



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PARTICIPACIÓN DE CYP1A1 EN LA
BIOTRANSFORMACIÓN *IN VITRO* DEL
METRONIDAZOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

Q.F.B. FÁTIMA GARCÍA PILLADO



DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET

MÉXICO, D.F.

Abril 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo se realizó con la asesoría técnica de la Q.F.B. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes Facultad de Química, UNAM

Dr. Jorge Vázquez Ramos Facultad de Química, UNAM

Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet IIB, UNAM

Este proyecto estuvo apoyado por el PAPIIT-DGAPA (UNAM) **IN-210106-3**.

La sustentante fue beneficiada con una beca del CONACYT.

Jurado de examen de grado:

Presidente Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

Vocal Dr. Jorge Vázquez Ramos

Secretario Dr. Jaime Mas Oliva

Suplente Dra. Elizabeth Langley MacCarron

Suplente Dr. Alejandro Zentella Dehesa

*A mis padres y hermano,
Por brindarme siempre todo su amor, dedicación y apoyo
y por confiar en mí más de lo que yo misma soy capaz.*

A la memoria de Papá Esteban.

Quiero expresar mi agradecimiento

A mis padres por brindarme un hogar cálido. A ustedes debo mi educación y formación personal. Gracias por todo el apoyo y paciencia que me dieron desde que supieron de mi deseo de alcanzar otra de mis metas. Gracias por su ejemplo, su amor profundo y la total confianza en mis decisiones. Este trabajo no habría sido posible sin su esfuerzo y, en ocasiones, sacrificio personal. Los amo profundamente.

A mi Uli que siempre ha creído en mí. Gracias por aguantarme los días en que simplemente no puedo dejar de reír y los días en los que muerdo, por las desveladas, por el ajá, por ser mi amigo, mi cómplice, mi hermano. Te amo.

A mí querida Directora de Tesis, Dra. Patricia Ostrosky por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, por su constante estímulo para seguir creciendo personal e intelectualmente, y más que eso, por su cariño y comprensión. Porque, a pesar de todo, usted nunca dejó de confiar en mí. Mi cariño y gratitud eternos.

A la Dra. Ana María Salazar y a Monserrat Sordo por su cariño, calidez y compañerismo a lo largo de tantos años. Por su permanente disposición y desinteresada ayuda al compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante la realización de los experimentos. Las quiero mucho harto.

A todos mis compañeros de Laboratorio de Biomédicas, mi segunda familia. Juntos construimos conocimiento y vida. Gracias por su generosidad y por permitirme discutir no solo este trabajo, sino todo lo que sale de mi cabeza. Por todo su apoyo, por su continuo y afectuoso aliento para nunca dejarme tirar la toalla, los quiero mucho.

A la Sra. Marta Ramírez por su presencia, amistad y amor maternal. Martita muchas gracias por todo, la quiero muchísimo.

A mis cuatro puntos cardinales (en estricto orden alfabético) Gerardo Angeles, Hugo Hernández, Jonathan Rodríguez y Mónica Linares. Porque además de mi familia, ustedes son lo único constante en mi vida. Agradezco a la vida, al destino, a la Fuerza o a lo que sea que los haya puesto en mi camino, porque tenerlos conmigo es lo mejor que me pudo pasar.

A todos los que durante este tiempo han estado conmigo. Lo que he sido capaz de afrontar durante este tiempo ha sido gracias al apoyo de muchas personas que aunque lejos se han hecho sentir cerca. Muchas gracias.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por su permanente disposición para aclarar mis dudas, por sus sugerencias, observaciones críticas y el apoyo que siempre me da.

A mi Comité Tutorial por sus valiosas sugerencias y acertados comentarios durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Arnulfo Albores Medina por participar como invitado en mi comité tutorial y por sus aportaciones en el campo de los citocromos P450.

A la Dra. Regina Montero Montoya y al Q. Javier A. Belmont Díaz por sus comentarios y ayuda para la realización de experimentos que, aunque no están acá, le dieron rumbo a este trabajo.

Al M. en C. Humberto Gómez Ruiz y a Lucía Hernández por su valiosa colaboración que me permitió comprender y corregir conceptos fundamentales para la realización de la tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido durante la realización de la tesis.

A los miembros del H. Jurado por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme crecer en todos los aspectos de mi vida, por ofrecerme las oportunidades que contribuyeron a mi formación y porque aquí he vivido las mejores etapas de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

	Página	
1.0	Resumen	8
2.0	Introducción	10
2.1	Metabolismo de xenobióticos	10
2.2	Citocromo P-450	
	Características generales	13
	Nomenclatura	14
	Metabolismo mediado por citocromos P450	15
	Familia CYP1	16
	Familia CYP2	18
	Familia CYP3	20
3.0	Inducción de CYP1A1	21
	Cascada molecular de AhR	22
	Ligandos de AhR e inductores de CYP1A1	24
	Ligandos e inductores naturales	27
3.1	Excepciones del modelo clásico de inducción de CYP1A1 vía AhR.	30
	a) Activación de AhR e inducción de CYP1A1 independientes de ligando	30
	b) Inductores de CYP1A1 que no se unen a AhR	30
	Hipótesis del ligando débil	31
	Hipótesis del metabolito	31
	Hipótesis de vías alternas de inducción	
4.0	Metronidazol	32
	Clasificación y estructura química	32
	Farmacocinética	33
	Mecanismo de acción	33
	Metabolismo en mamíferos	34
	Efectos del Metronidazol	36
	a) Mutagenicidad y genotoxicidad	36
	b) Carcinogenicidad	37

5.0	Antecedentes que relacionan la biotransformación del metronidazol con citocromos P450	39
6.0	Hipótesis	40
7.0	Objetivos	41
8.0	Materiales y métodos	42
8.1	Parámetros de validación de la técnica de HPLC para la identificación y cuantificación del MTZ y sus dos principales metabolitos en solución.	42
8.2	Linealidad.	43
8.3	Límites de detección (LD) y cuantificación (LC).	43
8.4	Método de extracción de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH a partir de una matriz biológica compleja.	44
	Protocolo A	44
	Protocolo B	44
	Protocolo C	44
8.5	Cultivos Celulares y Tratamiento	
	A549	45
	HepG2	45
	Tratamiento	45
8.6	Evaluación del efecto citotóxico de benzo[a]pireno en A549 y HepG2.	46
8.7	Detección de la expresión de la proteína CYP1A1 por “Western blot”	
	Cultivos celulares y tratamiento.	47
	Extracción y cuantificación de la proteína “Western Blot”	47
8.8	Estudios de actividad enzimática	49
	Cultivos celulares y tratamiento	49
	Actividad enzimática de CYP1A1	49
8.9	Determinación del perfil de formación de metabolitos del MTZ in vitro	
	Cultivos celulares de A549 y HepG2.	50
	Cultivos celulares de linfocitos humanos.	50
	Tratamiento.	50

8.10	Determinación de MTZ,MTZ-OH y MTZ-COOH intra y extracelular por HPLC.	
	Sobrenadante	51
	Medio intracelular.	51
9.0	Resultados	52
9.1	Parámetros de validación de la técnica de HPLC para la identificación y cuantificación del MTZ y sus dos principales metabolitos en solución.	52
	Linealidad.	52
	Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC).	59
9.2	Método de extracción de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH a partir de una matriz biológica compleja.	62
9.3	Evaluación del efecto citotóxico de Benzo[a]Pireno en A549 y HepG2.	65
	Sobrevida celular	65
9.4	Expresión de la proteína CYP1A1 en cultivos de A549 y HepG2 inducidos con B(a)P.	69
9.5	Actividad enzimática EROD (7-etoxiresorufina O-desetilasa)	72
9.6	Determinación del perfil de formación de metabolitos del MTZ <i>in vitro</i> .	77
10.0	Discusión.	81
11.0	Conclusiones.	87
12.0	Bibliografía.	89

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Reacción enzimática de monooxigenación.	13
Figura 2. Representación del modelo de inducción por ligando de CYP1A1 vía AhR.	22
Figura 3. Estructuras de algunos ligandos sintéticos clásicos e inductores de la expresión de genes dependiente de AhR.	25
Figura 4. Estructuras de ligandos sintéticos no clásicos e inductores de la expresión de genes dependiente de AhR.	26
Figura 5. Estructuras de ligandos naturales no clásicos e inductores de la expresión de genes dependiente de AhR.	27
Figura 6. Ligandos e inductores de AhR derivados del triptofano.	28
Figura 7. Estructuras de algunos ligandos e inductores naturales de CYP1A1.	29
Figura 8. Estructura química del metronidazol.	32
Figura 9. Metabolismo de metronidazol en mamíferos.	35
Figura 10. Reacción enzimática catalizada por CYP1A1.	49
Figura 11. Cromatograma separación de MTZ y sus dos principales metabolitos (MTZ-OH y MTZ-COOH) en solución 0.5 µg/mL de cada compuesto.	53
Figura 12. Linealidad del método para MTZ-COOH.	56
Figura 13. Linealidad del método para MTZ-OH.	57
Figura 14. Linealidad del método para MTZ.	57
Figura 15. Cromatogramas de protocolos de extracción de una muestra fortificada con MTZ 25 µM a) Protocolo A, b) Protocolo B y c) Protocolo C.	63

Figura 16.	Viabilidad de células A549 tratadas con B(a)P durante 24 h.	65
Figura 17.	Viabilidad de células A549 tratadas con B(a)P durante 48 h.	66
Figura 18.	Viabilidad de células A549 tratadas con B(a)P durante 72 h.	66
Figura 19.	Viabilidad de células HepG2 tratadas con B(a)P durante 24 h.	67
Figura 20.	Viabilidad de células HepG2 tratadas con B(a)P durante 48h.	68
Figura 21.	Viabilidad de células HepG2 tratadas con B(a)P durante 72 h.	68
Figura 22.	a Determinación de la proteína CYP1A1 en células A549 tratadas con BaP durante 3, 6 y 12 h. b Gráfica de la densidad óptica del análisis de inmunoblots de lisados celulares de A549.	70
Figura 23.	a Determinación de la proteína CYP1A1 en células HepG2 tratadas con BaP durante 3, 6 y 12 h. b Gráfica de la densidad óptica del análisis de inmunoblots de lisados celulares de HepG2.	71
Figura 24.	Cinética de actividad basal de CYP1A1 en células HepG2.	73
Figura 25.	Actividad enzimática CYP1A1 inducido por BaP en células A549.	74
Figura 26.	Actividad enzimática CYP1A1 inducida por BaP en células HepG2	75
Figura 27.	Efecto del BaP en la inducción de la actividad enzimática de CYP1A1 (EROD) en células A549 y HepG2.	75
Figura 28.	Determinación intracelular de MTZ y metabolitos en células HepG2 tratadas con 25 µM de MTZ.	77
Figura 29.	Determinación extracelular de MTZ y metabolitos en células HepG2 tratadas con 25 µM de MTZ.	78
Figura 30.	Análisis cromatográfico del homogenizado celular de un cultivo de células HepG2 sin tratamiento.	79
Figura 31.	Análisis cromatográfico del homogenizado celular de un cultivo de células HepG2 tratadas con 50 µM de MTZ.	80

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Linealidad del método para el metabolito MTZ-COOH.	54
Tabla 2. Linealidad del método para el metabolito MTZ-OH.	55
Tabla 3. Linealidad del método para el metabolito MTZ.	55
Tabla 4. Coeficiente de variación determinado para la linealidad del método.	58
Tabla 5. Límite de detección del MTZ y sus dos principales metabolitos.	59
Tabla 6. Límite de cuantificación del MTZ y sus dos principales metabolitos.	59
Tabla 7. Repetibilidad para MTZ y sus dos metabolitos.	60
Tabla 8. Porcentaje de error y exactitud en [0.06 µg/mL] para metronidazol y sus dos metabolitos.	61

1. Resumen

El metronidazol (MTZ) es un fármaco antibacteriano y antiparasitario de amplio uso en el mundo, principalmente en países en vías de desarrollo. A pesar de su comprobada mutagenicidad y carcinogenicidad en animales, su potencial cancerígeno en humanos sigue siendo controversial, dada la limitada cantidad de estudios.

En mamíferos, incluido el humano, el metabolismo oxidativo es la vía más importante de biotransformación del MTZ ya que da origen a sus dos principales metabolitos: MTZ-OH y MTZ-COOH. De estos, el metabolito hidroxilado (MTZ-OH) presenta efectos genotóxicos más potentes que el MTZ-COOH y que el propio MTZ. Se sabe que aproximadamente el 40% del metabolismo de fármacos mediado por CYP450s es realizado por enzimas polimórficas. Por ello y dada la genotoxicidad de estos compuestos, resulta importante determinar cual CYP450 es responsable de metabolizar al MTZ; pues diferencias en la formación de sus metabolitos, podrían determinar la susceptibilidad de un individuo, al daño genotóxico y a los posibles efectos carcinogénicos inducidos por MTZ.

