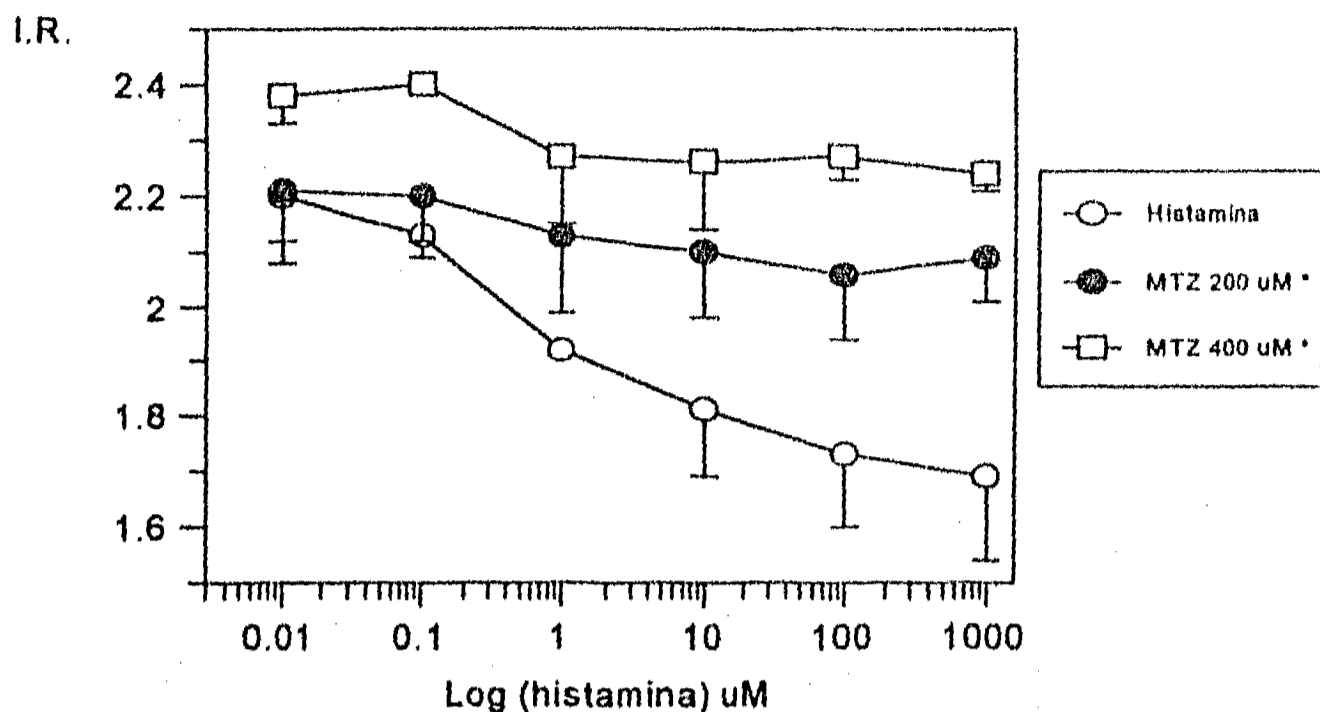


FIGURA 12. Efecto bloqueador del metronidazol (MTZ) sobre la inhibición histaminérgica en el índice de replicación (I.R.). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado. Las barras de errores representan el error estándar. * $p < 0.05$.

Efecto bloqueador del metabolito metil-hidroxiado sobre la inhibición histaminérgica

En la tabla XI y en la figura 13 se presentan los resultados concernientes al efecto bloqueador del metabolito metil-hidroxiado en la inhibición histaminérgica sobre el índice mitótico. En la tabla XII y figura 14 se muestran los resultados en los que se evaluó el índice de replicación.

Al igual que la cimetidina y el metronidazol, el metabolito metil-hidroxiado bloquea la actividad inhibitoria de la histamina sobre la proliferación linfocitaria. Este efecto bloqueador se comporta en forma de dosis-respuesta.

Tabla XI. Efecto bloqueador del metabolito metil-hidroxiado sobre la inhibición histaminérgica en el índice mitótico.

(Histamina) μM	Histamina		MTZ-OH 200 μM		MTZ-OH 400 μM	
	X	E.S.	X	E.S.	X	E.S.
0.01	0.025	±0.003	0.026	±0.002	0.032	±0.004
0.1	0.022	±0.003	0.025	±0.002	0.033	±0.002
1.0	0.016	±0.003	0.025	±0.004	0.031	±0.004
10.0	0.011	±0.003	0.023	±0.003	0.029	±0.002
100.0	0.008	±0.001	0.022	±0.004	0.026	±0.003
1000.0	0.007	±0.001	0.015	±0.002	0.022	±0.003

Cultivos de sangre entera, 72 hr. MTZ-OH = metabolito metil-hidroxiado, X = promedio, E.S.= error estándar, μM = micromolar. Promedios y errores = 3.

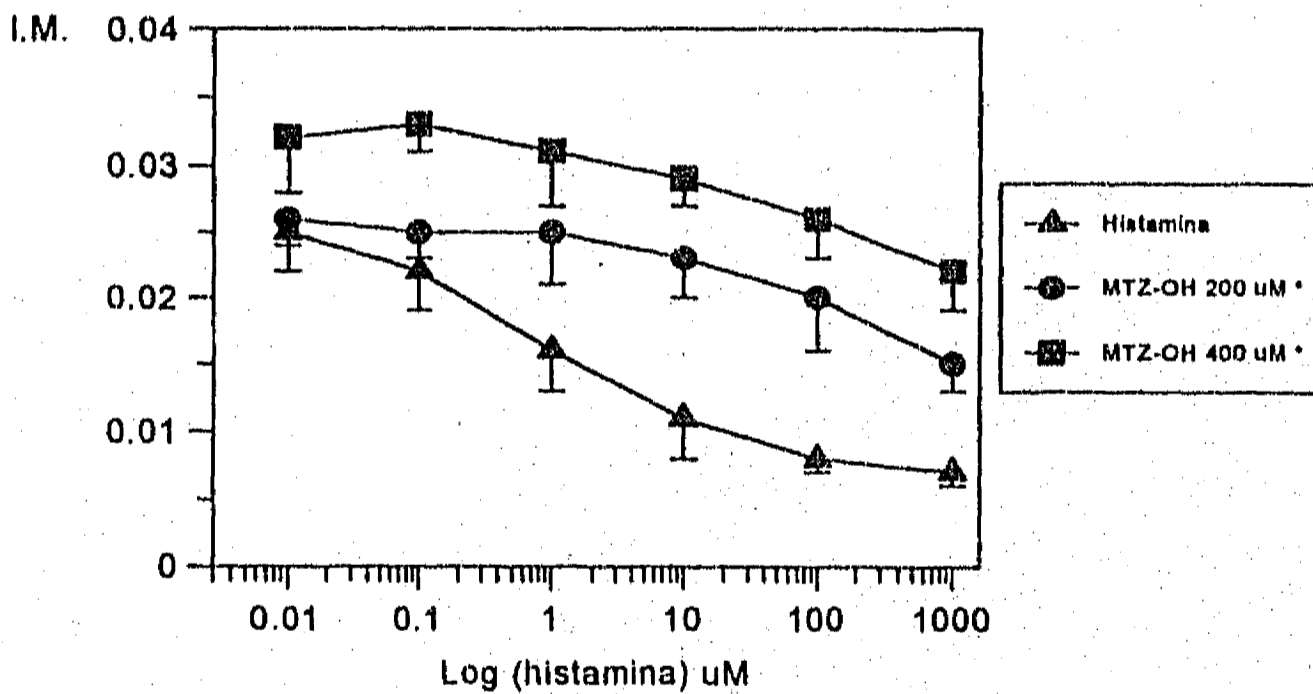


FIGURA 13. Efecto bloqueador del metabolito metil-hidroxiado (MTZ-OH) sobre la inhibición histaminérgica en el índice mitótico (I.M.). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado. Las barras de errores representan el error estándar. *p < 0.05.

Tabla XII. Efecto bloqueador del metabolito metil-hidroxiado sobre la inhibición histaminérgica en el índice de replicación.

(Histamina) μM	Histamina		MTZ-OH 200 μM		MTZ-OH 400 μM	
	X	E.S.	X	E.S.	X	E.S.
0.01	2.10	± 0.05	2.14	± 0.03	2.21	± 0.08
0.1	2.03	± 0.06	2.10	± 0.03	2.18	± 0.04
1.0	1.88	± 0.01	2.00	± 0.01	2.16	± 0.04
10.0	1.88	± 0.05	1.98	± 0.01	2.12*	± 0.02
100.0	1.80	± 0.04	1.99	± 0.03	2.15	± 0.04
1000.0	1.68	± 0.02	1.92	± 0.03	2.09	± 0.04

Cultivos de sangre entera, 72 hr. MTZ-OH = metabolito metil-hidroxiado, X = promedio, E.S. = error estándar, μM = micromolar. Promedios y errores = 3.

I.R.

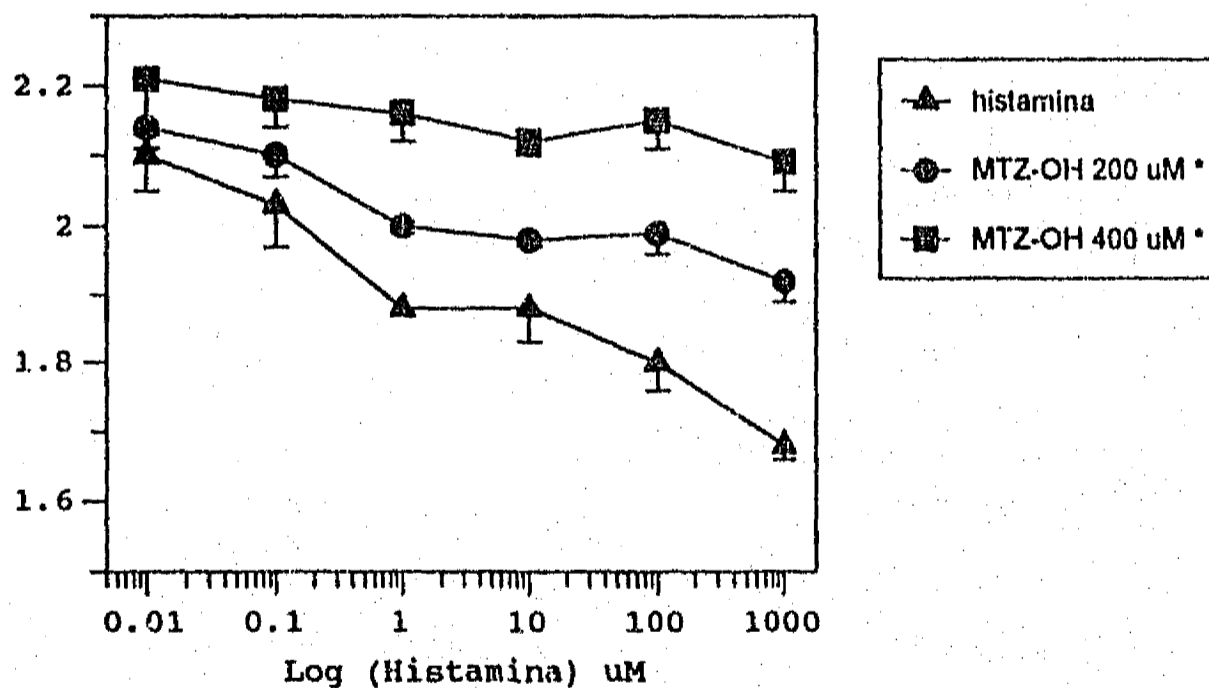


FIGURA 14. Efecto bloqueador del metabolito metil-hidroxiado (MTZ-OH) sobre la inhibición histaminérgica en el índice de replicación (I.R.). Cada punto representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios, por duplicado. Las barras de errores representan el error estándar. * $p < 0.05$.

Constantes de disociación y de unión máxima de la histamina, obtenidas de los estudios de antagonismo

A continuación se presentan las constantes de disociación (Kd) y de unión máxima (Bmax) de la histamina, calculadas de los estudios de antagonismo en los que se determinó los índices mitótico (Tabla XIII) y de replicación (Tabla XIV). Ninguno de los compuestos probados causó cambios significativos de la Kd de la histamina, tanto de la obtenida a través de los estudios en los que se determinó el índice mitótico como la obtenida de los estudios en los que se evaluó el índice de replicación. Sin embargo la cimetidina, el metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado provocaron cambios significativos, en ambos estudios, de la Bmax.

Tabla XIII. Constantes de disociación y de unión máxima de la histamina, obtenidas de los estudios de antagonismo con la cimetidina, el metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado, en los que se evaluó el índice mitótico.

	histamina	cimetidina		MTZ		MTZ-OH	
		1.0 μ M	10 μ M	200 μ M	400 μ M	200 μ M	400 μ M
Bmax	0.012	0.075*	0.069*	0.071*	0.064*	0.078*	0.072*
Kd	0.0049	0.0017	0.0015	0.0017	0.0010	0.0007	0.0007

Bmax = unión máxima, Kd = constante de disociación, MTZ = metronidazol, MTZ-OH = metabolito metil-hidroxiado. *p < 0.05, prueba de t de Student.

Tabla XIV. Constantes de disociación y de unión máxima de la histamina, obtenidas de los estudios de antagonismo con la cimetidina, metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado, en los que se evaluó el índice de replicación.

	histamina	cimetidina		MTZ		MTZ-OH	
		1.0 μ M	10 μ M	200 μ M	400 μ M	200 μ M	400 μ M
Bmax	1.84	2.11*	2.32*	2.11*	2.28*	1.99*	2.13*
Kd	0.0016	0.0015	0.0028	0.0014	0.0018	0.0018	0.0029

Bmax = unión máxima, Kd = constante de disociación, MTZ = metronidazol, MTZ-OH = metabolito metil-hidroxiado. *p < 0.05, prueba de t de Student.

Acción de los compuestos imidazólicos sobre la secreción de Interleucina 2 (IL-2)

Efecto de la histamina, cimetidina, metronidazol y metabolito metil-hidroxiado sobre la respuesta de las células CTLL-2 a la IL-2

Para determinar los efectos de los compuestos anteriormente mencionados sobre la secreción de IL-2 fue necesario evaluar los efectos directos, de dichos compuestos, sobre la respuesta de las células CTLL-2 a la IL-2. En la figura 15 se muestran los resultados al respecto.

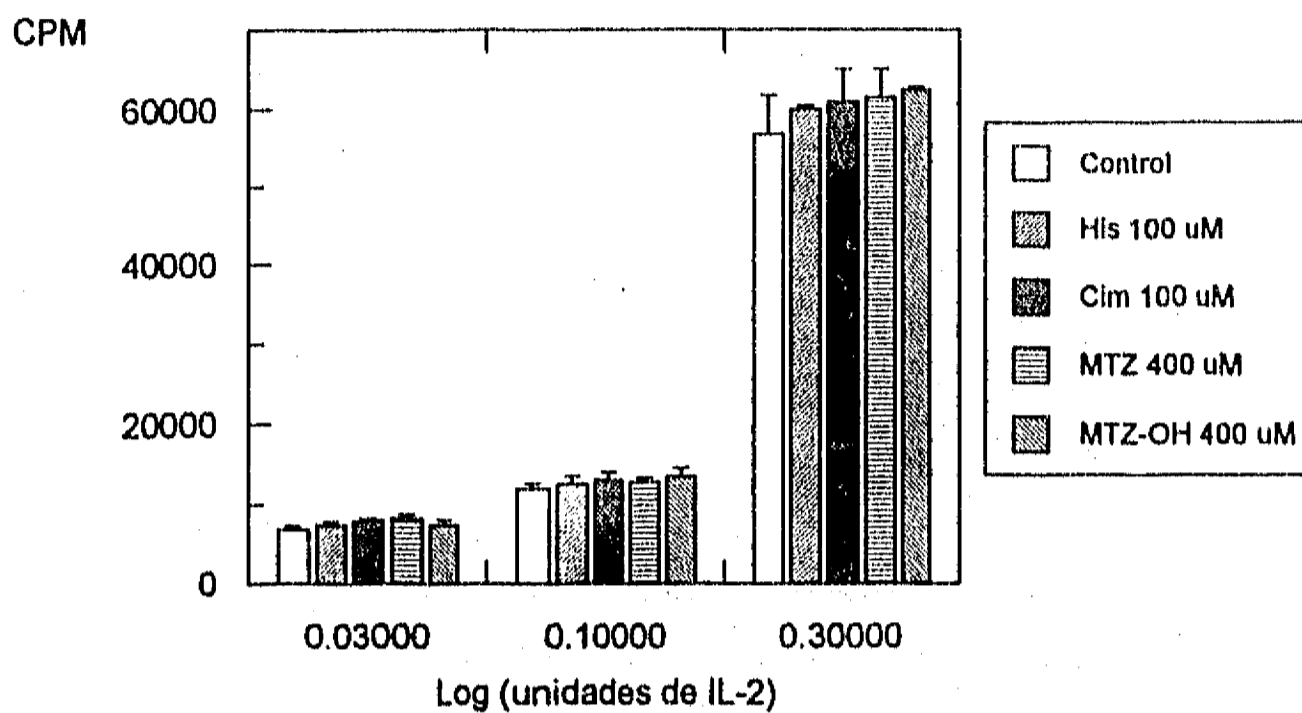


FIGURA 15. Efecto de la histamina (HIS), cimetidina (CIM), metronidazol (MTZ) y el metabolito metil-hidroxiado (MTZ-OH) sobre la respuesta proliferativa de las células CTLL-2 a diferentes concentraciones de Interleucina 2 (IL-2). CPM = cuentas de timidina tritlada por minuto, μM = micromolar. Los resultados representan el promedio de tres experimentos. Las barras representan el error estándar.

Como se puede apreciar en la figura anterior, ninguno de los compuestos usados modifica la respuesta proliferativa de las células CTLL-2 a la IL-2.

Determinación del tiempo óptimo de cultivo para el ensayo de IL-2

Antes de realizarse los experimentos en los que se evaluó la actividad de IL-2, se determinó el tiempo óptimo de cultivo de los linfocitos. Esto último con la finalidad de obtener sobrenadantes, provenientes de dichos cultivos, con la suficiente cantidad de IL-2 para ser determinada en el ensayo con las células CTLL-2. En la figura 16 se muestran dichos resultados.

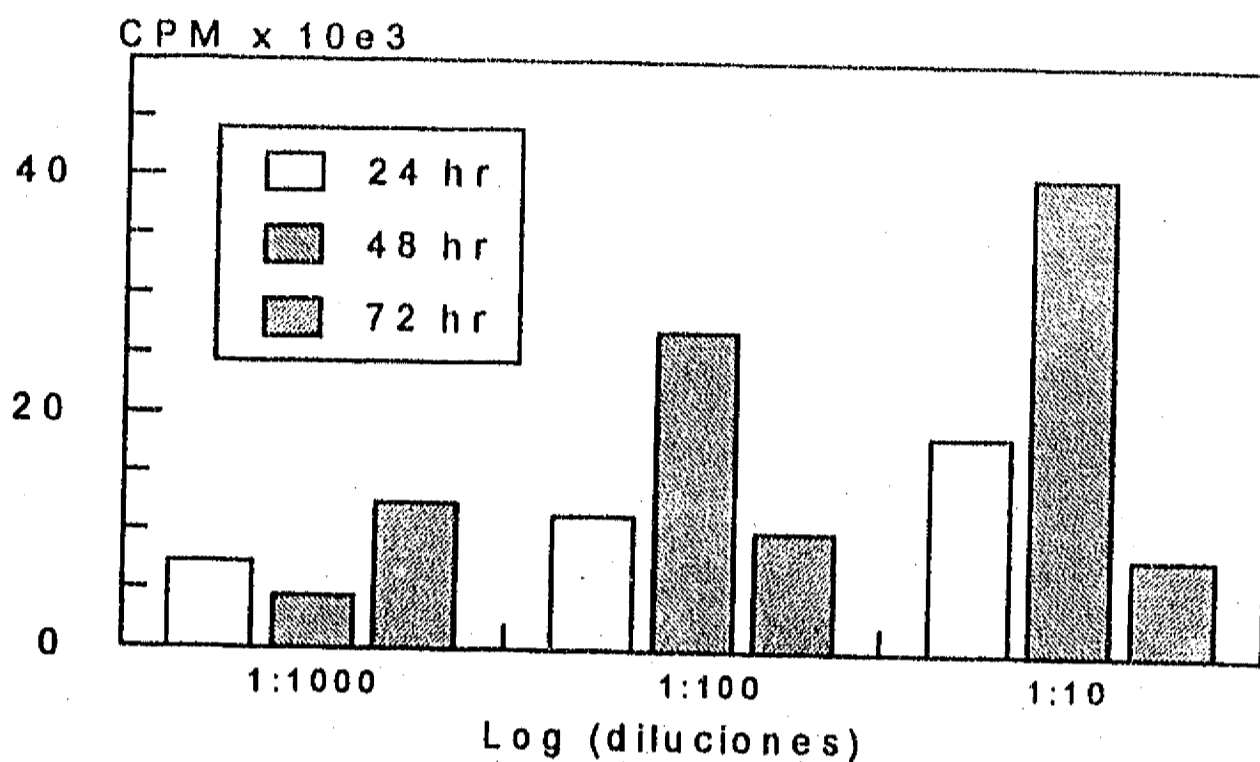


FIGURA 16. Evaluación del efecto, a diferentes diluciones, de los sobrenadantes de cultivos de linfocitos a diferentes tiempos en la respuesta proliferativa de las células CTLL-2. CPM = cuentas por minuto de la incorporación de ^3H -timidina. Cada columna representa el promedio de un experimento por duplicado.

Como se observa en la figura anterior, el tiempo óptimo de cultivo de los linfocitos para llevar a cabo el ensayo de IL-2 es de 48 hr. Es, además, 1:10 la dilución del sobrenadante a la que hay una mejor respuesta proliferativa de las células CTLL-2.

Efecto de la histamina, cimetidina, metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado sobre la secreción de IL-2

En la tabla XV, figuras 17, 18 y 19 se presentan los resultados en los que se determinó el efecto de los compuestos mencionados sobre la secreción de IL-2, evaluado a través de la respuesta proliferativa de las células CTLL-2.

Tabla XV. Efecto de los compuestos imidazólicos sobre la inhibición histaminérgica en la respuesta proliferativa de las células CTLL-2.

Diluciones	Incorporación de (³ H)-timidina (CPM x 10 ³)					
	1:5		1:10		1:20	
	X	E.S.	X	E.S.	X	E.S.
Control	54.47	±16.99	49.48	±15.40	34.28	±15.63
His. 100 µM	38.04	±18.52	25.73*	±17.45	15.54*	±11.71
His. 100 µM Cim. 100 µM	53.49	±22.58	42.77**	±20.58	29.54**	±14.69
His. 100 µM MTZ 400 µM	39.75	±19.61	25.36	±15.22	15.28	±10.50
His. 100 µM MTZ-OH 400 µM	41.80	±20.83	26.12	±13.33	17.73**	±12.03

Diluciones de sobrenadantes provenientes de cultivos de linfocitos con diferentes tratamientos. His = histamina, Cim = cimetidina, MTZ = metronidazol, MTZ-OH = metabolito metil-hidroxilado, CPM = cuentas por minuto, µM = micromolar, X = promedios, E.S. = error estándar. Promedios y errores = 3. *p<0.05 respecto al control, **p<0.05 respecto al tratamiento con histamina.

A la dilución 1:5 la histamina no causa una inhibición significativa sobre la secreción de IL-2 (Tabla XV, Figura 17). Sin embargo este efecto inhibitorio se observa en los experimentos en los que se usaron diluciones 1:10 y 1:20 (Tabla XV, Figuras 18, y 19). Tanto a la dilución 1:10 como 1:20 (Tabla XV, Figuras 18 y 19) la cimetidina tiene un efecto bloqueador sobre la inhibición histaminérgica. El metabolito metil-hidroxilado, a la dilución 1:20, bloquea ligeramente el efecto inhibitorio de la histamina, mientras que el metronidazol, a cualquier dilución, carece de efectos bloqueadores (Tabla XV, Figuras 17, 18 y 19).

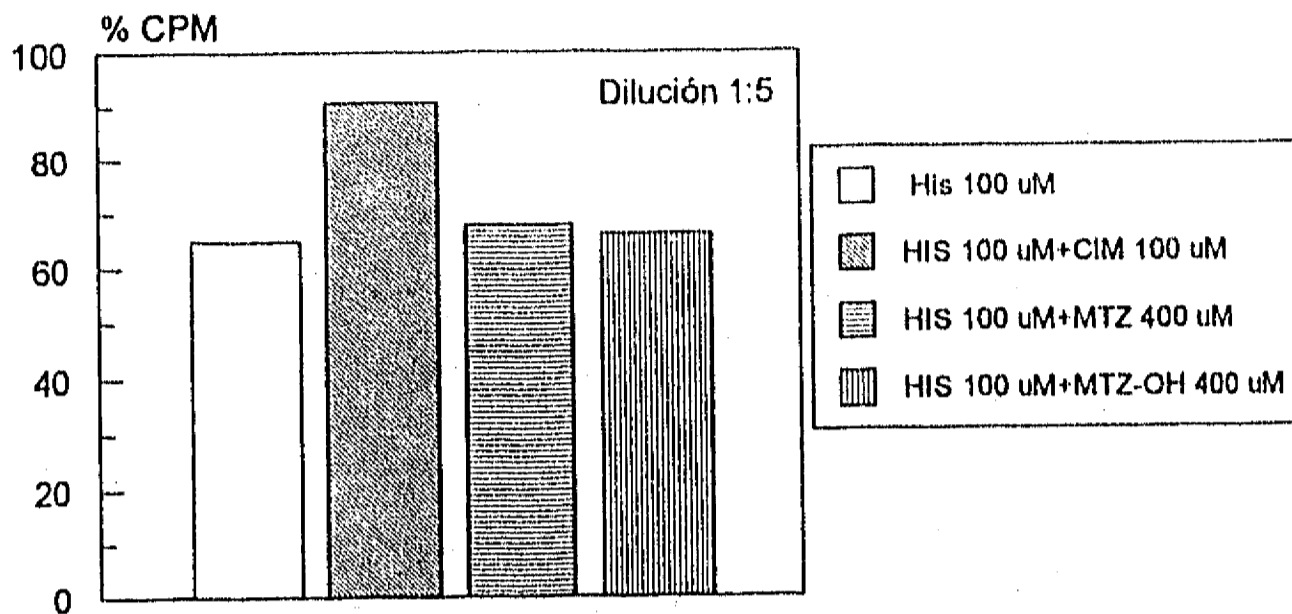


FIGURA 17. Efecto del sobrenadante (dilución 1:5) de cultivos de linfocitos tratados con histamina (HIS), histamina+cimetidina (CIM), histamina+metronidazol (MTZ) e histamina+metabolito metil-hidroxiado (MTZ-OH) sobre la respuesta proliferativa de las células CTLL-2. % CPM = porcentaje de las cuentas por minuto, respecto al control, de la incorporación de ³H)-timidina. Cada columna representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios.

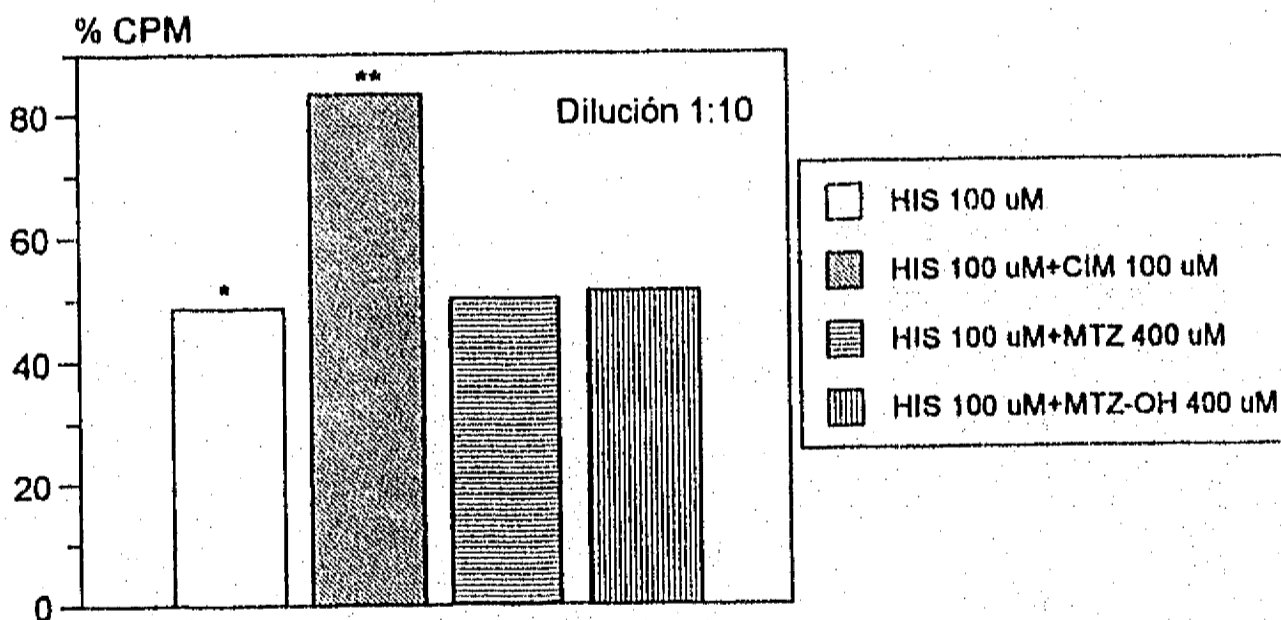


FIGURA 18. Efecto del sobrenadante (dilución 1:10) de cultivos de linfocitos tratados con histamina (HIS), histamina+cimetidina (CIM), histamina+metronidazol (MTZ) e histamina+metabolito metil-hidroxiado (MTZ-OH) sobre la respuesta proliferativa de las células CTLL-2. % CPM = porcentaje de las cuentas por minuto, respecto al control, de la incorporación de ³H)-timidina. Cada columna representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios. *p<0.05 con respecto al control, ** p<0.05 con respecto al tratado con histamina.