Existen pocos reportes acerca de la biotransformación hepática del MTZ. En estudios realizados en hepatocitos de rata se demostró que el 3-metilclorantreno (inductor de CYP1A1) incrementa la afinidad por la hidroxilación del MTZ; que a su vez se inhibe por α -naftoflavona y propanolol (inhibidores de CYP1A) Esto sugiere que CYP1A1 y/o CYP1A2 tienen una alta afinidad por la hidroxilación del MTZ. Por otro lado, la cinética bifásica que presenta la hidroxilación, indica que al menos dos sitios enzimáticos están involucrados en la reacción. En base a los datos, se proponen como responsables a CYP1A1 y CYP2E1 y excluyen a CYP1A2 y CYP2D6, sin embargo los datos existentes son contradictorios y los CYP450s participantes no han sido claramente identificados.

En este trabajo se planteó determinar si el CYP1A1 participa en la formación *in vitro* del metabolito MTZ-OH y/o MTZ-COOH. Para ello propusimos un método indirecto para determinar, si cambios en los niveles de esta proteína, nos permitían observar modificaciones en la formación de los metabolitos del MTZ.

El método consistió en la inducción de CYP1A1 con BaP, un inductor clásico de esta enzima, en cultivos de células metabólicamente competentes que después serían tratadas con MTZ para al final, verificar la presencia de los metabolitos; de ser posible, cuantificarlos y correlacionar modificaciones en su formación con la inducción de CYP1A1.

Lo primero que se hizo fue validar la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la detección y cuantificación de los tres compuestos de interés en medio de cultivo. Se evaluaron diferentes métodos de extracción, seleccionando el que produjo el pico de metronidazol más definido y que presentó una disminución considerable de contaminantes, en comparación a los otros.

La validación de la técnica de HPLC mostró que el método se comporta linealmente para todos los compuestos hasta una concentración de 0.12 µg/mL. Mientras que los límites de detección y cuantificación varían para los tres compuestos. Para demostrar la biotransformación del MTZ se utilizaron las líneas celulares A549 y HepG2 que han sido ampliamente empleadas en estudios de biotransformación *in vitro*. Se verificó la presencia, inducibilidad y funcionalidad de CYP1A1 utilizando benzo(a)pireno. La evaluación de la actividad enzimática utilizando el ensayo de 7-etoxiresorufina O-desetilasa demostró la funcionalidad de la enzima CYP1A1. Sin embargo, no se logró cuantificar los metabolitos MTZ-OH y MTZ-COOH en las células tratadas con el MTZ, por lo que no fue posible correlacionar la formación de metabolitos del MTZ *in vitro* con la presencia, inducibilidad y funcionalidad de la enzima CYP1A1.

En general, consideramos que el resultado final es el reflejo de las dificultades en el manejo de la muestra; de la, relativamente, baja sensibilidad del método analítico empleado para la cuantificación y de la baja inducibilidad del modelo celular utilizado. Todo en conjunto presenta limitantes que hacen que la metodología empleada no sea suficientemente sensible para determinar si el CYP1A1 participa o no en la biotransformación *in vitro* del MTZ. Por ello es necesaria la búsqueda de sistemas de extracción y detección más sensibles y selectivos que los empleados en este trabajo.

2. Introducción

2.1 *Metabolismo de xenobióticos*

Los seres vivos cuentan con una serie de barreras físicas o biológicas para impedir que sustancias extrañas presentes en su entorno puedan acceder a su interior; sin embargo, algunos de estos compuestos son capaces de superar dichas barreras y penetrar a las células produciendo diferentes efectos. A los compuestos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano, pero que son capaces de acceder a su interior se les conoce como xenobióticos. [8].

Estos compuestos pueden acceder a un organismo por diferentes vías, principalmente mediante ingestión, inhalación, o vía cutánea. Entre estos se encuentran fármacos, metabolitos secundarios derivados de hongos y plantas que se consumen en la dieta, contaminantes ambientales derivados de la combustión de carburantes, etc. [2]

Los xenobioticos son compuestos de estructuras químicas muy variadas y, generalmente de naturaleza lipofílica, por ello son capaces de atravesar con relativa facilidad membranas biológicas, acceder a las células y unirse a estructuras celulares de carácter lipofílico. Y dado que la excreción se realiza a través de fluidos de naturaleza acuosa, principalmente orina, su eliminación del organismo es difícil. Para ello se cuenta con sistemas metabólicos cuya función es convertir a los xenobióticos en moléculas más polares, hidrosolubles y fácilmente excretables [8].

Tradicionalmente las reacciones de biotransformación de xenobióticos se dividen en dos grandes grupos: las reacciones de Fase I donde los xenobióticos son modificados principalmente mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis; y las reacciones de Fase II en donde el compuesto parental o el metabolito de fase I se conjuga con moléculas endógenas de carácter polar para formar productos fácilmente excretables [1].

La biotransformación ocurre en muchos tejidos, pero el hígado es el órgano más importante, ya que es en los microsomas hepáticos donde se encuentran la mayoría de las enzimas de fase I. De estas la familia más estudiada y mejor caracterizada es la del citocromo P-450 (CYP). Estas enzimas juegan un papel muy importante en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos y xenobióticos de naturaleza química variada.

2.2 Citocromo P-450

Características generales

Los citocromos P450 (CYP450s) son hemoproteínas de membrana que se encuentran fundamentalmente en retículo endoplásmico de la corteza adrenal. En el hombre se encuentran predominantemente en el hígado y en menor proporción en el bazo, intestino, riñones, pulmón, adrenales y otros sitios [1].

El término P450 se debe a que el sistema fue identificado como un pigmento (P) rojo en el hígado que presenta un pico característico de absorción a 450 nm cuando se reduce y se une a monóxido de carbono [1]. Este sistema de enzimas presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja en la variedad de procesos que puede catalizar y en el elevado número de sustratos que es capaz de metabolizar. Aunque el sistema P-450 interviene fundamentalmente en reacciones de oxidación, también es capaz de catalizar reacciones de reducción, hidratación o hidrólisis.

La reacción de oxidación catalizada por CYP450s requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato. Específicamente se trata de reacciones de monooxigenación o hidroxilación donde sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado al sustrato, mientras que el otro es reducido hasta agua (Figura 1); por ello estas enzimas se denominan monooxigenasas u oxidasas de función mixta [8].



Figura 1. Reacción enzimática de monooxigenación.

Entre las reacciones catalizadas por CYP450s se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S-oxidaciones, epoxidaciones, O-, N- y S-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones. Entre sus substratos se incluyen tanto moléculas pequeñas como el etanol y otras muy grandes como la ciclosporina, aromáticas o lineales, planas o globulares, con o sin heteroátomos, etc. Esta amplia variedad de substratos es debida a la existencia de múltiples formas de las enzimas, que se han adaptado para el metabolismo de compuestos relacionados estructuralmente [8].

Nomenclatura

Existen muchas isoformas de citocromos P450. Estas se clasifican de acuerdo al porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de cada enzima. Según este criterio, la abreviación para los citocromos P450 (CYP) es seguida de un número que designa la familia, una letra que identifica la subfamilia y otro número que corresponde al gen [1].

- ***Familia*** Las familias de CYPs agrupan enzimas que comparten un porcentaje de identidad en la secuencia de sus aminoácidos mayor al 40% y se identifican con un número (e.g. CYP2, CYP3).
- ***Subfamilia*** Los miembros de una subfamilia deben compartir más del 55% de identidad y son identificados con una letra (e.g. CYP2D, CYP3A).
- ***Genes*** Existen 57 genes y 33 pseudogenes identificados como importantes en el ser humano y estos se designan con un número (e.g. CYP2D6, CYP3A4).

Metabolismo mediado por Citocromos P450

Los CYP450s que se encargan de la biotransformación de xenobióticos en el hombre pertenecen a las familias CYP1, CYP2 y CYP3; mientras que el resto de las familias se encargan principalmente del metabolismo de compuestos endógenos. No obstante, algunas enzimas de las tres primeras familias también pueden metabolizar substratos endógenos [2].

Existen muchas variantes alélicas en cada una de estas familias, lo que produce gran heterogeneidad en la respuesta farmacológica de diferentes individuos. Estas variantes alélicas se encuentran publicadas en una base de datos de acceso público en internet (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>). Esta base emplea una secuencia consenso o de referencia que asigna como variedad alélica (*1) aquella que codifica una enzima con actividad normal que se manifiesta en un fenotipo eficiente. Por otro lado existen variedades que producen fenotipos con metabolismo reducido por disminución en la actividad enzimática; mientras que el fenotipo conocido como ultrarrápido generalmente se atribuye a la presencia de una o más duplicaciones génicas [2].

No obstante la identificación de los factores genéticos, el patrón de actividad de los CYP450s en un individuo no sólo está determinado por las variantes alélicas, sino que involucra otros factores. Se sabe que las diferencias en la actividad de estas enzimas pueden estar en función de la edad, el sexo, del estado fisiológico, alteraciones fisiopatológicas, la dieta, el estado nutricional, el contacto con contaminantes ambientales, etc; y que es la suma de estos factores, además de los factores genéticos, la responsable de las diferencias individuales observadas en el metabolismo de xenobióticos.

A continuación se describen las tres familias más importantes, encargadas del metabolismo de xenobióticos; el resto tienen una escasa repercusión en el

metabolismo de fármacos y otros xenobióticos, al tratarse de enzimas implicadas fundamentalmente en el metabolismo de substratos endógenos.

Familia CYP1

En esta familia se incluyen dos subfamilias: CYP1A (constituida por las isoenzimas CYP1A1 y CYP1A2) y CYP1B, a la que pertenece CYP1B1. Estas tres enzimas comparten el control transcripcional del receptor nuclear *Ah* (Aryl hydrocarbon receptor) [9,10]. Este factor transcripcional es activado por la unión de hidrocarburos aromáticos policíclicos como los presentes en el humo del cigarro, en los productos de incineración industrial o los producidos durante la carbonización de algunos alimentos [2].

CYP1A1 y CYP1A2 juegan un papel importante en la activación de algunos procarcinógenos, convirtiéndolos en intermediarios reactivos que pueden unirse al ADN originando mutaciones. CYP1A1 activa el benzo(a)pireno y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos, y CYP1A2 participa fundamentalmente en la activación de nitrosaminas, aflatoxina B1 y aminas aromáticas [11].

CYP1A1 es una enzima cuya distribución es principalmente extrahepática. Su expresión constitutiva es muy baja, pero es inducible por ligandos del receptor *Ah* por lo que la exposición a estos aumenta sus niveles en tejidos como el pulmón, la placenta, la glándula mamaria o los linfocitos. Esta enzima presenta formas polimórficas, algunas de las cuales se han relacionado con una mayor incidencia del cáncer de pulmón en algunos grupos de población [12,13].

La expresión de CYP1A2 en hígado constituye aproximadamente el 10% del contenido total de CYP450s [2]. Esta enzima también es inducible por hidrocarburos del humo del cigarro, de los producidos durante la carbonización de algunos alimentos, por compuestos indólicos de algunos vegetales o algunos fármacos; también se han identificado variantes alélicas de CYP1A2, de las cuales algunas correlacionan con una mayor o menor respuesta al efecto inductor del humo del cigarro [3].

CYP1B1 se expresa de forma constitutiva en el riñón, próstata, ovarios y glándula mamaria, pero no en el hígado [14]. En general su expresión basal es mayor que la del CYP1A1 y participa tanto en el metabolismo de compuestos endógenos como exógenos. El gen del CYP1B1 también presenta formas alélicas, algunas de las cuales se traducen en alteraciones funcional relacionadas a ciertos procesos de crecimiento y diferenciación [14,15].

Familia CYP2

La familia 2 es la más grande de CYP450s descrita en mamíferos. En el hombre se integra por 20 enzimas pertenecientes a 13 subfamilias diferentes [3]. En el hombre se han identificado tres miembros de la subfamilia **CYP2A**: CYP2A6, CYP2A7 y CYP2A13.

CYP2A6 se expresa en el hígado donde representa alrededor del 5% de CYP450s totales y es inducible por fenobarbital y otros fármacos antiepilépticos [16]. Se ha observado la existencia de polimorfismos en CYP2A6 que han sido asociados a una diferente susceptibilidad a cáncer de pulmón [17].