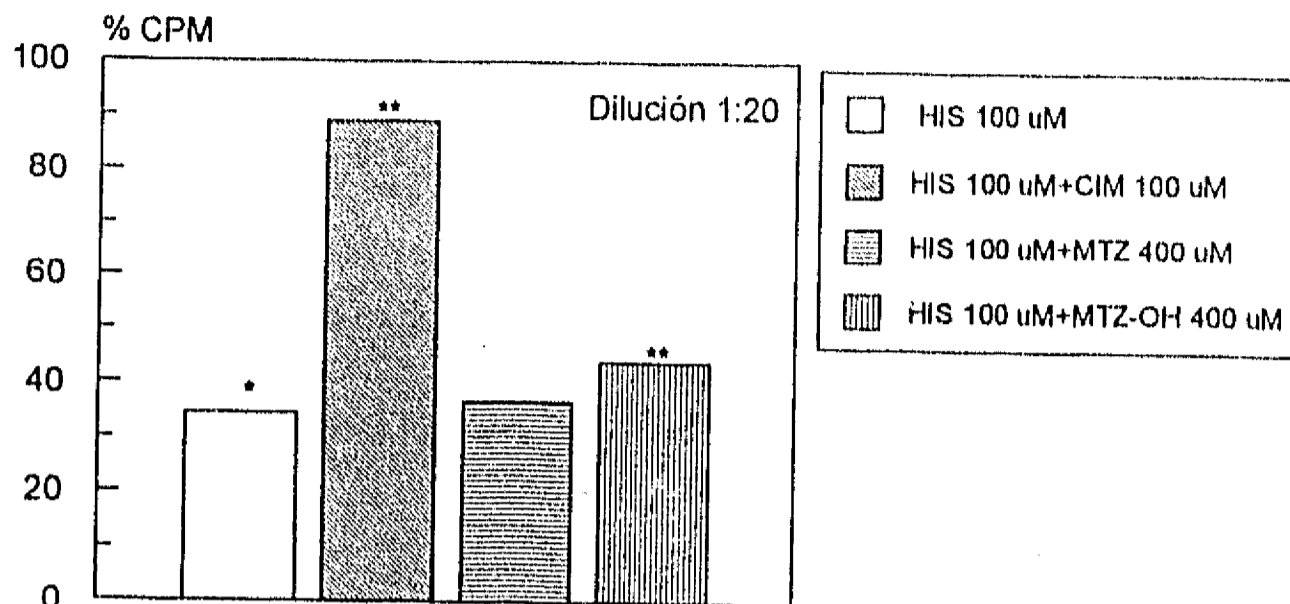


FIGURA 19. Efecto del sobrenadante (dilución 1:20) de cultivos de linfocitos tratados con histamina (HIS), histamina+cimetidina (CIM), histamina+metronidazol (MTZ) e histamina+metabolito metil-hidroxilado (MTZ-OH) sobre la respuesta proliferativa de las células CTLL-2. % CPM = porcentaje de las cuentas por minuto, respecto al control, de la incorporación de (³H)-timidina. Cada columna representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios. * p<0.05 con respecto al control, ** p<0.05 con respecto al tratado con histamina.

Acción de los compuestos imidazólicos sobre la liberación del factor de supresión dependiente de histamina (HSF)

Evaluación del efecto del medio de cultivo tratado con los diferentes compuestos imidazólicos sobre la proliferación linfocitaria

Para asegurar que los efectos sobre la liberación del HSF se deben a la acción directa sobre los linfocitos T supresores, fue necesario determinar primero si los compuestos usados eran dializables. En la tabla XVI y figura 20 se presentan los resultados al respecto.

Tabla XVI. Efecto del medio de cultivo tratado con los diferentes imidazoles sobre la proliferación de los linfocitos.

Incorporación de (³ H) timidina (CPM)					
	voluntario 1	voluntario 2	voluntario 3	X	E.S.
Medio RPMI	33,686.6	33,658.0	60,067.5	42,470.7	±8,798.4
Medio RPMI dializado	37,525.7	32,646.0	55,655.0	41,942.0	±6,999.6
Medio RPMI Histamina	36,815.0	25,014.0	52,450.0	38,093.0	±7,945.8
Medio RPMI Cimetidina	31,074.8	31,156.0	47,361.0	36,530.6	±5,415.2
Medio RPMI MTZ	34,882.5	27,903.5	56,930.0	39,905.3	±8,747.5
Medio RPMI MTZ-OH	31,286.0	27,180.0	47,226.0	35,230.6	±6,113.7

El medio de cultivo fue dializado después de un tratamiento con 100 µM de histamina o cimetidina y 400 µM de metronidazol (MTZ) o metabolito metil-hidroxiado (MTZ-OH). En dichos medios se cultivaron linfocitos, de los diferentes voluntarios, por 72 hr y se determinó la incorporación de (³H) timidina. CPM = cuentas por minuto, X = promedio, E.S. = error estándar.

De la tabla XVI y de la figura 20 se aprecia que los medios dializados, posteriormente a un tratamiento con histamina, cimetidina, metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado, no modifican significativamente la proliferación linfoide respecto al medio RPMI.

Efecto de los compuestos imidazólicos sobre la liberación del HSF

En la tabla XVII y figura 21 se presentan los resultados en los que se evaluó el efecto de la histamina, cimetidina, metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado sobre el HSF.

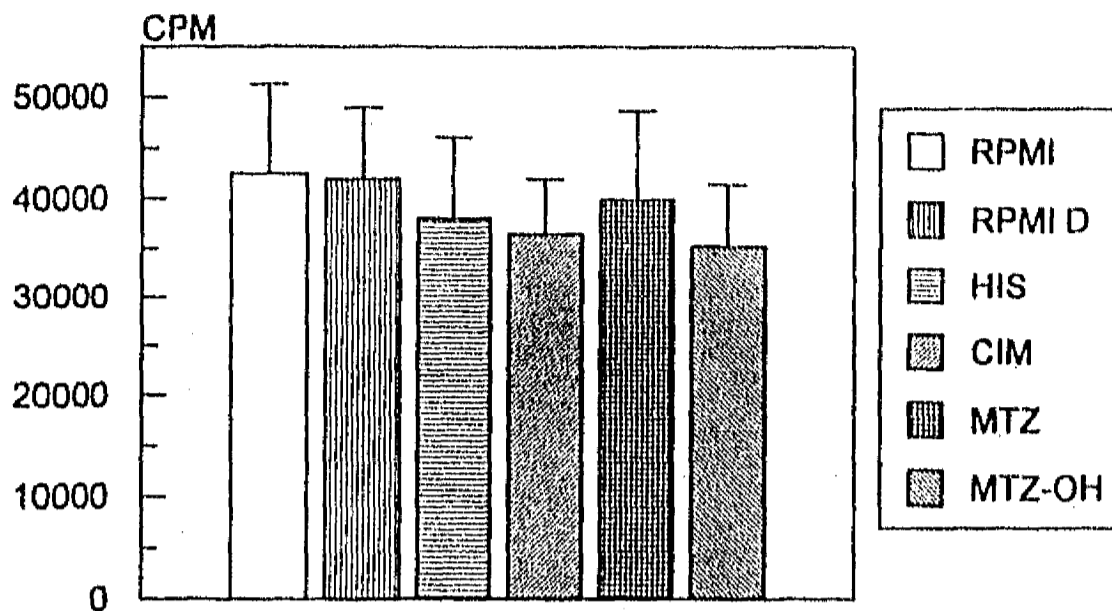


FIGURA 20. Efecto del medio de cultivo RPMI, su dializado (RPMI D) y del medio tratado con histamina 100 μ M (HIS), cimetidina 100 μ M (CIM), metronidazol 400 μ M (MTZ) y el metabolito metil-hidroxiado 400 μ M (MTZ-OH), también dializados, sobre la proliferación de linfocitos cultivados por 72 hr en dichos medios. CPM = cuentas por minuto de la incorporación de (3 H)-timidina. Cada columna representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios. E.S. = error estándar.

En la figura 21 se observa que la histamina induce la liberación del HSF debido a que los linfocitos cultivados en dicho medio proliferan significativamente menos que en el grupo control. La cimetidina y el metabolito metil-hidroxiado bloquean parcialmente dicho efecto histaminérgico, mientras que el metronidazol carece de dichos efectos. Sin embargo, entre los voluntarios, se aprecia una variabilidad importante (Tabla XVII) en la respuesta al metronidazol y al metabolito metil-hidroxiado. En el individuo 1 el metronidazol carece de efectos bloqueadores mientras que en el 2 y 3 sí bloquea. En el individuo 3 el metabolito metil-hidroxiado no bloquea los efectos histaminérgicos mientras que sí lo hace en el individuo 1 y 2.

Tabla XVII. Efecto de los compuestos imidazólicos sobre la liberación del HSF

Incorporación de (³ H) timidina (CPM)					
	voluntario 1	voluntario 2	voluntario 3	X	E.S.
Medio RPMI dializado	37,525.0	32,646.0	55,655.0	41,942.0	±6,999.6
Histamina	8,908.0	12,988.5	30,352.5	17,416.3*	±6,574.4
Histamina+ Cimetidina	18,253.3	21,957.2	50,186.5	30,132.3**	±10,083.9
Histamina+ MTZ	8,177.5	20,844.5	50,337.5	26,453.1	±12,489.4
Histamina+ MTZ-OH	29,568.03	23,202.5	36,884.0	29,884.8**	±3,952.6

Los sobrenadantes provienen de cultivos (24 hr) de linfocitos tratados con 100 µM de histamina, 100 µM de cimetidina, 400 µM de metronidazol (MTZ) y 400 µM del metabolito metil-hidroxiado (MTZ-OH). En dicho sobrenadante se cultivaron linfocitos, de los diferentes voluntarios, por 72 hr y se determinó la incorporación de (³H) timidina. CPM = cuentas por minuto, X = promedio, E.S. = error estándar. *p<0.05 respecto al medio dializado, **p<0.05 respecto a la histamina.

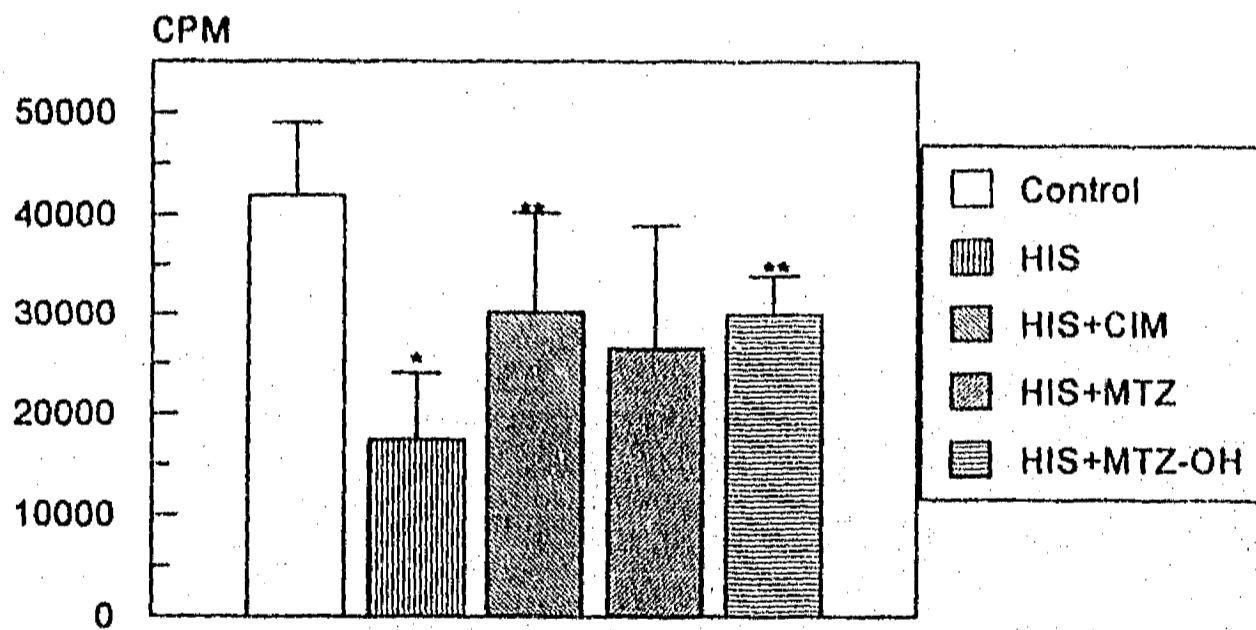


FIGURA 21. Efecto de la cimetidina (100 µM,CIM), metronidazol (400 µM,MTZ) y el metabolito metil-hidroxiado (400 µM,MTZ-OH) sobre la liberación del HSF producto de la histamina (100 µM,HIS). CPM = cuentas por minuto de la incorporación de (³H)-timidina. Cada columna representa el promedio de 3 experimentos correspondientes a 3 voluntarios. E.S. = error estándar.*p<0.05 respecto al control (RPMI dializado),**p<0.05 respecto a la histamina.

DISCUSION

La histamina ha sido propuesta como un importante regulador de la respuesta del sistema inmune (Melmon y Khan, 1987). Sus mecanismos inhibitorios se deben a la inhibición de la síntesis de IL-2 e interferon γ llevada a cabo en los linfocitos TH1 (Dohlsten *et.al.*, 1987) y a la liberación del HSF por los linfocitos CD8 supresores (Rocklin, 1976). Estas acciones ocurren a través de la interacción de la histamina con receptores H₂ (Ogden y Hill, 1980). En la tabla I y figuras 3 y 4 se muestra el efecto inhibitorio de la histamina sobre los índices mitótico y de replicación. Dicho efecto tiene un comportamiento dosis-respuesta y se debe, entre otras causas, a la inhibición en la secreción de la IL-2 (Tabla XV, Figuras 18 y 19) por parte de los linfocitos TH1, y a la liberación del HSF por parte de los linfocitos CD8 supresores (Tabla XVII, Figura 21).

La cimetidina es un antagonista histaminérgico de tipo 2. Ya se ha reportado que bloquea los efectos histaminérgicos sobre el sistema inmunológico, específicamente la liberación del HSF (Rocklin *et.al.*, 1979) y la inhibición de la síntesis de IL-2 e interferón γ (Dohlsten *et.al.*, 1987). En el presente estudio fue utilizada como un control positivo del funcionamiento correcto de los sistemas de evaluación. En las tablas XV y XVII y en las figuras 18, 19 y 21 se observa la acción bloqueadora de la cimetidina sobre los efectos histaminérgicos mencionados anteriormente. También bloquea, con un comportamiento dosis-respuesta, los efectos inhibitorios de la histamina sobre el índice mitótico e índice de replicación (Tablas VII y VIII, Figuras 9 y 10).

Tanto la cimetidina (Tabla II, Figuras 5 y 6) como el metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado (Tablas III y IV, Figuras 7 y 8) incrementan la proliferación linfocitaria medida a través del índice mitótico e índice de replicación. El metabolito carboxilado carece de actividad, lo que quiere decir que los efectos inmunoestimuladores causados por el tratamiento con metronidazol se deben al metronidazol y sobre todo al metabolito metil-hidroxiado, ya que este último es más potente en sus efectos inmunoestimuladores que el metronidazol. Dichos efectos son significativos, para el metabolito metil-hidroxiado, a partir de la concentración 3 μM , mientras que para el metronidazol lo son a partir de la concentración 200 μM (Tablas III y IV). Este efecto, dosis-respuesta, no se debe a una actividad mitogénica propia de los compuestos usados ya que estos no inducen mitosis, en ausencia de PHA, y por lo tanto la proliferación linfoide. Su efecto estimulador es debido a un sinergismo sobre la respuesta mitogénica de los linfocitos a la PHA.

Aunque hay un claro efecto del metabolito metil-hidroxiado sobre los índices mitótico y de replicación, éste no está dado por una relación dosis-respuesta. Esto podría deberse a que aún a las concentraciones más bajas, el metabolito produce efectos cercanos a la saturación, perdiéndose dicha relación.

Una de las actividades moduladoras de la histamina consiste en frenar la proliferación linfocitaria cuando se alcanza cierto límite. Al llegar a este punto los linfocitos T secretan un factor liberador de histamina el cual actúa sobre los basófilos,

promoviendo la secreción de la histamina (Melmon y Khan, 1987). Debido a que la cimetidina, el metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado carecen de actividad mitogénica y sin embargo tienen efectos inmunoestimuladores, y a que el mecanismo de acción que pudiera explicar dicha actividad es a través de un bloqueo histaminérgico; el incremento a la respuesta mitogénica pudiera deberse a un bloqueo de los efectos inhibitorios de la histamina endógena que es secretada por los basófilos.

En la tabla V se presentan las frecuencias de los diferentes tipos de leucocitos de los diferentes donadores que participaron en el presente trabajo. Dichas frecuencias se encuentran dentro de los valores normales, incluyendo la observada para los basófilos. Debido a que el sistema usado fue el cultivo de sangre entera, el cual presentó niveles normales de basófilos, es posible que los efectos estimuladores de los compuestos probados se deban a un bloqueo de los efectos inhibitorios de la histamina endógena.

El denominador común de los compuestos usados es que en todos ellos un anillo de imidazol forma parte de su estructura química. Al parecer, los efectos de éstos sobre el sistema inmunológico pudieran estar relacionados con dicha estructura. Por esta razón se investigó el efecto del anillo de imidazol sobre los índices mitótico y de replicación. En las figuras 7 y 8 se observa que el imidazol también actúa como un inmunoestimulador, con un comportamiento dosis-respuesta y con una potencia similar a la del metabolito metil-hidroxiado (Tablas III y IV). Estos resultados sugieren la posibilidad, planteada anteriormente, de una relación entre la estructura del anillo de

imidazol y los efectos observados.

Asumiendo que los efectos inmunomoduladores de los compuestos probados se llevan a cabo a través de la interacción con receptores, se calcularon las constantes de disociación (K_d) y de unión máxima (B_{max}) para cada uno de ellos (Tabla VI). Tanto para la B_{max} obtenida de los estudios en los que se determinó el índice mitótico como el índice de replicación no se observaron diferencias entre la cimetidina, el metronidazol, su metabolito metil-hidroxilado y el imidazol, es decir, en todos los casos se llegó al mismo nivel de saturación en los índices evaluados. Para la histamina se obtuvo una B_{max} menor a la obtenida para los compuestos anteriores. Esto se debe a que los efectos de la histamina son inhibitorios, mientras que los efectos del resto de los compuestos son estimuladores. De los datos obtenidos de los estudios mitóticos resulta que la histamina y la cimetidina poseen constantes de disociación similares, además de ser las más bajas (4.9 y 4.2 nmolar, respectivamente). Le siguen en orden de magnitud el imidazol y el metabolito metil-hidroxilado (800 y 500 nmolar, respectivamente) y finalmente el metronidazol (17,600 nmolar). Para las K_d s obtenidas de los estudios replicativos se observa el mismo orden excepto para la cimetidina, cuyo valor de la K_d cambió de 0.045 a 0.207 μ M (Tabla VI).

Debido a que los efectos de los compuestos imidazólicos presentan una cinética de saturación y a que las constantes de disociación obtenidas en el presente estudio son del orden de magnitud e inclusive menores que las reportadas para antagonistas H_2

(Tabla XVIII), aunque hayan sido determinados en otros sistemas biológicos, es factible pensar que dichos efectos están modulados a través de un receptor. Como ya se mencionó, dicho receptor podría ser el H₂. Para investigar la posibilidad anterior se hicieron estudios de antagonismo entre la histamina y la cimetidina o el metronidazol o el metabolito metil-hidroxilado. El metabolito carboxilado no fue considerado para estos estudios debido a que carece de efectos inmunomoduladores (Figuras 7 y 8).

Tabla XVIII. Constantes de disociación de diferentes antagonistas histaminérgicos H₂.

Antagonista H ₂	Kd (nmolar)	Sistema	Referencia
Cimetidina	283.0	Mucosa gástrica	Rising <i>et.al.</i> , 1980
	52.2	Corteza cerebral	Rising <i>et.al.</i> , 1980
Tiotidina	15.0	mucosa gástrica	Yellin <i>et.al.</i> , 1979
Burimamida	5,000.0	Basófilos	Bourne <i>et.al.</i> , 1971
Meliamida	500.0	Basófilos	Bourne <i>et.al.</i> , 1971

Kd = Constante de disociación.

La cimetidina bloquea los efectos inhibitorios de la histamina sobre el índice mitótico (Tabla VII y Figura 9) e índice de replicación (Tabla VIII, Figura 10), con un comportamiento dosis-respuesta. El mismo tipo de efecto bloqueador se observa para el metronidazol (Tablas IX y X, Figuras 11 y 12) y el metabolito metil-hidroxilado (Tablas XI y XII, Figuras 13 y 14). En todos los casos el bloqueo a los efectos inhibitorios de la histamina fue del tipo no-competitivo. Las constantes de disociación de la histamina obtenidas de los estudios de antagonismo no cambiaron

significativamente. Las constantes de unión máxima de la histamina sí lo hicieron (Tablas XIII y XIV). Estos resultados indican que la cimetidina, el metronidazol y el metabolito metil-hidroxilado no bloquean a la histamina a nivel del sitio activo del receptor H₂.

Debido a los resultados anteriores es importante hacer las siguientes consideraciones respecto a los posibles mecanismos de acción de la cimetidina, metronidazol y del metabolito metil-hidroxilado:

1) La actividad inmunoestimuladora podría deberse a efectos inespecíficos. Sin embargo es poco probable que esto sea así ya que sus efectos siguen una cinética saturable y las constantes de disociación que se obtuvieron para la cimetidina, el metabolito metil-hidroxilado y el imidazol están dentro de los rangos reportados para antagonistas histaminérgicos de tipo 2. Además, al menos para la cimetidina, ya se ha reportado un sitio saturable y de alta afinidad para el receptor H₂ (Smith *et al.*, 1980). Por otro lado, tanto el levamisol como el imidazol alteran los niveles del GMPc y del AMPc, los cuales se sabe están asociados a varios tipos de receptores membranales.

2). Aunque para la cimetidina se ha identificado un sitio de alta afinidad a nivel del receptor H₂, ésta no es desplazada de su sitio de unión por antagonistas H₂ no imidazólicos con mayor afinidad por el receptor y sí lo es por imidazoles que carecen de actividad histaminérgica agonista o antagonista (Kendall *et al.*, 1980, Smith *et al.*, 1980, Warrender *et al.*, 1983). Inclusive se han identificado, para la cimetidina, un sitio

de alta y otro de baja afinidad. Al primero se le asocia como un sitio que reconoce la estructura de imidazol y se sugiere que podría ser un sitio alostérico (Rising *et.al.*, 1980).

3). Los compuestos imidazólicos también podrían actuar a nivel de la AMPc-fosfodiesterasa como lo hace el levamisol. Este incrementa la actividad de dicha enzima, promoviendo el rompimiento del AMPc e induciendo la proliferación linfocitaria (Hadden *et.al.*, 1975).

4) Otra posibilidad es que actúen sobre otro receptor, acoplado a la membrana del linfocito, que reconozca la estructura de imidazol. A través de este receptor podrían inducir la proliferación linfocitaria, enmascarando los efectos inhibitorios de la histamina. Se ha reportado la existencia de un receptor que reconoce la estructura de imidazol (Cupry *et.al.*, 1989). Se le ha denominado receptor de imidazoles y ha sido localizado en diferentes tejidos y órganos como son el cerebro (Ernesberger *et.al.*, 1990), hígado (Tesson *et.al.*, 1991) y células adrenales (Regunathan *et.al.*, 1991). También se ha reportado que la histamina, la cimetidina (Kamisaki *et.al.*, 1990) y el imidazol carboxilado interactúan con dicho receptor en el cerebro de rata (Ernesberger *et.al.*, 1990).

Como ya fue comentado, algunos de los niveles de acción de la histamina sobre el sistema inmunológico son sobre la inhibición de la síntesis de IL-2 y la secreción del

HSF. Para llevar a cabo los estudios de IL-2 fue necesario determinar si los compuestos imidazólicos usados en este trabajo provocaban algún efecto directo sobre la proliferación de las células CTLL-2. En la figura 15 se puede observar que la histamina, cimetidina, metronidazol y el metabolito metil-hidroxilado no modifican la respuesta proliferativa, a diferentes concentraciones de IL-2, de las células CTLL-2. También fue necesario evaluar el tiempo óptimo de cultivo de los linfocitos para la síntesis de suficiente cantidad de IL-2 y así poder llevar a cabo el ensayo con las células CTLL-2. En la figura 16 se aprecia que el tiempo óptimo del cultivo de linfocitos fue de 48 hr.

La proliferación de las células CTLL-2 en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos tratados con histamina disminuyó significativamente respecto al control (Tabla XV, Figuras 18 y 19). Esto se debe a que en dichos sobrenadantes hubo menor síntesis de IL-2, por acción de la histamina, que en los controles. Cuando los cultivos de linfocitos se trataron además de histamina con cimetidina, se observa que esta última bloquea los efectos inhibitorios de la histamina sobre la síntesis de IL-2 (Tabla XV, Figuras 18 y 19). Estos resultados se obtuvieron cuando se usaron las diluciones de los sobrenadantes 1:10 (Figura 18) y 1:20 (Figura 19). En la dilución 1:5 (Figura 17) no hay una inhibición por parte de la histamina. Esto es debido a que, aunque hubiera efectos inhibitorios en la síntesis de IL-2, aún hubo suficiente síntesis de IL-2 para el crecimiento óptimo de las células CTLL-2.

El metronidazol no bloquea los efectos de la histamina en ninguna de las diluciones probadas. El metabolito metil-hidroxiado tiene un ligero efecto bloqueador, el cual se observa sólo cuando se usó la dilución 1:20 (Figura 19).

De los resultados anteriores se concluye que los efectos bloqueadores del metronidazol y su metabolito metil-hidroxiado sobre la inhibición histaminérgica en la proliferación linfocitaria no se deben a un bloqueo de la acción inhibitoria de la histamina sobre la síntesis de IL-2.

Respecto a los estudios en los que se evaluó el HSF primero se determinó si los compuestos usados para tratar los cultivos de linfocitos eran dializables. Esto se hizo con la finalidad de evitar la posibilidad de los efectos directos de dichos compuestos sobre los linfocitos. En la tabla XVI y en la figura 20 se observa que los compuestos usados sí fueron dializados ya que no hay diferencia entre la proliferación de los linfocitos cultivados en medio RPMI y los cultivados en medio RPMI tratado (con histamina, cimetidina, metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado) y dializado.

En la tabla XVII y figura 21 se muestran los resultados concernientes a la acción de la histamina, cimetidina, metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado sobre la liberación del HSF. La histamina induce la secreción de dicho factor ya que hay una inhibición en la proliferación de los linfocitos cultivados en sobrenadantes de cultivos de linfocitos tratados con histamina. Este efecto es bloqueado por la cimetidina y el metabolito

metil-hidroxiado (Figura 21). Sin embargo hay una gran variabilidad entre los voluntarios a la respuesta del metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado (Tabla XVII). En el voluntario 1 la acción bloqueadora se debe al metabolito metil-hidroxiado, en el voluntario 2 bloquean tanto el metronidazol como su forma metil-hidroxiada, mientras que en el voluntario 3 sólo bloquea el metronidazol. Debido a lo anterior y aunque en el promedio sólo se observó que el metabolito metil-hidroxiado tiene efectos bloqueadores, la magnitud de dichos efectos entre el medicamento y su metabolito aún no queda bien establecida. Esto se logrará, probablemente, al aumentar el número de muestras.

El metronidazol es metabolizado por el citocromo P-450 1A1, también conocido como la aril hidrocarburo hidroxilasa, a su forma metil-hidroxiada (Loft *et al.*, 1990). Esta enzima cataliza, principalmente, la oxigenación de hidrocarburos policíclicos. Se localiza en pulmón, intestino, hígado y linfocitos (Caporaso *et al.*, 1991). Es inducida por sus sustratos, entre ellos el metronidazol (Stohs y Wu, 1982), a través de la formación de un complejo entre el receptor citoplásmico AH y el sustrato, con capacidad de unirse a la cromatina (Bradfield y Poland, 1988) y aumentar la expresión del gen CYP 1A1 (Nebert y González, 1987).

Se ha determinado un polimorfismo a nivel de este citocromo, de manera que se han identificado 2 fenotipos: individuos con un CYP 1A1 altamente inducible e individuos con un CYP 1A1 de baja inducibilidad. Este polimorfismo trae como consecuencia

diferencias en la respuesta a exposiciones a xenobióticos biotransformados por el citocromo 1A1. Por ejemplo, los individuos fumadores con un fenotipo de alta inducibilidad tienen un alto riesgo de desarrollar carcinoma broncogénico debido a que forman más productos carcinógenos (Kellerman *et.al.*, 1973, Nebert, 1991).

Respecto al metronidazol se cuenta con evidencia de que su metabolito metil-hidroxiado es más potente en sus efectos inmunoestimuladores que el metronidazol (Bahr y Ullmann, 1983). En estudios anteriores se reportó una susceptibilidad individual a los efectos inmunoestimuladores del metronidazol (Elizondo *et.al.*, 1994). En las figuras 7 y 8 se muestran los resultados de los efectos del metronidazol y sus 2 principales metabolitos sobre los índices mitótico y de replicación. El metabolito metil-hidroxiado es más potente en sus efectos inmunoestimuladores que el metronidazol, mientras que el metabolito carboxilado carece de actividad. De hecho la K_d obtenida para el metabolito metil-hidroxiado es de 1 a 2 órdenes de magnitud menor a la del metronidazol.

Estos resultados apoyan aún más la idea de una correlación entre el polimorfismo del citocromo P-450 1A1 y la susceptibilidad a los efectos inmunoestimuladores del metronidazol. De manera que un individuo con un fenotipo altamente inducible formará más del metabolito metil-hidroxiado, el cual es más potente que el metronidazol en los efectos inmunoestimuladores. También explicaría la variabilidad individual, reportada por Stambaugh *et.al* (1968), respecto a la variación en la concentración de los

diferentes metabolitos determinados en la orina de pacientes tratados con metronidazol.

La relación anterior pareciera ser cierta para los estudios en los que se evaluó la síntesis de IL-2 y la secreción del HSF, ya que sólo la forma metil-hidroxiada tiene efectos bloqueadores sobre la actividad inhibitoria de la histamina. Sin embargo, en los experimentos en los que se evaluó la IL-2, el bloqueo del metabolito metil-hidroxiado es mínimo, y en los que se evaluó el HSF hay una variabilidad importante, entre los individuos, a la respuesta del metronidazol y su metabolito.