CYP2A7 es una proteína no funcional y CYP2A13 no se expresa en el hígado pero sí se expresa de manera importante en la mucosa olfativa [18]

De la subfamilia **CYP2B** solo CYP2B6 se ha identificado en el hombre. Sus niveles en hígado son bajos y muy variables, su inducción está mediada por el receptor nuclear CAR (*Constitutive Active Receptor*) y también por PXR (*Pregnane X Receptor*); de sus substratos se han identificado compuestos tóxicos y algunos fármacos [19].

La subfamilia **CYP2C** en el hombre está integrada por cuatro genes: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 y CYP2C19. De estos, CYP2C9 es el que presenta mayor contenido en hígado humano. CYP2C9 metaboliza la mayor parte de sus substratos a través de reacciones de hidroxilación. Sus substratos suelen ser moléculas débilmente lipofílicas que se comportan como ácidos débiles ionizadas a pH fisiológico, posiblemente con un heteroátomo y anfipáticas. Se ha identificado la existencia de polimorfismos genéticos del CYP2C9 pero se desconocen sus consecuencias funcionales, a pesar de que este enzima cataliza el metabolismo de un gran número de compuestos de gran interés terapéutico tales como fármacos antiinflamatorios e hipoglucemiantes [20].

Dentro de la subfamilia **CYP2D**, en el hombre sólo se ha identificado al CYP2D6, el cual se expresa en hígado y no es inducible. Este CYP450 es probablemente el más conocido debido a su gran cantidad de polimorfismos genéticos [21]. En la actualidad se conocen aproximadamente 80 variantes alélicas del gen, la mayor parte de las cuales afectan a la actividad de la correspondiente proteína. Debido a ello se han establecido diferentes fenotipos relacionados que se conocen como metabolizadores lentos (con alelos defectuosos), metabolizadores rápidos (forma nativa o variantes alélicas sin consecuencias funcionales) y metabolizadores ultrarrápidos (con múltiples copias del gen) [22]. El impacto clínico de estas alteraciones en la actividad del CYP2D6 es evidente al saber que este CYP450 es el responsable del metabolismo de más del 25% de los agentes terapéuticos en uso en la actualidad [21].

El CYP2E1, es el único miembro de la subfamilia **CYP2E** identificado en la especie humana. Se expresa en el hígado (alrededor del 10% de CYP450s totales) y en otros tejidos, aunque de forma menos importante [1,23]. Esta enzima participa en la activación de ciertos carcinógenos (hidrocarburos halogenados, nitrosaminas) y en el metabolismo de disolventes de uso común como etanol, acetona o benceno. Este CYP450 es inducible por etanol y otros compuestos como acetona e isoniazida [23].

Familia CYP3

En el hombre esta familia contiene solo una subfamilia que comprende cuatro genes: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43. Son enzimas con una alta homología en la secuencia de aminoácidos (>85%), con características funcionales muy similares e inducibles por ciertos fármacos como los barbitúricos, rifampicina y dexametasona [24]. Si bien son capaces de metabolizar compuestos endógenos, se trata del grupo de enzimas con mayor importancia en el metabolismo de agentes terapéuticos.

CYP3A4 es la enzima más abundante en el hígado humano (30-40% del total) y se expresa también en la mucosa intestinal [2]. CYP3A5 también se localiza en el hígado pero es menos abundante. CYP3A4 resulta ser muy importante debido al gran número de moléculas de interés clínico que han sido identificadas como sustratos del mismo. Se estima que la mitad de los fármacos con rutas metabólicas conocidas son metabolizados por este citocromo [2, 24].

CYP3A7 se encuentra fundamentalmente en el hígado fetal, donde es la forma mayoritaria, aunque existen evidencias de que también se expresa en hígado adulto [2,3]. La subfamilia CYP3A es inducible por ciertos fármacos como el fenobarbital, fenitoina y carbamazepina, agentes antimicrobianos (rifampicina) y glucocorticoides (dexametasona). La inducción de CYP3A4 y de CYP3A7 está regulada a través del receptor nuclear PXR (*Pregnane X Receptor*) y la del CYP3A5 a través del receptor para glucocorticoides (GR) [25].

3.0 CYP1A1

CYP1A1 es una enzima inducible por ligando de distribución principalmente extrahepática. Sus niveles de expresión constitutiva son muy bajos, pero inducibles en muchos tejidos como hígado, piel, riñón, pulmón e incluso linfocitos de sangre periférica [9, 10,12].

Esta enzima está involucrada en la activación metabólica de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), el metabolismo de estrógenos y algunos fármacos de relevancia clínica [10, 12,13].

La inducción por ligando de CYP1A1 se descubrió a partir de estudios clásicos de carcinogenicidad en animales donde se observaba la formación de papilomas seguida por tumores en conejos tratados con hulla; de la que se sabe, es rica en HPAs como el benzo[a]pireno (BaP) [10]. Inicialmente se pensó que estos compuestos eran los responsables de la formación de tumores, hasta que se demostró que eran sus metabolitos quienes resultaban intermediarios altamente reactivos capaces de unirse covalentemente a los ácidos nucleicos y proteínas formando aductos [13].

A partir de estas observaciones en el metabolismo de HPAs se generó el concepto de “activación metabólica” como el proceso que requieren algunos carcinógenos, químicamente inertes, para ejercer su efecto biológico [12,13].

Posteriormente, en cultivos de células de mamífero, no solo se encontró la actividad enzimática sino que se observó una alta inducibilidad de la misma después de la exposición a varios HPAs [13]. El descubrimiento de la participación de los HPAs en la inducción de su propio metabolismo, y de algunas características de dicha inducción, han facilitado el análisis mecanístico y la determinación de las vías involucradas en la inducción y regulación de la expresión de CYP1A1.

Se sabe que la inducción de CYP1A1 se lleva a cabo vía transcripcional y que su expresión es regulada por el receptor Ah (AhR, Aryl hydrocarbon Receptor) [10-13]. El mecanismo de inducción dependiente de ligando está mediado por una cascada de eventos, denominada vía de señalización de AhR, que se describe a continuación.

Cascada molecular de AhR

El AhR es un receptor nuclear activado por ligando que regula la expresión de muchos genes en una gran variedad de especies y tejidos [27,28].

Aunque cientos de genes en todo el genoma están regulados por AhR, los tres genes de la familia CYP1 (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*), conservados en todos los mamíferos, son los más inducibles por sus ligandos; de estos el más estudiado es *CYP1A1* [26]. La inducción de *CYP1A1* es una respuesta dependiente de AhR que se ha observado consistentemente en muchas especies, y se ha usado como el sistema modelo que define el mecanismo por el cual AhR regula la expresión génica.

El modelo clásico de inducción por ligando de *CYP1A1* se muestra en la Figura 2.

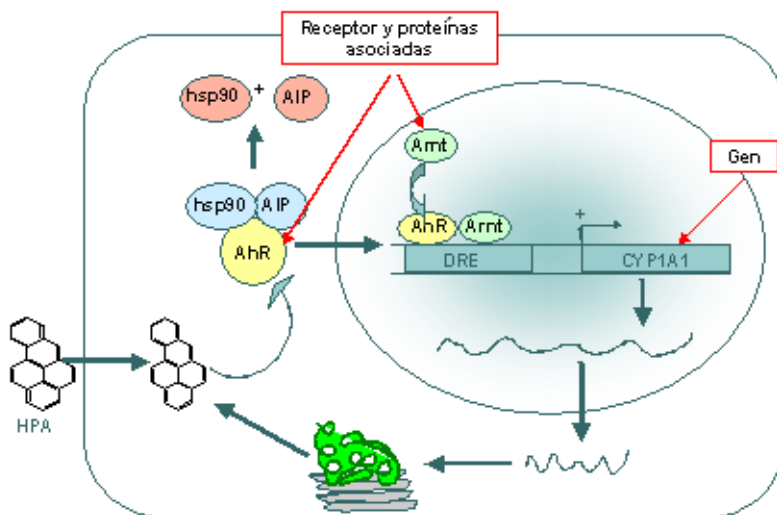


Figura 2. Representación del modelo de inducción por ligando de CYP1A1 vía AhR.

La cascada de eventos para la inducción de CYP1A1 se activa cuando el ligando o inductor atraviesa la membrana plasmática y se une a AhR que, normalmente, se encuentra en el citosol formando un heterotetrámero 9S con dos moléculas de hsp90 (heat shock protein de 90kDa), XAP2 (X-associated protein 2) y una co-chaperona recientemente identificada y denominada p23 (co-chaperone protein de 23kDa) [26].

Ambas hsp90 actúan como chaperonas que previenen la activación del receptor, pero lo mantienen en una conformación que permite la unión del ligando [12,28]. Una vez que el receptor se activa por el ligando, este se separa de sus chaperonas moleculares y adopta una conformación que expone secuencias de localización nuclear (NLS) que le permiten translocarse al núcleo [27]. En el núcleo, el complejo ligando-AhR se dimeriza con una proteína nuclear denominada Arnt (AhR nuclear translocator). Esta molécula convierte a AhR a su forma de alta afinidad por el DNA, de tal manera que el complejo ligando-AhR-Arnt interactúa con el DNA a través del motivo de unión del XRE (Xenobiotic Responsive Element). La unión del complejo AhR-Arnt a su XRE induce cambios en la estructura de la cromatina, permitiendo la transactivación de la batería de genes controlados por AhR [27,28].

Ligandos de AhR e inductores de CYP1A1

AhR regula la expresión de muchos genes en una gran variedad de tejidos y tipos celulares [27] y se conoce su participación en la regulación de diferentes procesos como la transcripción de enzimas de metabolismo, el control de ciclo celular y apoptosis [13]; pero su papel fisiológico aún no es claro ya que, hasta la fecha, no se han logrado identificar ligandos endógenos de alta afinidad [27].

Los ligandos de AhR pueden ser clasificados en dos categorías; los sintéticos (formados a partir de actividades antropogénicas) y los naturales (formados en sistemas biológicos por procesos naturales) [27]. En la literatura se encuentran descritos algunos ligandos naturales de AhR encontrados en algunas plantas crucíferas, y ligandos endógenos derivados del triptofano [29]; pero los ligandos mejor caracterizados y los de mayor afinidad, descritos a la fecha, son los ligandos sintéticos [12,13,27].

Se trata de compuestos de estructura planar y naturaleza hidrofóbica relacionados estructuralmente a los HPAs, como el BaP y el 3-metil clorantreno (3-MC), y los hidrocarburos aromáticos poli-halogenados o HAHs (TCDD y dibenzofuranos) [12, 13, 27,30]. Entre ellos los más potentes son los compuestos del tipo HAHs que presentan constantes de disociación (K_d) del orden de pM o nM; mientras que los del tipo HPA se unen con menor afinidad presentando valores de K_d del orden de nM a μ M [30]. A los compuestos que cumplen con estas características estructurales se denominan “ligandos clásicos” de AhR. Las estructuras de algunos ligandos clásicos sintéticos de AhR se muestran en la Figura 3.

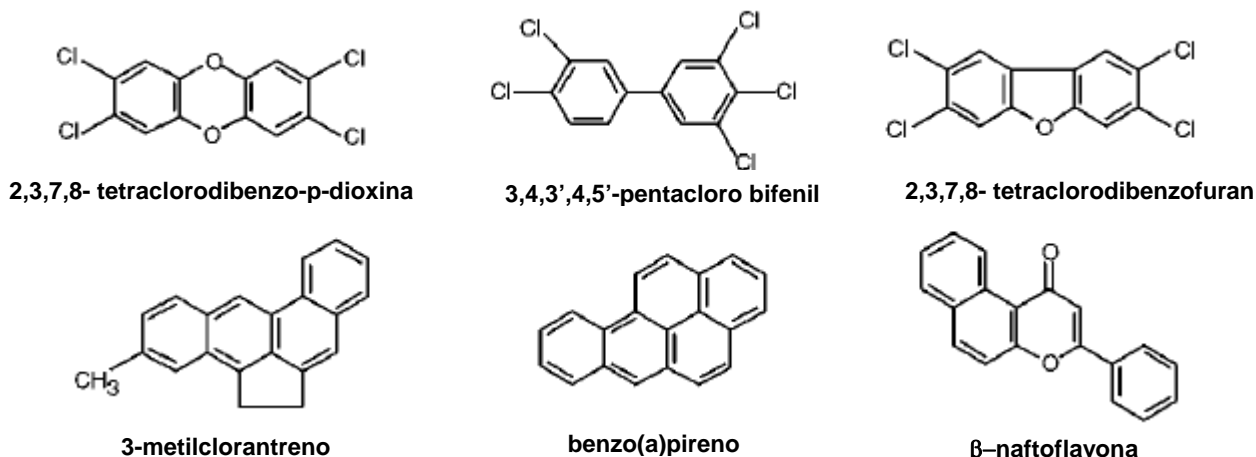


Figura 3. Estructuras de algunos ligandos sintéticos clásicos e inductores de la expresión de genes dependiente de AhR. Tomada y modificada de [27].

Como se observa en la Figura 3, todos los compuestos comparten características estructurales bien definidas. Estudios de relación estructura-actividad sobre este tipo de compuestos han ayudado a comprender cuales son las características moleculares importantes para la actividad y cuales son los criterios estructurales que determinan la especificidad de la respuesta. Los ligandos clásicos que inducen CYP1A1 son moléculas hidrofóbicas, planares o coplanares con una estructura policíclica y cuyo tamaño se ajusta dentro de un rectángulo de 6.8 a 13.7 Å [26,30].

Hasta hace unos años, el estudio más detallado de ligandos agonistas de AhR se había centrado en compuestos estructuralmente relacionados a ligandos clásicos; sin embargo, se han logrado identificar una gran variedad de compuestos naturales que actúan como ligandos de AhR que, a pesar de presentar estructuras y características fisicoquímicas completamente diferentes, tienen la capacidad de activar la expresión de genes dependientes de la vía de señalización de AhR [13,27].

En la Figura 4 se muestran algunos de estos compuestos que han sido denominados “ligandos no clásicos” de AhR, entre ellos existen diferencias en la afinidad de unión y la potencia de inducción génica, lo que se traduce en variaciones en el estado de activación enzimática.

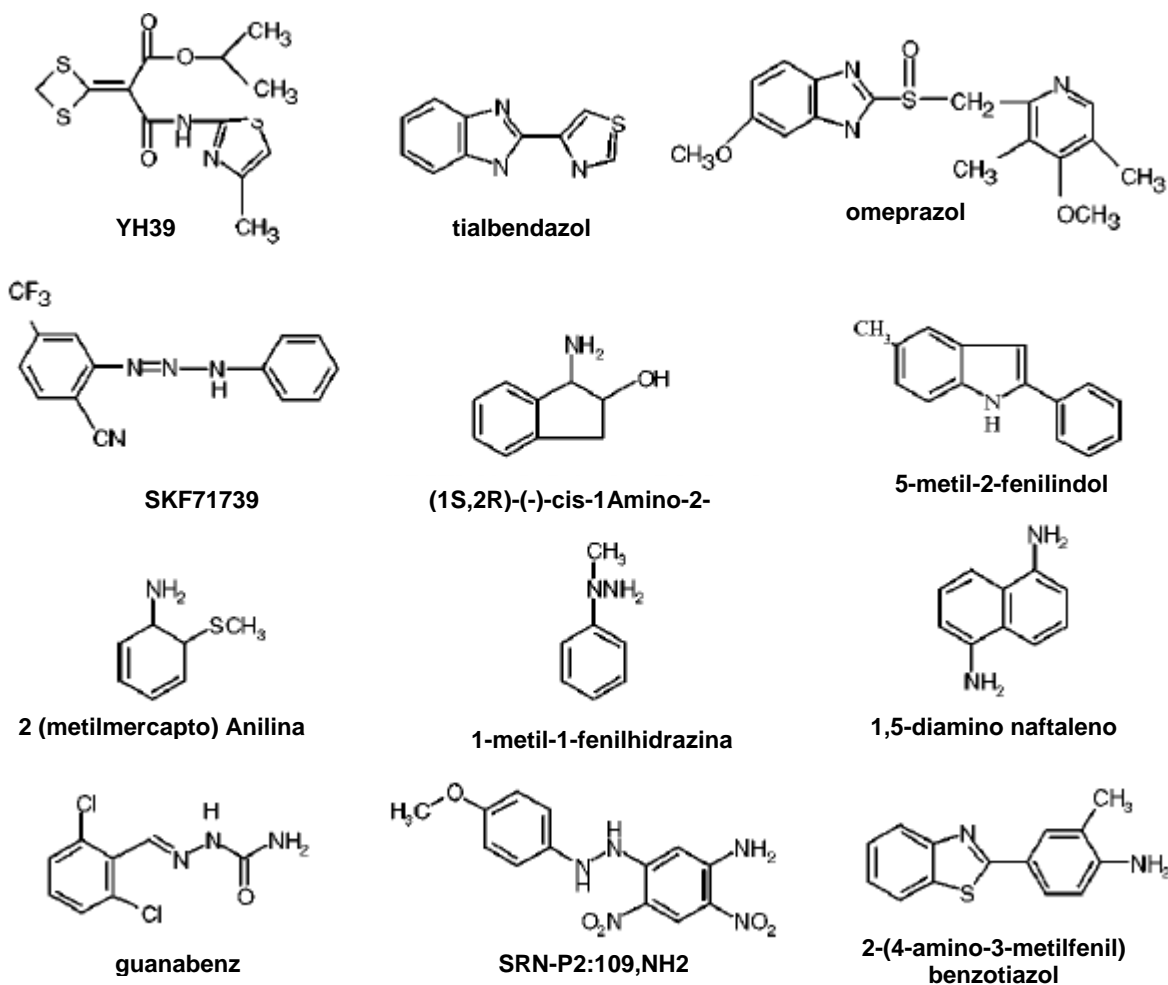


Figura 4. Estructuras de ligandos sintéticos no clásicos e inductores de la expresión de genes dependiente de AhR. Tomada y modificada de [27].

Por otro lado, se ha reportado la formación de ligandos relativamente potentes a partir de la bio-conversión de compuestos ingeridos y precursores endógenos que tienen poca, y en algunos casos ninguna, actividad agonista de AhR. Tal es el caso de compuestos índólicos provenientes de los alimentos, como el indol 3-carbinol (I3C) y el triptofano, que son metabolizados y forman compuestos como el 3-3'-diindolilmetano y el indolo[3,2-b]carbazol [33] (Figura 6). Este último se forma a partir de una condensación ácida de I3C (ligando débil de AhR) y es el ligando natural de AhR de mayor afinidad ($K_d = 0.2 - 3.6 \text{ nM}$) y el inductor más potente de genes dependientes de esta vía, identificado a la fecha [27,33].

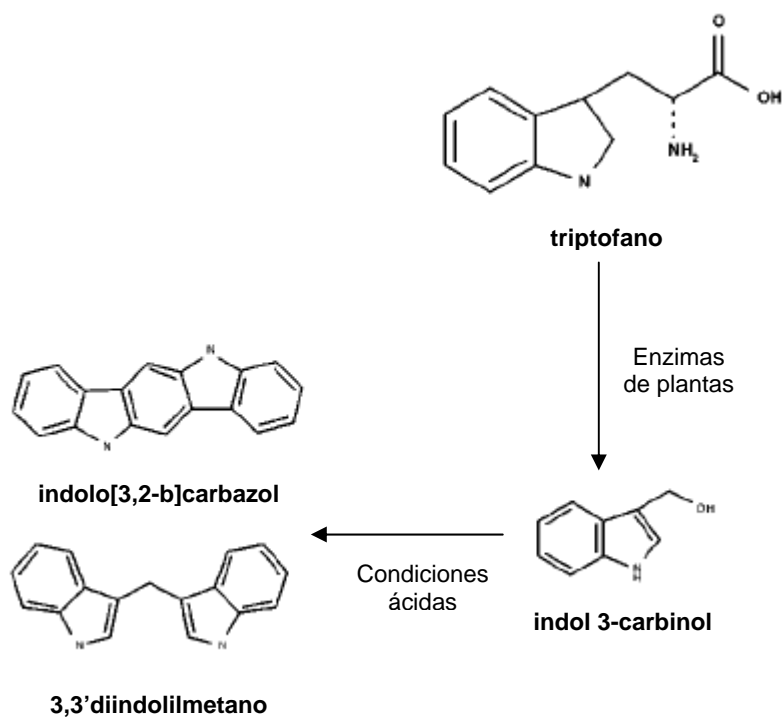


Figura 6. Ligandos e inductores de AhR derivados del triptofano. Tomada y modificada de [27].

Un grupo importante de ligandos naturales de AhR está representado por los flavonoides. Aunque la mayoría de los compuestos reportados son antagonistas de AhR, en la literatura se reportan varios agonistas, como la quercetina [35], diosmina [36], tangeritina y tamarixetina [37]. Estos compuestos además de reportarse como ligandos agonistas también son sustratos de CYP1A1 [12, 13, 26,27].

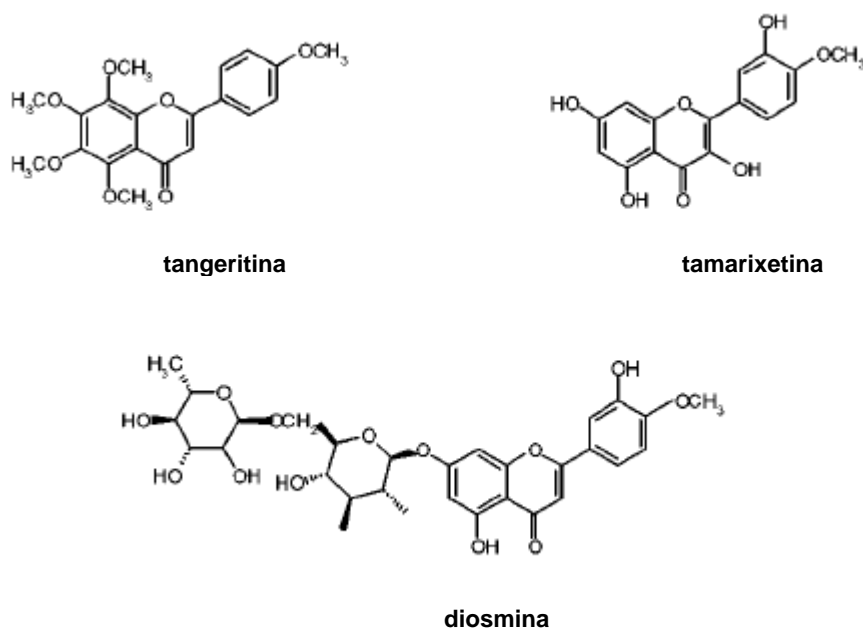


Figura 7. Estructuras de algunos ligandos e inductores naturales de CYP1A1. Tomada y modificada de [27].

3.1 Excepciones del modelo clásico de inducción de CYP1A1 vía AhR.

a) Activación de AhR e inducción de CYP1A1 independientes de ligando

La inducción de CYP1A1 se lleva a cabo, generalmente, por ligandos exógenos; sin embargo, existen algunas excepciones en las que se puede inducir su expresión sin necesidad de la exposición a xenobióticos. Por ejemplo, en condiciones de estrés como la hiperoxia y en procesos como la inducción de diferenciación celular [26,28]. En monocitos y queratinocitos se han observado incrementos en el transcrito de AhR y la activación de CYP1A1 y para el caso específico de los queratinocitos se ha demostrado que la inducción de CYP1A1 está correlacionada con incrementos en el calcio intracelular [28].

Las evidencias no descartan la existencia de algún compuesto endógeno que actúe como ligando y que hasta la fecha no se ha logrado caracterizar.

b) Inductores de CYP1A1 que no se unen a AhR

El factor AhR puede ser activado por compuestos de una gran diversidad estructural; la mayoría de ellos son capaces de unirse, con mayor o menor afinidad, directamente al AhR. En otros casos, la capacidad de algunos compuestos de inducir la expresión de CYP1A1 o activar la expresión de otros genes regulados a través de esta vía, es evidencia indirecta de la interacción con AhR. Sin embargo, se ha observado que ciertos compuestos, muy alejados de los requerimientos estructurales clásicos, son capaces de activar la vía e inducir a CYP1A1 pero no pueden unirse competitivamente a AhR [28]. Estos compuestos pertenecen a familias diferentes que no están estructuralmente relacionadas; de estos, los más importantes, están representados por moléculas de la familia de los bencimidazoles como el omeprazol [38] y el tialbendazol [39]; por carotenoides (precursores de retinoides) como la cantaxantina y el β -apo-8'-carotenal [32] y moléculas varias como el carbaril [40] y la primaquina [41], un insecticida y un fármaco empleado en la quimioterapia de la malaria respectivamente.

Dado que el mecanismo de inducción de CYP1A1 está claramente vinculado a la activación de AhR por un ligando, resulta difícil conciliar como es que estas moléculas son inductores de CYP1A1 sin que, aparentemente, se unan a AhR en ensayos de competencia. Se han propuesto varias hipótesis que tratan de explicar estos resultados contradictorios.

Hipótesis del ligando débil

Esta hipótesis plantea que los compuestos que inducen CYP1A1 sin unirse competitivamente a AhR sí son ligandos de AhR, solo que su afinidad es mucho menor [26,27].