Conclusiones

- La histamina inhibe la cinética de proliferación linfoide, medida a través de los índices mitótico y de replicación, con un comportamiento dosis-respuesta.
- En el siguiente orden de potencia, la cimetidina, el imidazol, el metabolito metil-hidroxiado y el metronidazol incrementan la cinética de proliferación linfoide, medida a través de los índices mitótico y de replicación.
- El metabolito carboxilado no produce efectos inhibitorios o estimuladores sobre la proliferación linfoide.
- Los efectos inmunoestimuladores de la cimetidina, el metronidazol y el metabolito

metil-hidroxiado son sobre la respuesta mitogénica de los linfocitos a la PHA y no por una actividad mitogénica intrínseca de dichos compuestos.

- La Kd calculada para la histamina, a través de los estudios mitóticos y replicativos, fue la más baja, seguida de las Kds de la cimetidina, imidazol, metabolito metil-hidroxiado y metronidazol.

- La cimetidina, el metronidazol y el metabolito metil-hidroxiado bloquean los efectos inhibitorios de la histamina sobre los índices mitóticos y de replicación de una forma no competitiva.

- El metronidazol y el metabolito hidroxiado carecen de efectos bloqueadores sobre la inhibición de la síntesis de la IL-2, aunque este último tiene una débil acción bloqueadora.

- El metabolito metil-hidroxiado bloquea la liberación del HSF. Sin embargo hay una importante variabilidad entre los individuos a los efectos bloqueadores tanto del metabolito como del compuesto original.

Perspectivas

Aún quedan varios caminos de estudio respecto a los mecanismos y sitios de acción del metronidazol, su metabolito metil-hidroxiado, el imidazol y la cimetidina. Los

posibles mecanismos a través de los cuales actúan dichos imidazoles pudieran ser 3:

1) A través de la inhibición de la AMPc-fosfodiesterasa, aumentando los niveles de AMPc. El levamisol incrementa la proliferación linfoide mediante este mecanismo de acción. La realización de este estudio consistiría principalmente en la evaluación de la actividad enzimática de la AMPc-fosfodiesterasa en presencia y ausencia de los compuestos imidazólicos.

2) También pudieran estar actuando en un sitio alostérico del receptor H_2 . Para evaluar esta posibilidad habría que purificar los receptores H_2 , para luego realizar estudios de unión diferencial con los imidazoles (marcados radiactivamente) y la ranitidina como marcador del sitio activo del receptor H_2 (con una marca radiactiva diferente a los imidazoles). Se recomienda el uso de la ranitidina ya que ésta es un antagonista específico de receptores H_2 . Además no tiene en su estructura química un anillo de imidazol, lo cual pudiera ser un factor confundente en la interpretación de los datos ya que el propuesto sitio alostérico reconocería la estructura de imidazol.

3) Como ya se sugirió en la discusión, los compuestos imidazólicos podrían actuar a través de la interacción de los receptores imidazólicos. Para evaluar esta posibilidad primero habría que demostrar que dichos receptores se localizan en las membranas de los linfocitos. Una forma de hacerlo sería mediante estudios de unión en linfocitos usando compuestos que interactúen con dichos receptores como son el idadoxan o la clonidina. Si estos receptores se localizan en los linfocitos entonces se podrían hacer estudios de competencia entre los imidazoles estudiados en el presente trabajo y la clonidina o el idadoxan.

Además de estos estudios sería interesante determinar los efectos inmunoreguladores que pudieran mediar los receptores imidazólicos y realizar estudios de estructura-actividad, específicamente alrededor del anillo de imidazol, con la finalidad de crear nuevos medicamentos inmunomoduladores.

BIBLIOGRAFIA

- Alam R., Lewis D.M. and Olenchock S.A. (1988): Identification of a histamine release inhibitory factor and inhibitor of histamine releasing factor synthesis produced by guinea pig lymphoid cells. **Cell. Immunol.**, 115: 447-459.
- Arrang J.M, Garbarg M. and Schwartz J.C. (1983): Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. **Nature (London)**, 302: 832-837.
- Bahr V. and Ullmann U. (1983): The influence of metronidazole and its two main metabolites on murine *in vitro* lymphocyte transformation. **Eur. Clin. Microbiol.**, 2: 568-570.
- Beavan M.A. (1982): Factors regulating availability of histamine at tissue receptors. In: Ganellin C.R. and Parsons M.E. (Ed.), **Pharmacology of histamine receptors**. Wright, Bristol, England, pp 103-145.
- Beiguelman B. (1983): **Farmacogenética e sistemas sanguíneos eritrocitários**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1991 pp.
- Bourne H.R, Melmon K.L. and Lichstestein L.M. (1971): Histamine augments leukocyte 3',5'-adenosin monophosphate and blocks antigenic histamine release. **Science**, 173: 743-745.
- Bourne H.R, Lehrer R.I, Lichstestein L.M, Weissmann G. and Zurier R. (1973): Effects of cholera enterotoxine on adenosin 3',5'-monophosphate and neutrophil function. **J. Clin. Invest.**, 52: 698-708.
- Bourne H.R, Lichstestein L.M, Melmon K.L Henney C.S, Weinstein. and Shearer G.M. (1976): Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. **Science**, 184: 19-28.
- Bradfield C.A. and Poland A.P. (1988): A competitive binding assay for 2,3,7,8-tetra chlorodibenzo-p-dioxin and related ligands of AH receptor. **Mol. Pharmacol.**, 2: 682-688.
- Caporaso N, Landi M.T. and Viners P. (1991): Relevance of metabolic polymorphisms to human carcinogenesis: evaluation of epidemiologic evidence. **Pharmacogenetics**, 1: 1-19.
- Connor H.T, Stoekel M, Evrard J. and Legator M.S. (1977): The contribution of metronidazole and its two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treatment human and mice. **Cancer Res.**, 37: 629-633.
- Cosar P. and Juloue L. (1959): Activite de l' (hydroxy-2-ethyl)-1-methyl-2-nitroso-5-imidazole) vis-à-vis des infections experimentales a *Trichomonas vaginalis*. **Annales de l' Institut Pasteur**, 96: 238-241.

Cupry I., Atlas D., Podevin R.A., Uziell I. and Parini A. (1989): Imidazoline receptive sites in renal proximal tubule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**: 293-299.

Dohlsten M, Sjögren H.O. and Carlsson R. (1987): Histamine acts directly on human T cells to inhibit Interleukin 2 and interferon gamma production. *Cell. Immunol.*, **101**: 493-501.

Edwards D.I. (1977): The action of metronidazole in DNA. *J. Antimicrob. Chemother.* **3**: 43-48.

Elizondo G, Montero R, Herrera J.E, Hong E. and Ostrosky-Wegman P. (1994): Lymphocyte proliferation kinetics and sister-chromatid exchanges in individuals treatment with metronidazole. *Mutation Res.*, **305**: 133-137.

Elizondo G, Gonsebatt M.E, Salazar A.M, Lares I, Santiago P, Herrera J.E, Hong E. and Ostrosky-Wegman P (en prensa): Genotoxic effects of metronidazole. *Mutation Res.*

Ernesberger P., Giuliano R., Willette R.N. and Reis D.J. (1990): Role of imidazole receptors in the vasodepressor response to clonidine analogs in the rostral ventrolateral medulla. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**: 408-417.

Feldmann M. (1974): T cell suppression *in vitro*. Nature of specific suppression factor. *Eur. J. Immunol.*, **4**: 667-674.

Garavoy M., Reddish M.A. and Rocklin R.E. (1983): Histamine-Induce Suppressor Factor (HSF): Inhibition of helper T cell generation and function. *J. Immunol.*, **15**: 357-361.

Gifford R.M, Ferguson R.M. and Voss B.V. (1981): Cimetidine reduction of tumor formation in mice. *Lancet*, **i**: 638-639.

Gillis S., Ferm M.M, Ou W. and Smith K.A. (1978): T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.*, **120**: 2027-2032.

Gonzalez F. and Nebert D.W. (1990): Evolution of P450 gene superfamily: Animal-plant warfare, molecular level drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.*, **6**: 182-187.

Graham H.T, Lowry O.H, Wheelwright F. and Lenz M.A. (1985): Distribution of histamine among leukocytes and platelets. *Blood*, **10**: 467-481.

Griswold D.E, Alessi S, Badger A.M, Poste G. and Hanna N. (1984): Inhibition of T suppressor cell expression by histamine type receptor antagonists. *J. Immunol.*, **132**: 3054-3057.

Gupta, M.B, Nath R, Tangri K. and Bhargava K.P. (1976): Antiulcerogenic action of metronidazole in rats and guinea pigs. *Indian J. Med. Res.*, **64**: 1077-1080.

Hadden J.W, Coffey R.G, Hadden E.M, López-Corrales E. and Sunshine G.H. (1975): Effects of levamisole and imidazole on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotid levels. **Cell. Immunol.**, 20: 98-103.

IARC (1987): **Evaluation of carcinogenic risk to human**. Supplement 6, World Health Organization, Lyon France, 399-405.

Ivett J.L. and Tice R.R. (1982): Average generation time: a new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. **Environ. Mutagen. (abstract)**, 4: 358.

Kamisaki Y., Ishikawa T., Takao Y., Omodani H., Kuno N. and Itoh T. (1990): Binding of (³H) p-aminoclonidin to two sites, α_2 -adrenoreceptors and imidazoline binding sites. **Brain Res.**, 514: 15-21.

Karnushina I.L, Palacios J.M, Barbin G, Dux E, Joo F. and Schwartz J.C. (1980): Studies on capillary-rich fraction isolated from brain histamine components and characterization of the histamine receptors linked to adenylate cyclase. **J. Neurochem.**, 34: 1201-1208.

Kellermann G, Shaw S.R. and Luyten-Kellermann M. (1973): Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogenic carcinoma. **New Engl. J. Med.**, 189: 934-937.

Kendall D.A., Fekany J.W. and Enna S.J. (1980): Properties of ³H-cimetidine binding in rat brain membrane fractions. **Life Sci.**, 26: 1293-1302.

Khan M.M, Sansoni P, Engleman E.G. and Melmon K.L. (1985): Pharmacological effects of autacoids on subsets of T cells: regulation of expression/function of histamine-2 receptors by a subset of suppressor cells. **J. Clin. Invest.**, 75: 1578-1583.

Lichstestein L.M. and Gillespie E. (1973): Inhibition of histamine release by histamine controlled by H₂ receptors. **Nature (London)**, 244: 287-288.

Lichstestein L.M. and Margolis S. (1968): Histamine release *in vitro*: inhibition by catecholamines and methylxanthines. **Science**, 161: 902-903.

Loft S, Otton S.V, Lennard M.S, Tucker G.T. and Poulsen H.E. (1990): Characterization of metronidazole metabolism by human liver microsomes. **Biochem. Pharmacol.**, 41: 1127-1134.

Loft S. and Poulsen H.E. (1989): Metabolism of metronidazole and antipyrine in isolated rat hepatocytes. **Biochem. Pharmacol.**, 38: 1125-1136.

Melmon K.L. and Khan M.M. (1987): Histamine and its lymphocyte-selective derivatives as immune modulators. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 8: 437-441.

ESTA TESIS DE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Melmon K.L, Rocklin R.E. and Rosenkranz R.P. (1981): Autacoids as modulators of the inflammatory and immune response. *Am. J. Med.*, 71: 100-106.

Merluzzi V.J, Badger A.M, Kaiser C.W. and Cooperband S.R.(1975): *In vitro* stimulation of murine lymphoid cell cultures by levamisole. *J. Clin. Exp. Immunol.*, 22: 486-490.

Moorhead P.S, Howell P.D., Mellman W.J, Battips D.M. and Hungerford D.A. (1960): Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, 20: 613-619.

Namba Y., Jegasothy B.U. and Waksman B.H. (1977): Regulatory substances produced by lymphocytes. *J. Immunol.*, 118: 1379-1384.

Nebert D.W. (1991): Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutation Res.*, 247: 267-281.

Nebert D.W. and González F.J. (1987): P450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 945-993.

Ogden B.E. and Hill H.R. (1980): Histamine regulates lymphocyte mitogenic response through activation of specific H₂ histamine receptors. *Immunology*, 41: 107-114.

Osband M.E, Shen Y.J, Sillesinger M, Brown A, Hamilton D, Cohen E, Lavin P. and McCaffrey R. (1981): Successful tumor immunotherapy with cimetidine in mice. *Lancet*, i: 636-638.

Ostrosky-Wegman P, García G, Montero R, Pérez B, Alvarez R. and Cortinas de Nava C. (1986): Susceptibility to genotoxic effects of niclosamide in human peripheral lymphocytes *exposed in vitro* and *in vivo*. *Mutation res.*, 173: 81-87.

Perry P. and Wolff S. (1974): New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid. *Nature (London)*, 251: 156-158.

Plaut M. and Lichstestein L.M. (1982): Histamine and immune response. In: Ganellin C.R. and Parson M.E. (Ed), *Pharmacology of histamine receptors*, J. Wright, Bristol, England, pp 392-435.

Regunathan S., Meeley M.P. and Reis D.J. (1991): Clonidine displacing substance from bovine brain binds to imidazoline receptors and release catecholamines in adrenal chromaffin cells. *Mol. Pharmacol.*, 40: 884-888.

Renoux G. and Renoux M. (1971): Immunostimulating effect of an imidothiazole in the immunization of mice against *Brucella abortus* infection. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 272: 349-350.

Renoux G. and Renoux M. (1972): Action of tetramisole on the graft versus host reaction. Role of macrophages. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **274**: 3149-3151.

Rigal D., Monier J.C. and Souwenie G. (1979): The effect of histamine on leukocytes test in man. *J. Immunol.*, **46**: 360-372.

Rising T.J., Norris D.B., Warrander S.E. and Wood T.P. (1980): High affinity ³H-cimetidine binding in guinea-pig tissues. *Life Sci.*, **27**: 199-206.

Rocklin R.E. (1976): Modulation of cellular immune response *in vivo* and *in vitro* by histamine receptor-bearing lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, **57**: 1051-1057

Rocklin R.E. (1977): Histamine-induced suppressor factor (HSF): Effect on migration inhibitory factor (MIF) production and proliferation. *J. Immunol.*, **118**: 1134-1738.

Rocklin R.E., Breard J, Gupta S, Good R.A. and Melmon K.L. (1979): Characterization of human blood lymphocytes that produce a Histamine-Induced Suppressor factor (HSF). *Cell. Immunol.*, **51**: 226-237.

Rocklin R.E., Remold H.G. and David J.R. (1982): Characterization of human migration inhibitory factor (MIF) from antigen-stimulated lymphocytes. *Cell. Immunol.*, **5**: 436-440.

Rustia M. and Shubik P. (1972): Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J. Natl. Cancer Inst.*, **48**: 721-729.

Sansoni P, Silberman E.D, Khan M.M, Melmon K.L. and Engleman E.G. (1985): Immunoregulatory T cells in man: Histamine induce suppressor T Cells and derived from Leu 2+ (T+) subpopulation distinct from that which gives rise to cytotoxic T cells. *J. Clin. Invest.*, **75**: 650-656.

Saxena S.P, Brandes L.J, Becker A.B, Simons K.J, Labella F.S. and Gerrard J.M. (1989): Histamine in an intracellular messenger mediating platelet aggregation. *Science*, **243**: 1596-1599.

Schwartz A, Askenase P.W. and Gershon M. (1980): Histamine inhibition of the *in vitro* induction of cytotoxic T cell responses. *Immunopharmacology*, **2**: 179-190.

Schwartz J.C, Arrang J.M. and Garbarg M. (1986): Three classes of histamine receptor in brain. *Trends Pharmacol. Sci.*, **7**: 24-28.

Sen P, Chakravarty A.K. and Kohli J. (1991): Effects of some imidazoles on cellular immune response. An experimental study. *Indian J. Exp. Biol.*, **29**: 867-869.

Smith I.R., Cleverley M.T., Ganellin C.R. and Metters K.M. (1980): Binding of (³H)-cimetidine to rat brain tissue. *Agents Actions*, **10**: 422-426.

Stambaugh J.E, Feo L.J. and Manthei R.W. (1968): The isolation and identification urinary oxidative metabolism of metronidazole in man. **J. Pharm. Exp. Ther.**, **161**: 373-381.

Stohs S.J. and Wu C.L. (1982): Effect of various xenobiotics and steroids on aryl hydrocarbon hydroxylase activity on intestinal and hepatic microsome from rats. **Pharmacology**, **25**: 237-249-

Sunshine G.H, López-Corrales E, Hadden E.M, Coffey R.G, Wanebo H, Hadden J.W. and Rojas A. (1977): **Modulation of host immune resistance in the prevention of treatment of induced neoplasia**. Fogarty International Proceeding, Washington. 38 pp.

Suzuki S. and Hutchet R. (1981): Mechanisms of histamine-induced inhibition of lymphocyte response to mitogen in mice. **Cell. Immunol.**, **62**: 396-405.

Tadamura T., Kuhner A.L., Rich R.R., David J.R. and Pierce C.W. (1976): Biological expression of lymphocyte activation. **J. Immunol.**, **118**: 323-330.

Tesson F., Prip C., Lemuine A., Pregorier J.P. and Parini A. (1991): Subcellular distribution of imidazoline receptive sites in human and rabbit liver. **J.Biol.Chem**, **260**: 155-160.

Tripodi D, Parks L.C. and Brugmans J. (1973): Drug induce restoration of cutaneous delayed hypersensitivity in anergic patients with cancer. **New Engl. J. Med.**, **289**: 354-356.

Vesell, E.S. (1978): Twin studies in pharmacogenetic. **Hum. Genet.**, **1**: 19-30.

Voogd C.E., Van der Stel J.J. and Jacobs J.A. (1974): The mutagenic action of nitroimidazoles. **Mutation Res.**, **26**: 483-490.

Warrander S.C., Norris D.B., Rising T.J. and Wood T.P. (1983): ³H-cimetidine and the H₂-receptor. **Life Sci.**, **33**: 1119-1126.

Weiss A. (1993): **Fundamental Immunology**. 3 ed., Raven press, New York. 811 pp.

Weissman G., Zurier R.B. and Hoffstein S. (1974): **Leukocytes as secretory organs of inflammation: Control by cyclic nucleotides and autonomic agonist**. W. Braun and C. Parker, Academic Press, New York. 176 pp.

Whitcomb M.E, Merluzzi V.J and Cooperband S.R (1976): The effect of levamisole on human lymphocyte mediates production *in vitro*. **Cell. Immunol.**, **21**:272-277.

Yellin T.O., Buck S.H., Gilman D.J., Jones D.F. and Wardleworth J.M. (1979): A new gastric antisecretory agent acting on histamine H₂ receptor. **Life Sci.**, **25**: 2001-2009.

APENDICE

EFFECTS OF METRONIDAZOLE AND ITS METABOLITES ON HISTAMINE
IMMUNOSUPPRESSION ACTIVITY.

Guillermo Elizondo and Patricia Ostrosky-Wegman.

Depto. Genetica y Toxicologia Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, P.O.Box 70228. Ciudad Universitaria, 04510, Mexico, D.F., Mexico.

Summary

We have previously reported that metronidazole treatment increases human lymphocyte proliferation showing individual differences. This drug and its metabolites are imidazole compounds like histamine and cimetidine. The first is an endogenous amine that inhibits T-helper lymphocyte proliferation, and the second is a histamine antagonist agent. We presently report the *in vitro* effects of histamine, cimetidine, metronidazole, its two principal metabolites (the acetic acid and hydroxy forms), and imidazole, on the mitogenic response to phytohemmagglutinin (PHA) stimulation of human peripheral blood lymphocytes. Histamine decreased lymphocyte proliferation while, in the next potency order, cimetidine, the hydroxy metabolite, imidazole and metronidazole, increased the mitogenic response to PHA in a dose-response way. The acetic acid metabolite lacked immunomodulatory effects. Competitive studies showed that cimetidine, metronidazole, and the hydroxy metabolite blocked the inhibitory effect of histamine on lymphocyte proliferation in a dose-related manner. This blockage was non-competitive, suggesting that the target of the imidazole compounds was not the active site of the H₂ receptor.

Key Words: Metronidazole, histamine, cimetidine, imidazole, lymphocyte proliferation

Imidazole compounds are medically important agents, widely used as antimicrobial and antiparasitic drugs. Some of them have been proposed as radiosensitizers (1, 2) and immunomodulating agents (3, 4), levamisole which is used as a treatment for helminth infestations, increases various immune parameters, particularly delayed-type hypersensitivity reaction (5), lymphocyte blastogenesis (6), and restores a variety of depressed immune responses (7, 4).

Corresponding author: Dr. Patricia Ostrosky-Wegman, Ph.D, Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, P.O.Box 70228. Ciudad Universitaria, 04510, Mexico, D.F., Mexico. Telephone: (525)6223366, Fax: (525)6223846, E-mail: ostrosky@servidor.unam.mx

Metronidazole is a nitro-imidazole derivative (Fig. 1) widely used for the treatment against amebiasis (8), trichomoniasis (9) and giardiasis (10). It is also used for the treatment of anaerobic bacterial infections (11).

In a recent study we reported that metronidazole treatment in man increases lymphocyte proliferation (12). We also observed an individual susceptibility to metronidazole immunostimulation, which could be due to metabolic differences since it is biotransformed by CYP 1A1, a polymorphic cytochrome (13, 14).

Metronidazole metabolites which have been reported in human urine are the hydroxy (1(2-hydroxymethyl) 2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazole), and the acetic acid (2-methyl-5-nitro-imidazole-1-acetic acid) forms (Fig. 1). A wide variation in the amounts of metronidazole and its metabolites in human urine has been reported, presumably due to differences in metabolism (15). The PHA-mitogenic stimulation of murine lymphocytes is enhanced 40.5 fold by the hydroxy metabolite and 7.4 fold by the parental compound (16).

Histamine is an endogenous amine with an imidazole ring that has been identified as a strong regulator of the immune system (17). When lymphocyte proliferation reaches a limit, histamine is released by basophils, decreasing cell division by the interaction with lymphocyte H₂ receptors (18, 19). Histamine binding to H₂ receptors triggers the activation of the immune cascades with several responses. Some of these are the direct down regulation of the synthesis and release of interleukin 2 and interferon γ by CD4 lymphocytes (20, 21), and the release of Histamine Suppressor Factor (HSF) by CD8 lymphocyte (19, 22). These immunosuppressor effects are blocked by cimetidine, a selective histamine H₂-receptor antagonist (22, 23), sharing an imidazole structure.

Because of structural similarities between metronidazole and its two principal metabolites (the hydroxy and acetic acid forms) with histamine and cimetidine (Fig. 1), we suggest that the changes on lymphocyte proliferation induce by metronidazole are due to the blockage of histamine inhibitory action, presumably at H₂-receptor level.

The aim of the present study was to evaluate if lymphocyte proliferation alteration observed after metronidazole treatment (12) is due to blocking of histamine inhibitory effects, and to compare the effects of metronidazole and its metabolites on lymphocyte proliferation, in order to establish metabolic differences that could explain the observed individual susceptibility.

Methods

Compounds used in the present study were tested in whole human blood lymphocyte cultures. Lymphocyte proliferation was determined by mitotic and replication indexes. Metronidazole metabolites were a generous gift from Rhone Poulenc Pharmaceutical Co. Metronidazole, histamine, cimetidine, and imidazole were obtained from Sigma.

Cell sources. Heparinized blood samples were obtained from three healthy donors aged 25-30 years.

Cell culture. Whole blood samples (0.5 ml) were PHA-stimulated (0.2 ml, Gibco), and cultured in RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with non-essential amino acids (10 mM, Gibco), L-glutamine (1 %, Gibco), and bromodeoxyuridine (32 μ M, Sigma). After 72 h cell

cultures were harvested. Colcemid (2 µg, Gibco) was added two h before harvesting. Single or double tested compounds were added at the beginning of the culture.

Slides stain. Flame-dried preparations of chromosomes were obtained and stained in Hoescht 33258 (0.5 µg / ml) for 30 min, exposed to black light (1.5-2.0 hr) and stained for 5 min in a 2 % Giemsa solution in phosphate buffer, pH 6.8 (24). The mitotic index was scored as the number of metaphase cells in 4,000 lymphocyte nuclei. Cell proliferation kinetics was evaluated in the first 100 metaphases, determining the proportion of first (M1), second (M2) and third (M3) mitotic divisions. The replication index (RI) was calculated according to the formula:

$$RI = \frac{(M1) + (M2) 2 + (M3) 3}{100}$$

Statistical analysis. Student's paired *t* test and analysis of variance were used for statistical comparison, $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant. Results were presented as a mean \pm E.S. The apparent maximum binding (Bmax) and dissociation constant (Kd) were calculated throughout the data fitting to a binding isotherm:

$$Y = B_{max} [X / (Kd + X)]$$

Results

The direct effects of histamine, cimetidine, metronidazole, and its two principal metabolites, the hydroxy and acetic acid forms, over a range of concentrations, were tested on PHA-stimulated peripheral human blood lymphocyte cultures. The results of histamine and cimetidine treatment are shown in Table I and II respectively. Histamine produced a dose-response inhibitory effect on the mitotic and replication indexes, while cimetidine enhanced both parameters also in a dose-response fashion.

The effects of metronidazole and its metabolites are shown in Fig. 2. Metronidazole and its hydroxy metabolite induced an increase in the replication and mitotic indexes, in a dose-response way, the hydroxy metabolite being the more potent. The acetic acid metabolite lacked immunomodulatory effects.

Since all the drugs used in this study were imidazole compounds, we evaluated the imidazole moiety proliferative effects. Imidazole also increased, in a dose-response way, the replication and mitotic indexes with a potency similar to the hydroxy metabolite (Fig. 2). Thus, changes on lymphocyte proliferation effects can be correlated with the imidazole ring.

Table III shows the apparent maximum binding (Bmax) and dissociation constant (Kd) for the tested drugs. No differences were observed in the Bmax values obtained from mitotic or replication indexes between drugs, except for histamine Bmax, which was smaller. The Kd values obtained from mitotic index curves suggest the next affinity order: histamine = cimetidine > hydroxy metabolite > imidazole > metronidazole, whereas the affinity order to Kd values obtained from replication studies were: histamine > imidazole > cimetidine = hydroxy metabolite > metronidazole.

Due to the structural and stimulatory effect similarities between cimetidine (H_2 -receptor antagonist), metronidazole and the hydroxy metabolite, we performed competitive studies between each of them and histamine. Cimetidine blocked the histamine inhibitory effects on the replication and mitotic indexes. This blockage was dose-related (Fig. 3). Metronidazole and hydroxy metabolite also blocked the histamine inhibitory effects on both indexes in a dose-related way (Fig. 4 and 5). From these curves we calculated the histamine K_d and B_{max} change (Table IV). All compounds produced a significant change in the histamine B_{max} , whereas there was no change in the K_d . These results point out that cimetidine, metronidazole and the hydroxy metabolite blocked the histamine inhibitory action in a non-competitive way.

Discussion

The inhibitory effect of histamine on the mitotic and replication indexes (Table I) is a consequence of its immunomodulatory actions. It inhibits the interleukin 2 and interferon γ synthesis needed for lymphocyte proliferation (21). Moreover, histamine induces the release of HSF from CD8 lymphocytes, which inhibits the CD4 lymphocyte proliferation (22).

Cimetidine, a selective histamine H_2 -receptor antagonist, metronidazole and its hydroxy metabolite induced an increase in the mitogenic PHA lymphocyte response - the hydroxy metabolite induced a more potent effect than metronidazole - while the acetic acid metabolite lacked of effects on lymphocyte proliferation (Table II, Fig. 2). Since metronidazole is biotransformed by the polymorphic cytochrome P450 1A1 to the hydroxy form (13, 14) with more potent effects on lymphocyte proliferation than the parental compound, and considering the wide range in the amount of metronidazole and its metabolites in human urine (15), individual susceptibility to metronidazole on lymphocyte proliferation effects reported previously (12) could be due to this metabolic difference. In a previous study (25) it has been shown that different pharmacokinetic capacities of individuals may be a factor responsible for the widely observed variation in metronidazole mutagenic effects.

It has been reported that levamisole, an antihelminthic imidazole agent, induces lymphocyte proliferation (26, 27), whereas cimetidine produces a similar response by human lymphocytes, with increases in cytokine levels such as interleukin 2 (28, 29). These immunoregulatory effects could be correlated with the imidazole moiety of the agents used on this work. Due to this, we tested the imidazole effects on lymphocyte proliferation kinetics. The compound increased the mitotic and replication indexes in a dose-response way with a similar potency to the hydroxy metabolite (Fig. 2). This result supports the notion of a relationship between the imidazole structure and the immunoregulatory activity.

By fitting mitotic or replication data to a binding isotherm curve, we calculated the K_d and B_{max} values for each compound (Table III). The histamine B_{max} values obtained from mitotic and replication studies were the lowest because, while the rest of the tested compounds enhanced the PHA-mitogenic stimulation response, histamine inhibited it. Regarding the mitotic index, the histamine and cimetidine K_d values were the lowest (4.9 and 4.2 nmolar, respectively). Imidazole and the hydroxy metabolite K_d values were two orders of magnitude higher than the histamine K_d (800 and 500 nmolar, respectively), while metronidazole K_d was three orders of magnitude higher than histamine K_d (17.6 μ M). The K_d s obtained in this study are comparable to K_d s reported from other H_2 -antagonists, such as burimamide and metiamide (30).

As to the replication index, the K_d , in general, decreased with respect to the mitotic K_d values but the K_d compound order was maintained as before, except for the cimetidine k_d , which showed significant increase of two orders of magnitude (Table III). These data lead to the conclusion that histamine was the compound with the highest immunomodulatory potency, metronidazole with the smallest, while imidazole and the hydroxy metabolite were the imidazole agents with intermediate immunoregulatory potency.