Hipótesis del metabolito

Se ha propuesto que este tipo de compuestos no son los ligandos de AhR per se, sino que mediante transformaciones metabólicas se convierten en ligandos que pueden activar la transcripción dependiente de AhR. Se ha observado en un par de casos, como el del omeprazol, donde un producto de su metabolismo es capaz de unirse al receptor [27].

Hipótesis de vías alternas de inducción

Esta hipótesis propone que los compuestos que inducen CYP1A1 sin unirse a AhR, pueden estar ejerciendo su efecto a través de una vía de señalización alterna. La posibilidad de que esta vía sea una vía conocida se ejemplifica con el caso de los carotenoides, mientras que lo observado con el omeprazol y el carbaril sugieren que la activación de CYP1A1 se debe a la activación de vías de señalización aún desconocidas [29,40]

4. Metronidazol

El metronidazol (MTZ), conocido como *Flagyl*, es un fármaco sintético con actividad antibacteriana y antiparasitaria, con más de 35 años de uso en la práctica clínica. El MTZ es actualmente uno de los medicamentos más empleados en el mundo y aparece en la lista de medicamentos esenciales señalados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [5].

La indicación inicial de este compuesto fue para el tratamiento de infecciones por *Trichomonas vaginalis*, pero al paso del tiempo sus aplicaciones se ampliaron y actualmente se emplea en el tratamiento de infecciones provocadas por otros parásitos como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, contra bacterias anaerobias gram-negativas y gram-positivas, de las cuales destaca *Helicobacter pylori*. El MTZ también se emplea en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, en padecimientos dérmicos como la rosácea y el acné vulgar; además ha mostrado efectividad como radiosensibilizador en células hipóxicas al grado de emplearse en terapias antitumorales [42].

De acuerdo a la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC); el MTZ se clasifica dentro del grupo 2B, es decir que no existe evidencia adecuada para considerarlo un carcinógeno humano pero con suficiente evidencia para considerarlo un carcinógeno animal [5].

Clasificación y estructura química

El metronidazol es un 5-nitroimidazol de origen sintético que puede ser considerado como el precursor de la familia de los derivados imidazólicos (tinidazol, ornidazol, secnidazol o benznidazol). Está formado por un anillo heterocíclico de cinco átomos, que posee un grupo nitro (NO_2) en posición 5.

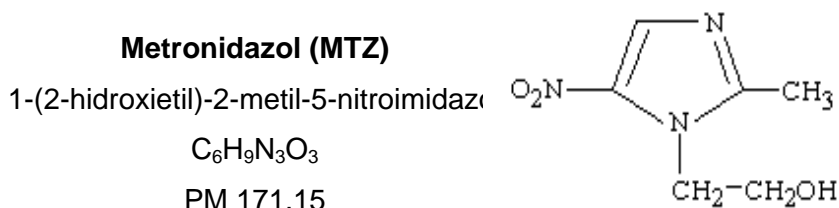


Figura 8. Estructura química del metronidazol.

Farmacocinética

El MTZ puede administrarse vía oral, vaginal, tópica, intravenosa y rectal. En el hombre la dosis oral del fármaco (generalmente de 200 mg) se absorbe casi en su totalidad (biodisponibilidad \pm 90%) y se distribuye ampliamente en tejidos y fluidos del organismo, gracias a su baja unión a proteínas séricas (< 20%) [5].

Cruza placenta y barrera cerebral [43], aunque en placenta no se alcancen altas concentraciones de este compuesto [44]. En la administración oral del fármaco las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en 1 o 2 horas [43].

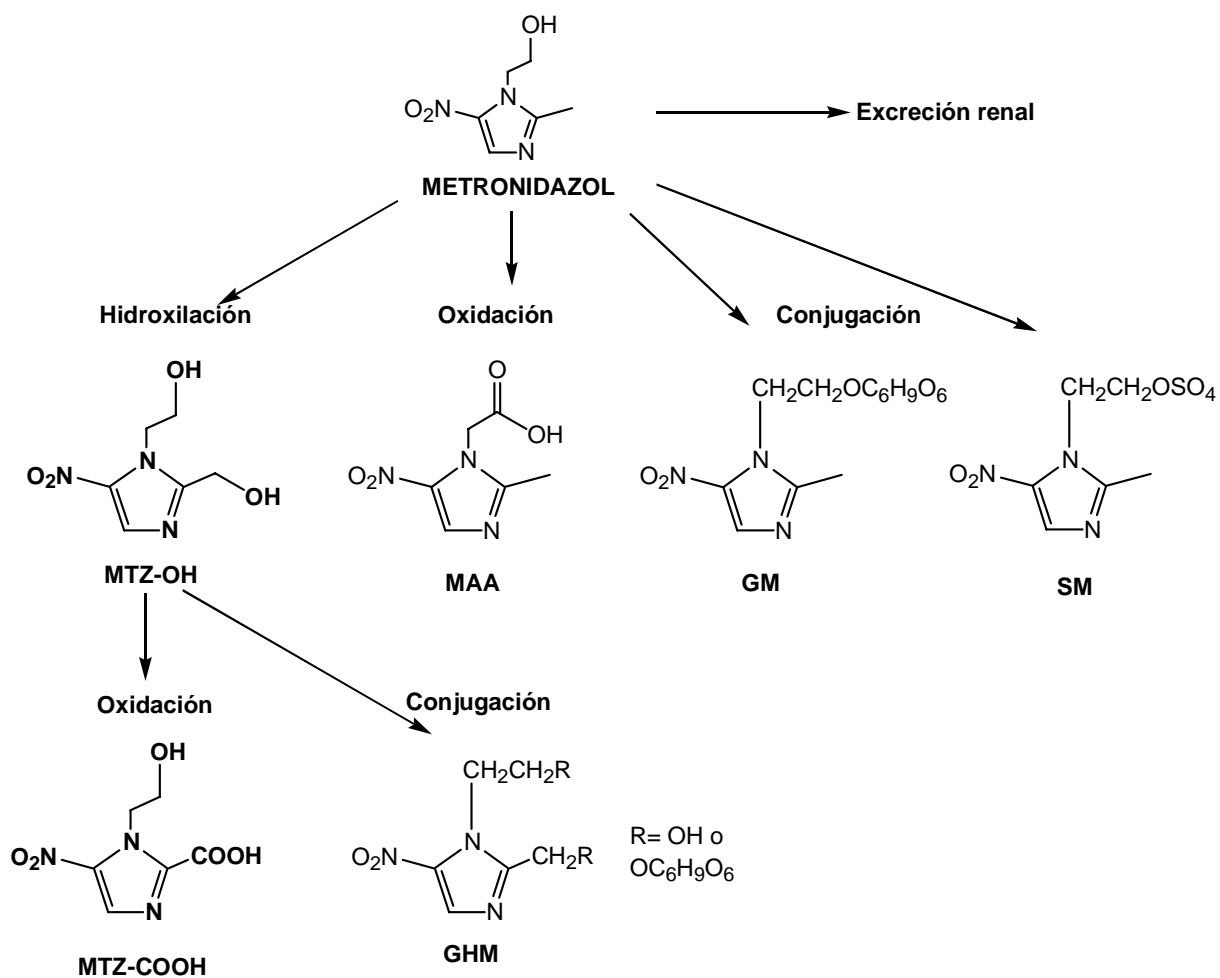
La vía principal de eliminación es por vía renal (de un 60% a un 80% de la dosis administrada) por oxidación formando dos metabolitos principales, el metabolito hidroxilado (MTZ-OH) y el metabolito ácido (MTZ-COOH). La conjugación con moléculas endógenas y la excreción renal inalterada representan vías menores de eliminación. El tiempo de vida media del MTZ en personas con funcionamiento renal y hepático normal es de 8 horas [43].

Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del MTZ y de la mayoría de los nitroimidazoles es reflejo de la toxicidad selectiva que poseen contra microorganismos anaerobios o microaerófilos y por células anóxicas o hipóxicas [43]. En términos estrictos el MTZ podría considerarse como un profármaco porque necesita de la activación metabólica, por parte de microorganismos sensibles, para ejercer su efecto tóxico. Una vez que difunde al interior de las células, el grupo nitro acepta electrones de proteínas transportadoras de electrones como la ferredoxina o flavodoxina que a su vez son reducidas por la piruvato-ferredoxin oxidoreductasa [5,42]. La actividad antimicrobiana del MTZ es consecuencia de la formación de intermediarios altamente reactivos que se forman durante la reducción del grupo nitro. No se conocen las etapas moleculares por las que estos productos intermediarios destruyen a los microorganismos, pero se cree que interactúan directamente con el ADN, impidiendo la síntesis del ADN y la transcripción, provocando así la muerte del patógeno [5]

Metabolismo en mamíferos

En los mamíferos, incluyendo al humano, el metabolismo oxidativo (fase I) es la vía más importante de biotransformación del MTZ. Las principales modificaciones se dan sobre sus cadenas alifáticas en la posición 1 y 2; y dan origen a sus dos principales metabolitos [6]. La hidroxilación del grupo metil en posición 2 del MTZ forma el 1-(2-hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol (MTZ-OH) que representa la eliminación de aproximadamente el 40% de la dosis. Una fracción del MTZ-OH se vuelve a oxidar para formar el ácido carboxílico en posición 2 (MTZ-COOH), en aproximadamente el 10% de la dosis [6,7,42]. Las vías de eliminación menos importantes del MTZ en el hombre son la oxidación del alcohol en posición 1 para formar el ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol (AAM) en un 15%, la conjugación con ácido glucurónico en aproximadamente un 5% y la excreción renal inalterada del compuesto en un 15% (Figura 10). En cuanto al metabolismo de fase II en humanos el MTZ solo presenta conjugación con ácido glucurónico en posición 1 (7%) y su metabolito hidroxilado en posiciones 1 y 2 (3%) [5,7,42,43]



	MTZ-OH	MAA	MTZ-COOH	GM	GHM	Excreción renal	
Hombre	40-50	15-20	10	7	3	15	% de la dosis

Figura 9. Metabolismo de metronidazol en mamíferos. Tomado y modificado de [7].

Efectos del Metronidazol

a) *Mutagenicidad y genotoxicidad*

Se sabe que tanto el MTZ como sus dos principales metabolitos son mutágenos potentes en sistemas bacterianos; sin embargo, su actividad mutagénica en mamíferos es controvertida [42]. Reportes recientes muestran que el MTZ y su metabolito hidroxilado (MTZ-OH) inducen rompimientos de cadena sencilla y aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos tratados *in vitro* y en linfocitos de individuos tratados con el fármaco [42].

Algunos reportes indican que tanto el MTZ como el MTZ-OH tienen la capacidad de incrementar la proliferación de linfocitos humanos previamente estimulados con un mitógeno [45].

En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo se observó un incremento significativo en el número de aberraciones cromosómicas y en los rompimientos de las cadenas de ADN en linfocitos de individuos sanos tratados con dosis terapéuticas de MTZ [45]. Para comprender los efectos genotóxicos y sobre la proliferación celular inducidos por MTZ, nuestro grupo realizó otro estudio donde varias líneas celulares con diferentes patrones en la funcionalidad de P53 se trataron con MTZ y su metabolito hidroxilado (MTZ-OH). Debido a que en condiciones normales P53 detiene el crecimiento de células con daño induciendo arresto del ciclo celular, mecanismos de reparación o apoptosis, se planteó si existiría una relación en la inducción de daño genotóxico, la proliferación celular y la funcionalidad de P53. En esta evaluación se encontró que el MTZ y su metabolito MTZ-OH son capaces de inducir la proliferación de células con daño genotóxico solo cuando P53 no es funcional [45]. Por otro lado, en este mismo estudio se observó que MTZ-OH es capaz de inducir la expresión de P53, lo cual resulta muy interesante ya que P53 se ha propuesto como un biomarcador de carcinogenicidad.

b) Carcinogenicidad

Animal

El MTZ es capaz de inducir tumores en ratas y ratones de manera género-selectiva, ya que se ha observado que incrementa la formación de tumores testiculares y de pituitaria en ratas macho y de hepatomas y tumores mamarios en ratas hembras. También se ha reportado la inducción de tumores pulmonares en ratones machos y linfomas en ratones hembras [5].

El MTZ se considera al como un carcinógeno animal, y por ello en países como Alemania su uso en la práctica veterinaria ha sido prohibido [42].

Hombre

La carcinogenicidad del MTZ en el hombre es controvertida. En los primeros estudios que existen acerca del tema, Beard y cols. dan seguimiento a un grupo de 771 mujeres tratadas con MTZ, a dosis de 750 o 500mg /día durante 10 días vía oral o vaginal [5, 42,43]

Se realizó un seguimiento en el grupo tratado, y se observó una tendencia al incremento en la aparición de cáncer, aunque en la mayoría de los casos no fue significativa. El único dato que fue verdaderamente significativo fue la incidencia de cáncer de pulmón, pero se sugirió que la alta incidencia se debía a que todos los individuos eran fumadores y tres de ellos mayores de 60 años [42].

Después de un periodo de 15 a 25 años de seguimiento a ese mismo grupo de pacientes, se encontró que la morbilidad por carcinoma broncogénico, cáncer de mama, de tiroides, nasofaríngeo, orofaríngeo, entre otros era mayor, pero el único significativamente elevado fue el de pulmón. De esto se concluyó que la administración de MTZ pudiera ser un factor de riesgo para cáncer pulmonar [5, 43] Otro estudio enfocado en la búsqueda de carcinogenicidad de varios fármacos, entre ellos el MTZ, encontró que de entre los individuos expuestos en un periodo máximo de 7.5 años antes del estudio el MTZ podría ser responsable del incremento en el riesgo de padecer cáncer cérvicouterino; pero se concluyó que esta evidencia puede confundirse con el riesgo inherente a la vaginitis [5].

En otros reportes, un estudio con un grupo de 12,000 individuos tratados con MTZ, se buscó la relación entre la exposición y el desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Ningún riesgo se observó debido al uso del MTZ; pero al igual que el los reportes antes mencionados, el periodo entre la primera exposición y el estudio era muy pequeño (máximo de 2.5 años) [5, 43,45]

Un factor común y que parece ser importante es el tiempo transcurrido entre la primera exposición y la realización del estudio. Varios autores sugieren que los datos obtenidos podrían resultar erróneos debido a que el intervalo fue muy corto para demostrar el efecto carcinogénico del MTZ; cuando el tiempo promedio de observación del efecto de muchos carcinógenos es de entre 20 y 30 años [42]

Las evaluaciones epidemiológicas basadas en varios estudios, incluidos los anteriores, son evidencia insuficiente para considerar al MTZ como un carcinógeno para el hombre [45].

5. Antecedentes que relacionan la biotransformación del metronidazol con Citocromos P450

En humanos el hígado es el principal órgano involucrado en las reacciones de biotransformación del MTZ. Existen pocos reportes acerca de la biotransformación hepática del MTZ. Los existentes, presentan datos in vivo en ratas y humanos, así como en microsomas hepáticos humanos y sugieren que diferentes citocromos son responsables de la formación de los principales metabolitos del MTZ [7].

En estudios realizados en hepatocitos de rata se demostró que el 3-metilclorantreno incrementa la afinidad por la hidroxilación del MTZ, y a su vez se inhibe por α -naftoflavona. Esto sugiere que CYP1A1 y/o CYP1A2 tienen una alta afinidad por la hidroxilación del MTZ [5, 7,42]

En un estudio realizado en microsomas hepáticos humanos [7] se observa que la cinética de hidroxilación se describe a través de un modelo bifásico. La cinética bifásica de esta reacción indica que al menos dos sitios enzimáticos están involucrados [7].

Dentro del mismo estudio se presenta evidencia que excluye la posibilidad de la participación de CYP2D6 y CYP1A2 en la hidroxilación del MTZ en el hombre; y por otro lado se demuestra que inhibidores de la subfamilia CYP1A, como el propranolol, inhiben la hidroxilación del MTZ en un 70% [7, 42,45].

De ahí que se sugiera que CYP1A1 participe en la formación del principal metabolito del MTZ. A pesar de que existe evidencia que relaciona al sistema P450 con la biotransformación del MTZ, y particularmente con CYP1A1, existen datos contradictorios y la identidad de los CYP450s participantes no ha sido determinada hasta la fecha.

6. Hipótesis

Si el metronidazol es sustrato *in vitro* de citocromos P-450 y existe evidencia que vincula específicamente a CYP1A1 con su biotransformación, es posible que al inducir esta isoforma en particular se observen cambios en el perfil metabólico *in vitro* del metronidazol.

7. Objetivos

Objetivo General

Determinar la participación de CYP1A1 en la formación *in vitro* de los dos principales metabolitos del metronidazol.

Objetivos Específicos

1. Establecer los parámetros para la detección y cuantificación de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH en una matriz biológica compleja por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
2. Adaptar y validar la técnica analítica para la identificación y cuantificación del MTZ y sus dos principales metabolitos.
3. Definir el método óptimo de extracción de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH a partir de muestras biológicas.
4. Validar las líneas celulares A549 (adenocarcinoma de pulmón humano) y HepG2 (hepatocarcinoma humano) como modelo de inducción, determinando la presencia, inducibilidad y actividad de la enzima CYP1A1.
5. Determinar si el MTZ es capaz de inducir CYP1A1.
6. Inducir, con BaP, la enzima CYP1A1 y correlacionar el incremento en los niveles de proteína y actividad enzimática con modificaciones en el perfil de formación *in vitro* de los dos metabolitos del MTZ.

8. Materiales y métodos

Parámetros de validación de la técnica de HPLC para la identificación y cuantificación del MTZ y sus dos principales metabolitos en solución.

Se empleó un cromatógrafo de líquidos con gradiente binario, inyección manual, control y monitoreo y proceso de datos del sistema por medio de computadora.

- 2 Bombas Gilson 306
- Controlador de gradiente Gilson
- Detector UV / VIS de longitud de onda variable Gilson
- Inyector automático Gilson TM 717
- UniPoint™ LC System Software Gilson
- Columna Symmetry®
- C18 5 μm, 3.9mm x 150mm

El sistema emplea una fase móvil con el amortiguador de acetatos (pH=4) / Acetonitrilo ($\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COO}^- : \text{CH}_3\text{N}$) en proporción [95:5]; un sistema isocrático y un gradiente de solventes.

Todos los solventes y soluciones empleados en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución fueron filtrados a vacío a través de una membrana 0.4 μm de nylon.

FASE MÓVIL

- a) Solución amortiguadora de $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COO}^-$ 0.01 M, pH=4.

Se pesaron 0.4401 g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ PM= 136.08 g/mol y se transfirieron a un matraz volumétrico de 1000 mL, se disolvieron con agua desionizada y se agregaron 0.386 mL de CH_3COOH glacial (60.05 g/mol; $\delta=1.05$ g/mL). Se aforó al volumen final con agua desionizada.

- b) Acetonitrilo.

Se filtró a vacío CH_3CN grado HPLC (Fisher-Scientific)

Linealidad.

Se prepararon curvas en un rango de concentración de 0.03 a 0.50 µg/mL. Las muestras se prepararon a partir de diluciones seriadas de una solución “stock” (1 mg/mL) de la mezcla de estándares de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH en agua; de las cuales se tomaron 20 µL y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos.

Se realizaron las corridas analíticas, para cada curva, por triplicado y en tres diferentes días para evaluar la repetitividad (intradía) y la reproducibilidad (interdía) del método.

Se graficó la respuesta del compuesto como área bajo la curva (pico de respuesta) contra cada concentración con el fin de obtener la ecuación matemática que describa la relación para cada compuesto. Para la evaluación de este parámetro consideramos que la dispersión de los datos se encontrará representada por un coeficiente de variación (C.V.) $\leq 15\%$ y un coeficiente de determinación (r^2) ≥ 0.99 .

Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC).

El LD es un indicador de la cantidad, concentración o señal mínima detectable por un sistema en particular; por otro lado el LC indica el valor a partir del cual es posible determinar cuantitativamente el resultado de una medición, con una determinada incertidumbre.

De los métodos existentes para el cálculo de ambos parámetros, en este trabajo empleamos el método que aplica el concepto de “Curva de calibración”, de tal manera que utilizando los datos de la curva patrón obtenidos para linealidad es posible obtener los límites superior e inferior de un intervalo de predicción que el método requiere; para después obtener los valores de LD y LC mediante la formulación matemática y estadística del concepto.

Método de extracción de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH a partir de una matriz biológica compleja.

Para determinar la presencia de los dos principales metabolitos del metronidazol en el medio en donde se lleva a cabo el ensayo *in vitro*, se probaron tres diferentes métodos de extracción que fueron tomados y modificados de la literatura.

Protocolo A

Se tomó una alícuota de 200 μL de extracto celular al que se adicionaron 300 μL de Acetonitrilo; se centrifugó la mezcla a 11600g por 6 min. Posteriormente, se transfirió una alícuota de 250 μL del sobrenadante a un vial para evaporar el disolvente hasta dejar un volumen de 60 μL , de los cuales se tomaron 20 μL y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos [46].

Protocolo B

Se tomó una alícuota de 500 μL de extracto celular y se le adicionaron 50 μL de ácido perclórico 50% w/v. Se agitó la solución resultante y se adicionó carbonato de potasio anhidro sólido hasta neutralizar la solución; una vez a pH neutro se adicionaron 300 μL de acetonitrilo y se centrifugó a 11600g por 6 min, para después transferir una alícuota de 180 μL del sobrenadante a un vial para evaporar a sequedad. Una vez evaporado el disolvente se reconstituyó la muestra en 500 μL de la fase móvil, de los cuales se tomaron 20 μL y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos [47].

Protocolo C

Se tomaron 200 μL de extracto celular y se les añadió 200 μL de ácido acético 0.1M. Se agitó por 20seg en vórtex, se colocó en hielo y se adicionaron 400 μL de acetonitrilo frío; se agitó de nuevo durante 20seg para después añadir 10 μL de NaCl 3.4M, agitar 5seg y colocar en hielo durante 5 min. Transcurrido este tiempo se tomaron 220 μL de la fase orgánica, se evaporaron a sequedad y después se reconstituyó el residuo en 100 μL de fase móvil de los cuales se tomaron 20 μL y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos [48].

Cultivos Celulares y Tratamiento

A549

Se realizaron los cultivos en medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco-Invitrogen), 1% de penicilina/estreptomicina, 1% L-Glutamina (Gibco-Invitrogen) y 1% de piruvato de sodio (Gibco-Invitrogen). Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y saturada con humedad.

HepG2

Los cultivos de la línea de hepatocarcinoma celular HepG2 se llevaron a cabo empleando medio DEMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco-Invitrogen), 1% de penicilina/estreptomicina. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y saturada con humedad.

Tratamiento

Se preparó una solución estéril de benzo[a]pireno (BaP) y por diluciones seriadas se obtuvieron las concentraciones deseadas.

De cultivos en 80-90% de confluencia, se sembraron 40,000 células en placas de cultivo de 24 pozos. Después de 24 h se reemplazó el medio de los cultivos y las células fueron expuestas a 10nM, 100nM, 1,2.5 y 5 µM de BaP.

Las soluciones "stock" de BaP emplean DMSO como vehículo, por lo que los cultivos control reciben cantidades equivalentes del mismo.

Después de aplicado el tratamiento, los cultivos se incubaron a 37°C durante los periodos 24, 48 y 72 h. El medio de cultivo y el BaP se reemplazan a la mitad del tratamiento.

Evaluación del efecto citotóxico de Benzo[a]Pireno en A549 y HepG2.

Se evaluó el efecto citotóxico del BaP mediante una determinación fluorométrica empleando el colorante fluorescente diacetato de fluoresceína (FDA), que permite valorar integridad membranal y actividad metabólica.

Las células vivas (metabólicamente activas) son capaces de incorporar e hidrolizar el FDA a fluoresceína, que excitada a una longitud de onda adecuada emite un color verde brillante y es retenido dentro de la célula.

Las células no viables carecen de actividad de esterasas; y por tanto no fluorescen.

Sobrevida celular

Transcurrido el tiempo de exposición de las células al BaP, se eliminó el medio del cultivo y sin despegar las células se realizó un lavado con PBS para eliminar restos celulares.

Posteriormente se adicionó 1mL de la solución FDA : PBS (8 μ L:1.2 mL). Se incubó la placa en oscuridad durante 5min y se leyó en un fluorómetro Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Vantaa Finland) a una λ_{Ex} : 485 nm y λ_{Em} : 538 nm.

La viabilidad se cuantifica en función a la intensidad de fluorescencia relativa proporcional a la cantidad de células que sobreviven al tratamiento.

Los valores se normalizan con las unidades de fluorescencia relativa de las condiciones control (100 % de viabilidad) y a partir de este valor se obtiene el porcentaje de células vivas en condiciones experimentales.

Detección de la expresión de la proteína CYP1A1 por “Western blot” .

Cultivos celulares y tratamiento

Se sembraron las células en placas de 6 pozos, a partir de cultivos en 80-90% de confluencia. Después de 24 h las células fueron expuestas a 5 μ M de BaP. Una vez aplicado el tratamiento, los cultivos se incubaron a 37°C durante tres periodos de exposición (3, 6 y 12 h).