The acetic acid metabolite was not used in the competitive studies because it lacked immunomodulatory effects. All the other compounds, i.e., cimetidine, metronidazole and its hydroxy metabolite, blocked the histamine inhibitory effects in a dose-related way (Fig. 3, 4 and 5). There was no change in K_d , but there was in the histamine B_{max} (Table IV), indicating a non-competitive blockage. This means that cimetidine, metronidazole, and its hydroxy metabolite were not acting at the active site of the H_2 -receptor. Some explanations about the effects of the imidazole compounds should be considered: 1) These actions were unspecific, although all tested agents had saturable kinetics with a high fitness correlation factor to a binding isotherm curve and, at least for cimetidine, a high affinity saturable component of H_2 -receptor binding has been reported (31). Moreover, levamisole and imidazole alter the cyclic nucleotide levels associated with various membrane receptors such as $GMPc$ and $AMPc$ (32). 2) However, (3H)cimetidine is not displaced from the H_2 -receptors by other H_2 non-imidazole antagonists with higher affinity, while it is displaced by imidazole compounds, even without histaminergic effects (31, 33, 34). These data suggest that the binding site labeled by (3H)cimetidine represents an imidazole recognition site other than the active site of the H_2 -receptor, and it may be an H_2 allosteric site. Metronidazole, its hydroxy metabolite and imidazole, could also act at this suggested allosteric site. 3) Imidazole compounds could act, also, on $cAMP$ -phosphodiesterase, like levamisole, promoting the breakdown of $cAMP$ and an increase in lymphocyte proliferation (32). 4) The last possibility is a new receptor, coupled to the lymphocyte's membrane, that recognizes the imidazole structure and, through it, these agents would induce an increase in lymphocyte proliferation, masking the histamine inhibitory effects. These receptors could be the imidazoline receptors reported by Atlas (35), which were localized in different tissues and organs, such as the brain (36), liver (35), lung, and adrenal chromaffin cells (37). Furthermore, it has been reported that cimetidine, histamine (38), and acetic acid imidazole compound (39) interact with imidazoline receptors in the rat brain.

Finally, further studies are needed to elucidate the exact imidazole compound action site at lymphocyte level, and the relationship between the imidazole structure and lymphocyte proliferation in order to explore and use the immunomodulatory characteristics of the imidazole drugs.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the generous gift of metronidazole metabolites by Dr. Jose Aguilar from Rhone Poulenc Co. This work was supported by PADEP, CONACyT and GSF. Isabel Perez Monfort corrected the English version of the manuscript.

References

1. M.E. OSBAND, Y.J. SHEN, M. SHLESINGER, A. BROWN, D. HAMILTON, E. COHEN, P. LAVIN and R. McCAFFREY, *Lancet*, 21 636-638 (1981).

2. J.L. FOSTER, P.J. CONREY, A.J. SEARLE and R.L. WILLSON, *Br.J.Cancer*, 33 485-490 (1976).
3. J. AVELLA, H.J. BINDER, J.E. MADSEN and P.W. ASKENASE, *Lancet*, 25 624-326 (1978).
4. C.G. MOERTEL, T.R. FLEMING and J.S. MACDONAL, *New Engl.J.Med.*, 322 352-358 (1990).
5. J. SYMOENS and M. ROSENTHAL, *J.Reticul.Soc.*, 21 121-175 (1977).
6. V.J. MERLUZZI, A.M. BADGER, C.W. KAISER and S.R. COOPERBAND, *Clin. Exp. Immunol.*, 22 486-492 (1975).
7. P.O. OGUNBIBYI, W.D. BLACK and P. EYRE, *J.Vet.Pharmacol.Ther.*, 11 338-344 (1988).
8. S.J. POWELL, *Advan. Pharmacol. Chemother.*, 10 91-103 (1966).
9. P. COSAR and L. JULOUÉ, *Ann. Institut Pasteur*, 96 238-241 (1959).
10. R.B. KHAMBATTA, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 65 487-489 (1971).
11. I. LARES, J.CRAVIOTO, P. SANTIAGO AND B. PEREZ, *Scand. J. Infect. Dis.*, 25 115-121.
12. G. ELIZONDO, R. MONTERO, J.E. HERRERA, E. HONG and P. OSTROSKY-WEGMAN, *Mutation Res.*, 305 133-138 (1994).
13. S. LOFT and H.E. PULSEN, *Biochem. Pharmacol.*, 38 1125-1136 (1988).
14. S. LOFT, S.V. OTTON, M.S. LENNARD, G.T. TUCKER and H.E. POULSEN, *Biochem. Pharmacol.*, 41 1127-1134 (1991).
15. J.E. STAMBAUGH, L.G. FEO and R.W. MANTHEI *J.Pharm. Exp. Ther.*, 161 373-381 (1968).
16. V.BARH and U.ULLMAN, *Eur. J.Clin.Microbiol.*, 2 568-570 (1983).
17. K.L. MELMON and M.M. KHAN, *Trens. Pharmacol. Scie.*, 8 437-441 (1987).
18. R.E. ROCKLIN, *J.Clin.Invest.*, 57 1051-1058 (1976).
19. D.J. BEER and R.E. ROCKLIN, *CRC Crit.Rev.Immunol.*, 7 55-91(1987).
20. R. CARLSSON, M. DOHLSTEN and H.O. SJOGREN, *Cell Immunol.*, 96 104-112 (1985).
21. M. DOHLSTEN, H.O. SJOGREN and R. CARLSSON, *Cell Immunol.*, 109 65-74 (1987).
22. S. SUZUKI and R. HUCHET, *Cell Immunol.*, 68 349-358 (1982).
23. M.M. KHAN, P. SANSONI, E. ENGLEMAN. and K.L. MELMON, *J.Clin.Invest.*, 75 1378-1573 (1985).
24. P. PERRY and S. WOLFF, *Nature (London)*, 251 156-158 (1974).
25. P. OSTROSKY-WEGMAN, I. LARES, P. SANTIAGO, G. ELIZONDO and R. MONTERO, *Mutation Res.*, 307 253-259 (1994).
26. G. RENOUX and M. RENOUX, *J.Immunol.*, 109 761-765 (1972).
27. N. HASSAN, M.D. TAKI and A. STANLEY, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 16 129-137 (1994).
28. R.M. GIFFORD, S.M. HATFIELD, and J.R. SHMIDTKE, *Transplantation*, 29 143-147 (1980).
29. K. MARKIEWICZ, P. MALEC, and THORZEWSKI, *Immunol.Lett.*, 10 19-23 (1985).
30. H.R. BOURNE, K.L. MELMON AND L.M. LICHSTESTEIN, *Science*, 173 743-745 (1971).
31. I.R. SMITH, M.T. CLEVERLEY C.R., GANELLIN and K.M. MATTERS, *Agents Action*, 103 422-426 (1980).
32. J.W. HADDEN, R.G. COFFEY, E.M. HADDEN, E. LOPEZ-CORRALES and G.H. SUNSHINE, *Cell.Immunol.*, 20 98-103 (1975).
33. D.A. KENDALL, J.W. FEKANY and S.J. ENNA, *Life Sci.*, 26 1293-1302 (1980).
34. S.E. WARRENDER, D.B. NORRIS, T.J. RISING and T.P. WOOD, *Life Sci.*, 33 1119-1126 (1983).
35. D. ATLAS, *Eur. J. Pharmacol.*, 190 203-215 (1990).
36. S. REGUNATHAN, M.P. MEELEY, D.J. and REIS, *Mol.Pharmacol.*, 40 884-888 (1991).
37. M. OHARA-IMAIZUMI and K. KUMAKURA, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 12 273-283 (1992).

38. Y. KAMISAKI, T. ISHIKAWA, Y. TAKAO, H. OMODANI, N. KUNO, and T. ITOH, *Brain Res.*, 514 15-21 (1990).
39. P. ERNSBERGER, M.P. MEELEY and D.J. REIS, *Brain Res.*, 441 309-318 (1988).

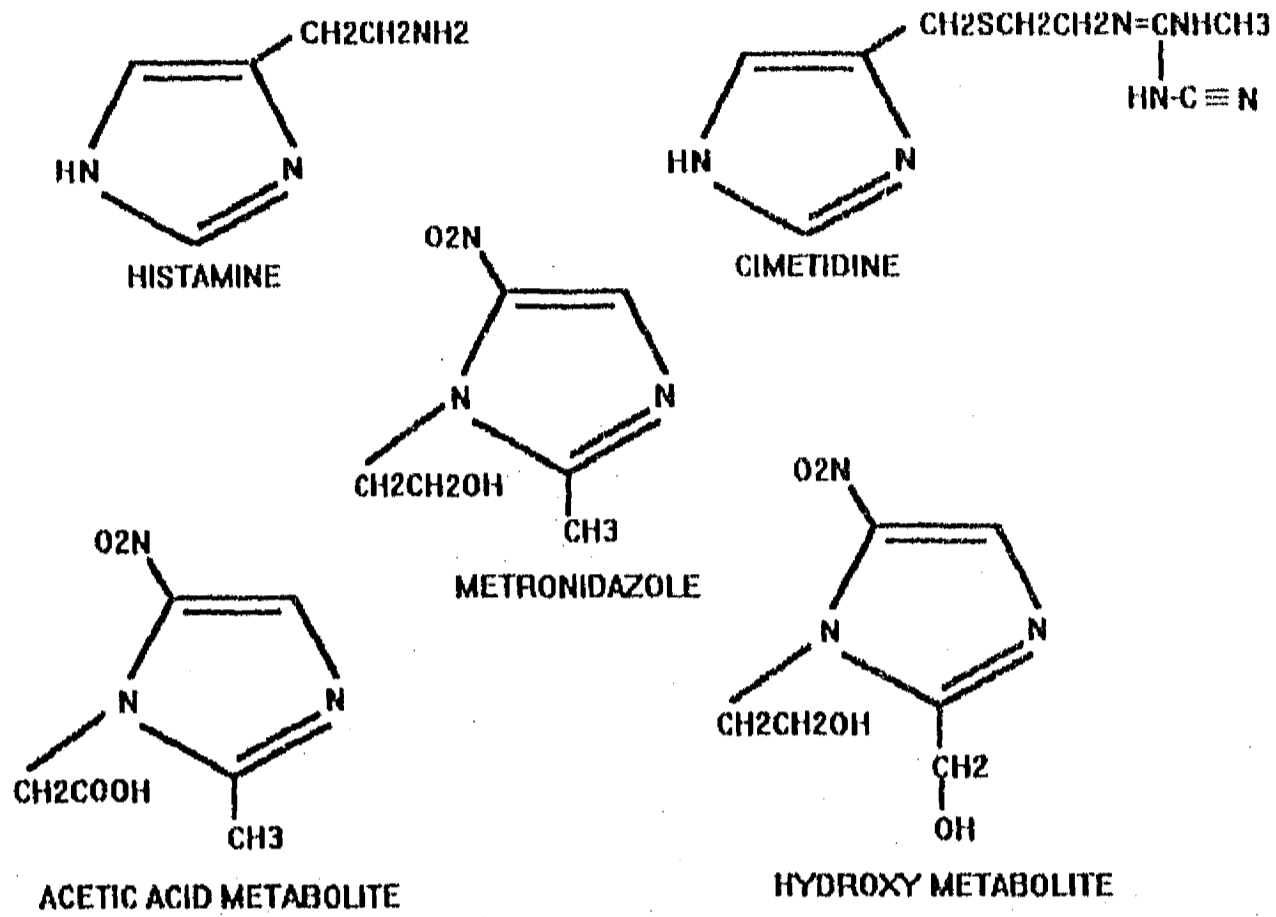


Fig. 1

Structures of histamine, cimetidine, metronidazole, and the acetic acid and hydroxy metronidazole metabolites.

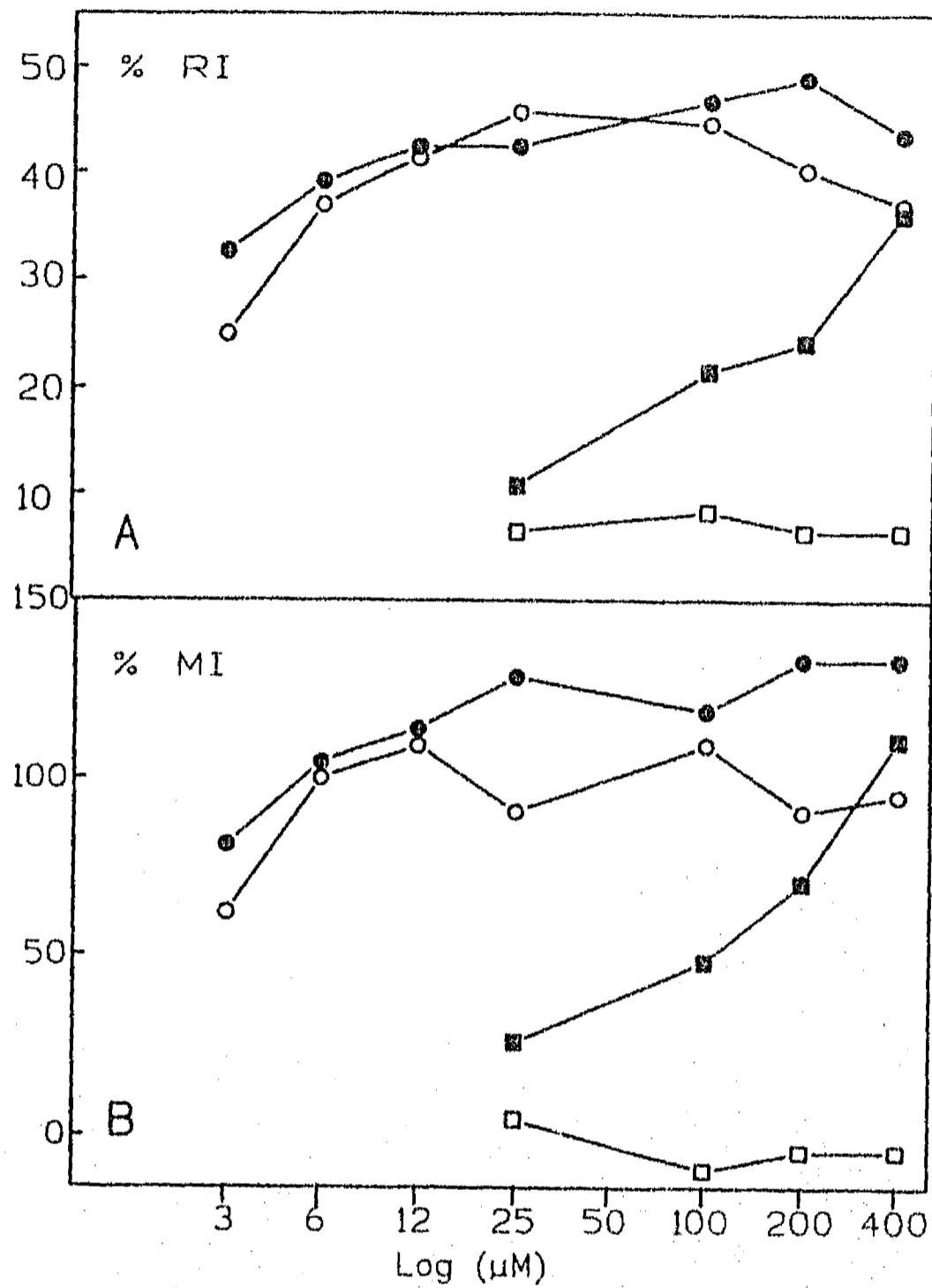


Fig. 2

Effects of imidazole (●-●), metronidazole (■-■) and its hydroxy (○-○) and acetic acid (□-□) metabolites on (A) the replication index (RI), and (B) the mitotic index with respect to the control (0 %). Each point represents the mean of duplicate evaluations of 3 individuals.