Las soluciones “stock” de BaP emplean DMSO como vehículo, por lo que los cultivos control reciben cantidades equivalentes del mismo. Cada concentración se repite por duplicado.

Extracción y cuantificación de la proteína

Una vez transcurrido el periodo de tratamiento, se retiró el medio y se extrajo la proteína con buffer de lisis Ripa en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas (SDS 0.1 % EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, aprotinina 72.6 ng/ μ l, PMSF 319 μ g/ μ l, ortovanadato de sodio 3.2 mM y NaF 30 mM, disuelto en PBS). El homogenizado se centrifugó a 14000 g por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se procedió a cuantificar la concentración de proteína total por el método de Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad).

“Western Blot”.

Para determinar la expresión de la proteína se cargaron entre 50-70 μ g de proteína total en geles desnaturizantes de bisacrilamida al 12%. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se bloqueó la membrana con leche sin grasa (Santa-Cruz) al 1% y después se lavó con TBS / Tween 20 al 0.1% para proceder a la inmunodetección. La membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en TBS / leche al 1% (anti-human CYP1A1 Santa-Cruz 1:1000) durante toda la noche a 4°C. Pasado este periodo se hicieron 2 lavados con TBS al 0.1 % de Tween 20 y uno con TBS, y después se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa Santa-Cruz 1:2000) durante 1 h a 37°C.

Posteriormente, se realizó la detección de las bandas mediante quimioluminiscencia con el kit ECL (Amersham) y revelando en placas fotosensibles. Los resultados se analizaron por densitometría óptica con el software Quantity One versión 4.1.1 (Bio-Rad).

Como control de cargado se usó la expresión de la proteína constitutiva actina, de tal manera que una vez que se logró determinar la proteína de interés, se llevó a cabo la inmunodetección de esta proteína.

Después de lavar perfectamente la membrana con TBS al 0.1 % de Tween 20 y TBS se incubó con los anticuerpos primario (anti-actina Santa-Cruz 1:500, 1 h a 37°C) y secundario (anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa Santa-Cruz 1:2000, 1 h a 37°C) diluidos en TBS / leche al 1%.

Los valores de densidad óptica que se obtuvieron para la proteína CYP1A1 se normalizaron con los obtenidos para el control de cargado de actina.

Estudios de actividad enzimática

El ensayo de actividad enzimática de CYP1A1 empleado es una modificación al reportado por Jacques et al., (1997) [49]. El ensayo consiste en realizar la determinación fluorométrica de la resorufina, el producto de la desalquilación de la 7-etoxi-resorufina (7-ETRF) mediada por CYP1A1.

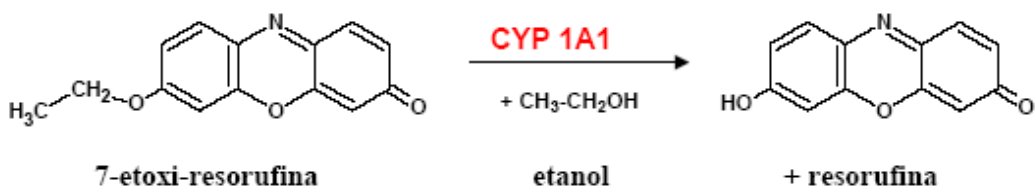


Figura 10. Reacción enzimática catalizada por CYP1A1.

Cultivos celulares y tratamiento

Se sembraron las células en placas de 96 pozos, a partir de cultivos en 80-90% de confluencia. Después de 24 h las células fueron expuestas a 10 nM, 100 nM, 1, 2.5 y 5 μ M de BaP. Las soluciones “stock” de BaP emplean DMSO como vehículo, por lo que los cultivos control reciben cantidades equivalentes del mismo. Cada concentración se repite por triplicado.

Actividad enzimática de CYP1A1 [Ensayo en placas de 96-pozos]

Una vez concluido el periodo de exposición, se eliminó el sobrenadante y las células fueron lavadas con PBS. La reacción comienza con la adición de la 7-ETRF (8 μ M) y dicumarol (10 μ M) como agente estabilizante del producto. Inmediatamente después las placas se preincubaron por 15 min en oscuridad a 37°C y la formación del producto se monitoreó con un fluorómetro ($\lambda_{\text{excitación}}=515\text{nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}}=610\text{nm}$).

Determinación del perfil de formación de metabolitos del MTZ in vitro.

Cultivos celulares de A549 y HepG2

Los cultivos de A549 y HepG2 se describen previamente.

Cultivos celulares de linfocitos humanos

Los linfocitos se aislaron de sangre entera, mediante un gradiente de densidad de Ficoll – Histopaque-1077 (Sigma) (1:1.5), se centrifugaron las células a 1600 g por 25 min, y después se lavaron con PBS.

Tratamiento

Se preparó una solución acuosa estéril de MTZ 1 mg/ml y por diluciones seriadas se obtuvieron las concentraciones deseadas.

Se sembraron las células en cajas de cultivo, a partir de cultivos en 80-90% de confluencia. Después de 24 h se reemplazó el medio y los cultivos se expusieron a dos concentraciones de MTZ (25 y 50 μ M) en dos diferentes periodos de tratamiento (24 y 48 h).

Determinación de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH intra y extracelular por HPLC.

Para determinar la presencia y cantidad de los compuestos de estudios de manera intra y extracelular, se analizaron por separado el sobrenadante y el paquete celular.

Sobrenadante

Una vez concluido el periodo de exposición, se recuperó el medio y se siguió el protocolo C para el tratamiento de la muestra.

Medio intracelular.

Una vez concluido el periodo de exposición, se retiró el medio y se procedió al manejo del paquete celular.

Las células se colectaron por tripsinización y se transfirieron a un tubo donde se rompieron mecánicamente con un homogenizador manual (PRO 250). El homogenizado se sometió a una primera centrifugación a 16,000 g por 15 min para eliminar restos celulares. Después de centrifugado, el sobrenadante se trató con ácido perclórico al 70% p/v para precipitar las proteínas. El precipitado de proteínas se separó por centrifugación; se recuperó el sobrenadante y se siguió el protocolo C para el tratamiento de la muestra.

9. Resultados

Parámetros de validación de la técnica de HPLC para la identificación y cuantificación del MTZ y sus dos principales metabolitos en solución.

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de trabajo se diseñó una nueva técnica para la cuantificación de MTZ y sus dos principales metabolitos en orina empleando HPLC. Este método analítico fue validado y cumplió ampliamente con los parámetros señalados por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 [50] para la validación de métodos analíticos.

Debido a que este método fue diseñado y validado para la detección de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH en orina y en un equipo diferente al equipo con el que contamos actualmente, las condiciones cromatográficas antes descritas deben validarse para nuevas condiciones de trabajo y con el equipo actual. Por ello en este trabajo se evaluaron distintos parámetros como la linealidad del método, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, así como la variación *intra* día e *inter* día que se relacionarán con la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) del método.

Linealidad.

Para determinar la linealidad del método se realizaron corridas analíticas de cinco muestras de concentración conocida, preparadas por dilución seriada de una mezcla en solución acuosa de los compuestos bajo estudio. Con éstas, se construyeron curvas de cinco puntos, cada uno correspondiente a una concentración distinta (0.5, 0.25, 0.12, 0.06 y 0.03 µg/mL) de la mezcla. La elección de este rango de concentraciones responde a resultados previos de donde se tomaron los valores de menor concentración de los analitos.

Las corridas se realizaron por triplicado y en tres días diferentes para evaluar las variaciones intradía (repetitividad) e interdía (reproducibilidad) del método.

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998 la linealidad del método es la capacidad que tiene éste de obtener una respuesta directamente proporcional a la concentración del compuesto en la muestra en un intervalo de trabajo.

El análisis cuantitativo se lleva a cabo correlacionando la respuesta obtenida con la concentración. La respuesta a evaluar puede ser la altura o el área del pico de señal generado por el compuesto de interés. Resulta igualmente válido emplear cualquiera, siempre y cuando el parámetro que se elija sea reproducible, especialmente la altura. En este trabajo se utilizó como respuesta a correlacionar el área que se denominó ABC (área bajo la curva) ya que se obtenía una mayor reproducibilidad que con la altura de los picos.

Una vez que se completa la corrida analítica se obtiene el cromatograma correspondiente, en el que se observa la presencia de los compuestos que, bajo las condiciones dadas, se pueden separar de la muestra. La Figura 11 muestra el cromatograma obtenido para la separación de la mezcla de estándares en solución acuosa de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH.

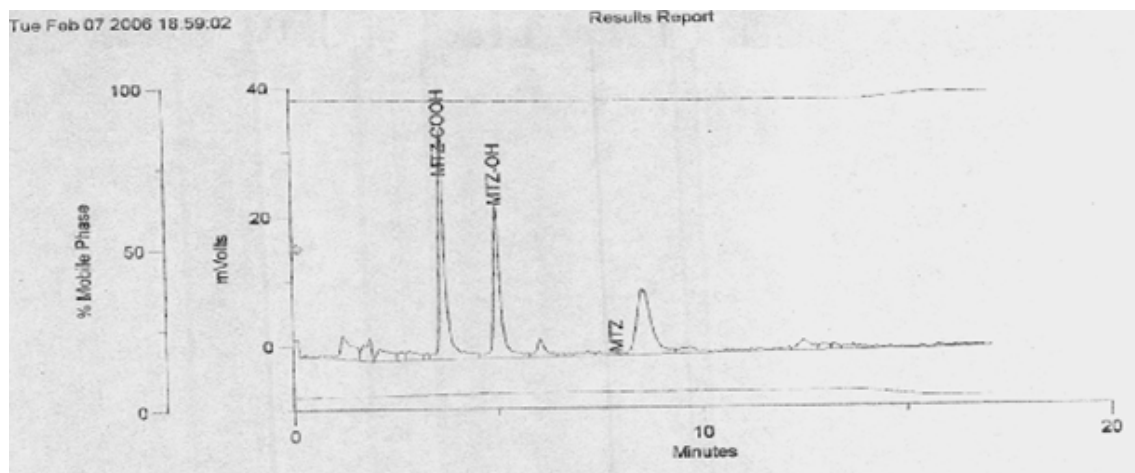


Figura 11. Cromatograma: Separación de MTZ y sus dos principales metabolitos (MTZ-OH y MTZ-COOH) en solución 0.5 µg/mL de cada compuesto.

Para determinar la linealidad del método, consideramos que la dispersión de los datos se encontrara representada por un coeficiente de variación (C.V.) menor o igual al 15% (C.V. \leq 15%).

Las Tablas 1 (MTZ-COOH), 2 (MTZ-OH) y 3 (MTZ) muestran los valores de respuesta promedio de una determinación por triplicado de cada compuesto (área bajo la curva) obtenida en tres diferentes días, así como los valores de C.V. obtenidos.

Concentración [$\mu\text{g/mL}$]	Respuesta (área bajo la curva) MTZ-COOH			PROMEDIO	D.E.	C.V. %
	Día 1	Día 2	Día 3			
0.5	3.807E+05	3.933E+05	3.884E+05	3.875E+05	6.35E+03	1.6
0.25	1.825E+05	1.883E+05	1.966E+05	1.891E+05	7.09E+03	3.7
0.12	1.047E+05	9.481E+04	9.679E+04	9.877E+04	5.23E+03	5.3
0.06	5.178E+04	5.342E+04	6.200E+04	5.573E+04	5.49E+03	9.8
0.03	2.767E+04	3.932E+04	3.555E+04	3.418E+04	5.94E+03	17.4

Tabla 1. Linealidad del método para el metabolito MTZ-COOH.

Concentración [µg/mL]	Respuesta (área bajo la curva) MTZ-OH			PROMEDIO	D.E.	C.V. %
	Día 1	Día 2	Día 3			
0.5	3.240E+05	3.180E+05	3.118E+05	3.179E+05	6.10E+03	1.9
0.25	1.300E+05	1.382E+05	1.540E+05	1.407E+05	1.22E+04	8.7
0.12	8.008E+04	9.470E+04	7.606E+04	8.361E+04	9.81E+03	11.7
0.06	4.290E+04	3.764E+04	4.498E+03	2.835E+04	2.08E+04	17.3
0.03	2.349E+04	3.187E+04	2.594E+04	2.710E+04	4.31E+03	25.9

Tabla 2. Linealidad del método para el metabolito MTZ-OH.