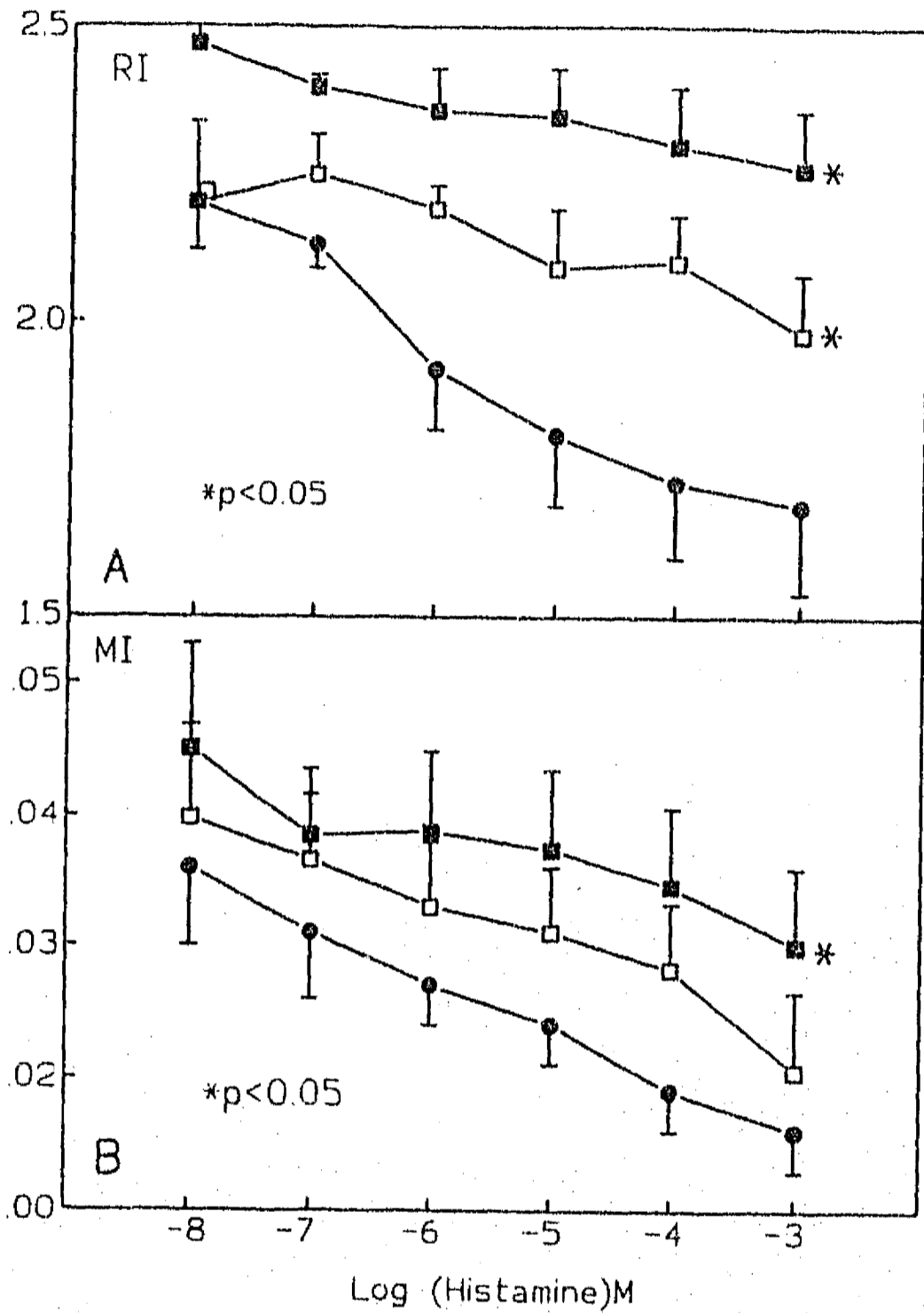


Fig. 3

Cimetidine (Log -6 M □-□, log -4 M ■-■) blockage effect of the histamine inhibitory action (●-●) on (A) the replication index (RI) and (B) the mitotic index (MI). Each point represents the mean of duplicate evaluations of 3 individuals. Error bars represents the standard error.

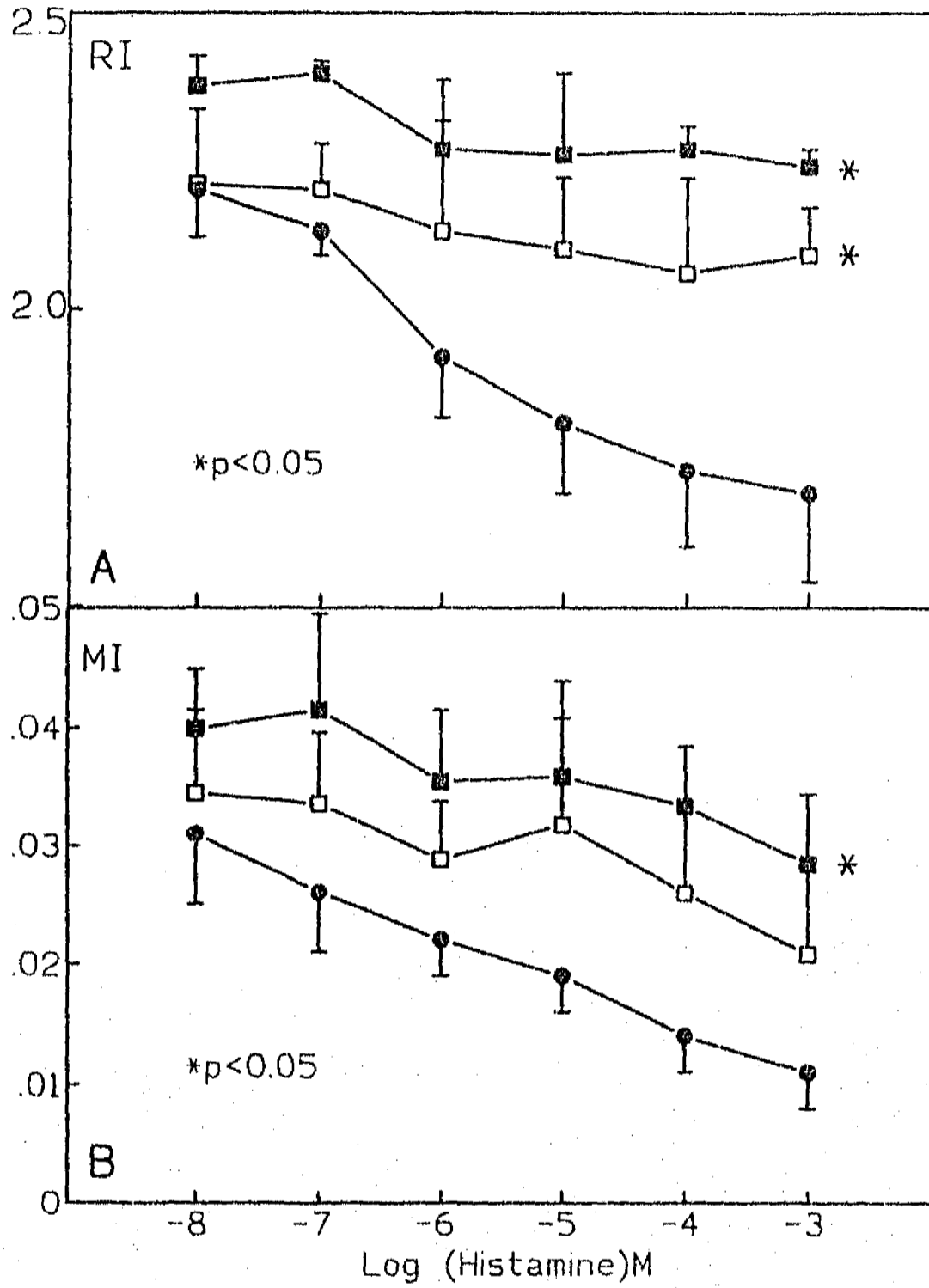


Fig. 4

Metronidazole (0.2 mM □-□, 0.4 mM ■-■) blockage effect of the histamine inhibitory action (●-●) on (A) the replication index (RI) and (B) the mitotic index (MI). Each point represents the mean of duplicate evaluations of 3 individuals. Error bars represents the standard error.

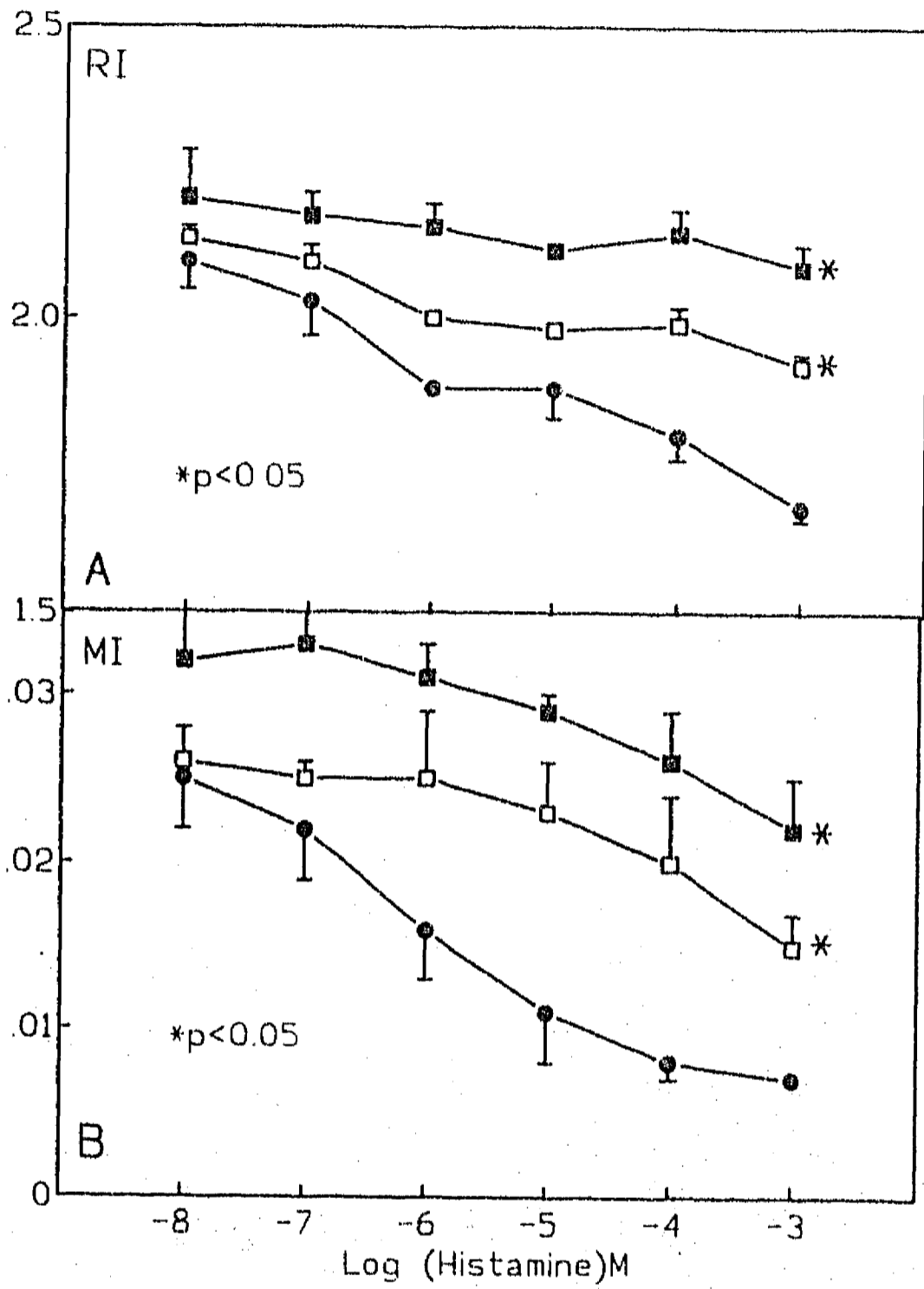


Fig. 5

Metronidazole hydroxy metabolite (0.2 mM □-□, 0.4 mM ■-■) blockage effect of the histamine inhibitory action (●-●) on (A) the replication index (RI) and (B) the mitotic index (MI). Each point represents the mean of duplicate evaluations of 3 individuals. Error bars represents the standard error.

TABLE I
Effects of Histamine on the Mitotic and Replication Index.

	Mitotic Index		Replication Index	
	x	S.E.	x	S.E.
Control	0.028	±0.003	2.11	±0.06
Log (histamine)M				
-8	0.025	±0.003	2.10	±0.05
-7	0.022*	±0.003	2.03*	±0.06
-6	0.016*	±0.003	1.88*	±0.01
-5	0.011*	±0.003	1.88*	±0.05
-4	0.008*	±0.001	1.80*	±0.04
-3	0.007*	±0.001	1.68*	±0.02

*p<0.05, x= average, S.E.= standard error, M= molar.

TABLE II
Effects of Cimetidine on the Mitotic and Replication Index.

Control Log (cimetidine) M	Mitotic Index		Replication Index	
	x	S.E.	x	S.E.
	0.027	±0.005	2.11	±0.06
-8	0.032*	±0.006	2.19	±0.10
-6	0.039*	±0.009	2.36*	±0.03
-4	0.045*	±0.008	2.48*	±0.09
-3	0.052*	±0.005	2.51*	±0.10

*p<0.05, x= average, S.E. = standard error, M= molar

TABLE III
Maximum Binding and Dissociation Constants of the Tested Compounds Obtained from
the Evaluation of Mitotic and Replication Indexes.

Compound	Mitotic Index			Replication Index		
	Bmax	Kd	r ²	Bmax	Kd	r ²
		μM			μM	
Histamine	0.012	0.0049	0.91	1.84	0.0012	0.99
Cimetidine	0.045	0.0042	0.98	2.18	0.2070	0.75
Imidazole	0.048	0.8120	0.99	2.34	0.1690	0.99
Hydroxy metabolite	0.042	0.5000	0.99	2.31	0.2000	0.99
Metronidazole	0.053	17.600	0.99	2.45	2.6800	0.99

Bmax= maximum binding, Kd= dissociation constant, r²= coefficient of correlation, μM = micromolar.

TABLE IV
Histamine Maximum Binding and Dissociation Constants Obtained from the Competitive Studies
with Cimetidine, Metronidazole and the Hydroxy Metabolite.

Mitotic Index							
histamine	cimetidine		MTZ		MTZ-OH		
	0.001mM	0.01mM	0.2mM	0.4mM	0.2mM	0.4mM	
B _{max}	0.012	0.075*	0.069*	0.071*	0.064*	0.078*	0.072*
K _d	0.0049	0.0017	0.0015	0.0017	0.0010	0.0007	0.0007

Replication Index							
histamine	cimetidine		MTZ		MTZ-OH		
	0.001mM	0.01mM	0.2mM	0.4mM	0.2mM	0.4mM	
B _{max}	1.84	2.11*	2.32*	2.11*	2.28*	1.99*	2.13*
K _d	0.0012	0.0015	0.0028	0.0014	0.0018	0.0018	0.0029

*p<0.05, B_{max}= maximum binding (micromolar), K_d= dissociation constant, MTZ= metronidazole, MTZ-OH= hydroxy metabolite