Concentración [µg/mL]	Respuesta (área bajo la curva) MTZ			PROMEDIO	D.E.	C.V. %
	Día 1	Día 2	Día 3			
0.5	3.190E+05	3.220E+05	3.334E+05	3.248E+05	7.60E+03	2.3
0.25	1.506E+05	1.618E+05	1.700E+05	1.608E+05	9.74E+03	6.1
0.12	9.543E+04	7.182E+04	7.817E+04	8.181E+04	1.22E+04	14.9
0.06	4.213E+04	4.503E+04	3.615E+04	4.110E+04	4.53E+03	11.0
0.03	2.430E+04	3.418E+04	2.155E+04	2.668E+04	6.64E+03	24.9

Tabla 3. Linealidad del método para MTZ.

De las tablas anteriores se observa que el valor del coeficiente de variación se mantiene valores dentro de los parámetros establecidos para definir la linealidad del método hasta la concentración de 0.06µg/mL; pero solo para el MTZ-COOH y el MTZ, ya que para MTZ-OH, a la misma concentración, el C.V es mayor al 15%.

Por otro lado se consideró al coeficiente de determinación lineal (r^2) para evaluar el comportamiento lineal de los tres compuestos en el intervalo de trabajo. Para demostrar este comportamiento se construyó una gráfica para cada compuesto (Figuras 12,13,14) empleando el promedio de respuesta (área bajo la curva) de las 9 curvas hechas en tres diferentes días. De ahí se obtuvieron los valores de r^2 , que en todos los casos se encontraron dentro del parámetro establecido.

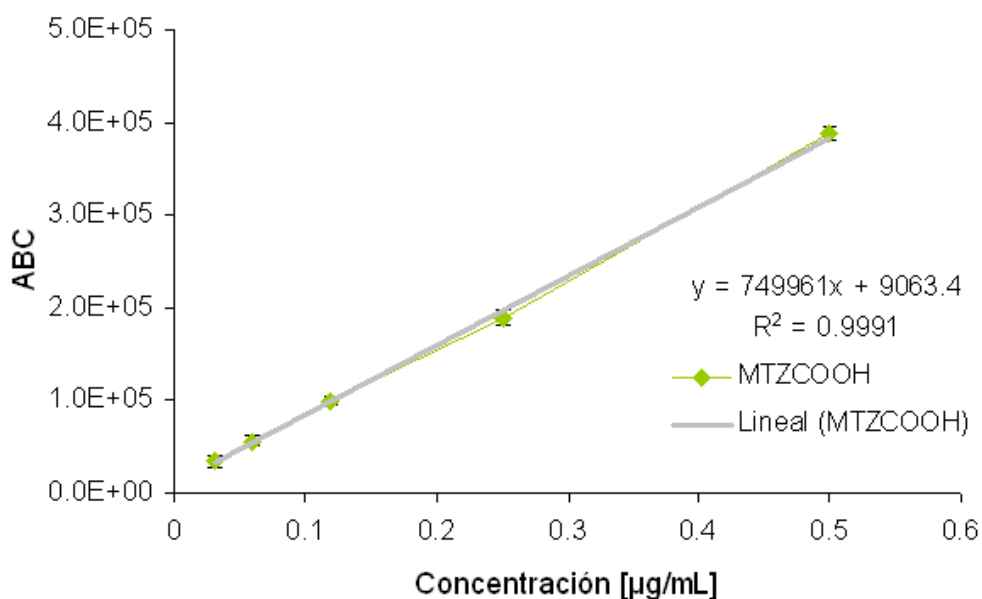


Figura 12. Linealidad del método para MTZ-COOH

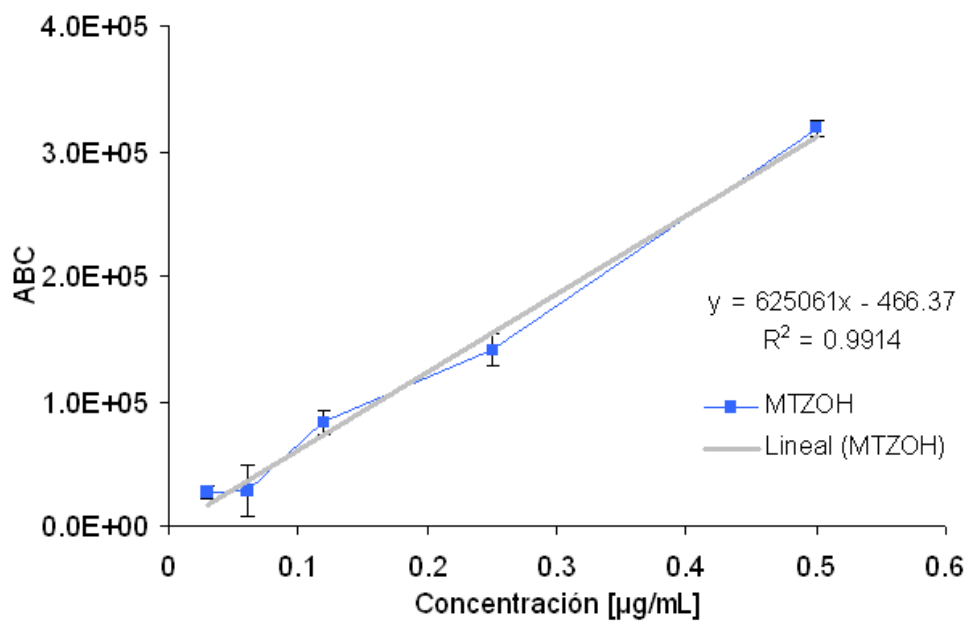


Figura 13. Linealidad del método para MTZ-OH

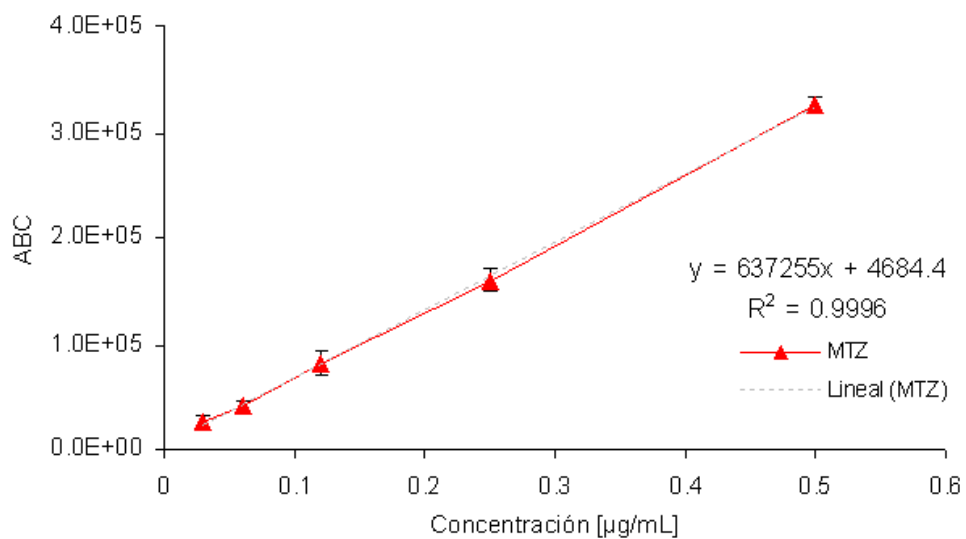


Figura 14. Linealidad del método para MTZ.

En la Tabla 4, se resumen los valores obtenidos del C.V. Se observa que para el MTZ y el MTZ-COOH el coeficiente de variación mantiene valores dentro de los parámetros establecidos para definir la linealidad del método C. V. $\leq 15\%$ hasta la concentración de 0.06 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para el MTZ-OH el coeficiente de variación es $\leq 15\%$ hasta la concentración de 0.12 $\mu\text{g/mL}$.

Considerando ambos resultados, C.V. y r^2 , decimos que el método es lineal para los tres compuestos hasta una concentración de 0.12 $\mu\text{g/mL}$.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	C.V. (%)		
	MTZ-COOH	MTZ-OH	MTZ
0.5	1.6	1.9	2.3
0.25	3.7	8.7	6.1
0.12	5.3	11.7	14.9
0.06	9.8	17.3	11.0
0.03	17.4	25.9	24.9

Tabla 4. Coeficiente de variación determinado para la linealidad del método.

Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC)

Para realizar el análisis cuantitativo es necesario establecer los límites de detección y cuantificación. Ambos son parámetros que reflejan la cantidad, concentración o señal mínima detectable por un sistema en particular, con una incertidumbre asociada.

Los valores de LD y LC que se muestran en las Tablas 5 y 6, provienen del manejo matemático de datos de la curva patrón obtenidos para linealidad, de los que es posible determinar los límites superior e inferior del intervalo que el método requiere.

Límite de detección	
MTZ	0.06 µg/mL
MTZ-OH	0.11 µg/mL
MTZ-COOH	0.04 µg/mL

Tabla 5. Límite de detección del MTZ y sus dos principales metabolitos

Límite de cuantificación	
MTZ	0.11 µg/mL
MTZ-OH	0.22 µg/mL
MTZ-COOH	0.08 µg/mL

Tabla 6. Límite de cuantificación del MTZ y sus dos principales metabolitos

De acuerdo con estos resultados el LC es mayor que el LD en los tres casos, lo que indica que aunque los compuestos de interés puedan ser detectados a concentraciones de 0.04 – 0.11 µg/mL, su cuantificación no será posible por debajo de un rango de concentración de aproximadamente el doble (0.08 – 0.22 µg/mL) que corresponde a los valores del LC.

Por otro lado, cabe destacar que lo observado es parecido a lo que sucede con la linealidad, donde el MTZ-OH presenta un comportamiento diferente al de los otros dos compuestos, donde sus valores límites resultan mayores que los otros dos compuestos; de tal manera que si se consideran los resultados de linealidad, es posible decir que la determinación de este compuesto es menos sensible en comparación con MTZ y MTZ-COOH.

Tomando en cuenta los resultados de linealidad, LD y LC, se tomó el valor de 0.06 µg/mL como intermedio, y se realizaron, en un mismo día, nueve determinaciones de una muestra para determinar la repetibilidad y evaluarla de acuerdo a los parámetros establecidos por la NOM-177-SSA1-1998 para la validación de métodos analíticos.

En la Tabla 7 se presentan los valores del área bajo la curva obtenidos de nueve repeticiones para MTZ-COOH, MTZ-OH y MTZ a una concentración de 0.06 µg/mL y se observa que, en concordancia con los datos anteriores, solo el coeficiente de variación del metabolito hidroxilado es mayor al 15%.

<i>Repetición</i>	MTZ-COOH	MTZ-OH	MTZ
1°	5.178E+04	4.290E+04	4.213E+04
2°	5.342E+04	3.764E+04	4.503E+04
3°	6.200E+04	3.010E+04	3.615E+04
4°	6.00E+04	3.10E+04	3.95E+04
5°	5.10E+04	3.09E+04	4.13E+04
6°	5.82E+04	4.01E+04	4.62E+04
7°	6.50E+04	4.50E+04	4.56E+04
8°	6.02E+04	3.89E+04	3.58E+04
9°	5.60E+04	4.66E+04	3.50E+04
PROMEDIO	5.75E+04	3.81E+04	4.07E+04
D.E.	4.80E+03	6.26E+03	4.39E+03
C.V.(%)	8.4	16.4	10.8

Tabla 7. Repetibilidad (0.06 µg/mL) para MTZ y sus dos metabolitos.

Por otro lado se calculó el error relativo para el valor promedio de la respuesta de cada compuesto y la exactitud.

La exactitud se evaluó con los datos de repetibilidad (intradía) con base en el valor nominal de concentración que debe estar dentro del $\pm 15\%$ de error relativo, calculado como:

$$\% \text{ error relativo} = \frac{\text{error absoluto}}{\text{error verdadero}} \times 100 = \frac{X_{\text{exp}} - X_{\text{verd}}}{X_{\text{verd}}} \times 100$$

Donde:

X_{exp} = valor experimental

X_{verd} = valor real

Debido a que el coeficiente de variación para la concentración de 0.03 $\mu\text{g/mL}$ en linealidad se salía de los parámetros establecido, solo se realizó el cálculo para la concentración de 0.06 $\mu\text{g/mL}$, obteniéndose los siguientes valores de error:

Compuesto	X exp	X verd	%error relativo	% exactitud
MTZ-COOH	0.065	0.06	-7.677	92.3
MTZ-OH	0.047	0.06	-21.251	78.7
MTZ	0.057	0.06	-5.700	94.3

Tabla 8. Porcentaje de error y exactitud en [0.06 $\mu\text{g/mL}$] para metronidazol y sus dos metabolitos.

Se observa que en la concentración de 0.06 $\mu\text{g/mL}$ los valores del C.V. y error relativo del MTZ y MTZ-COOH se encuentran dentro de los parámetros establecidos, menores al 15% y al 20% respectivamente; pero en el caso del MTZ-OH ambos parámetros se encuentran fuera de rango (C.V.= 17.3% y E.R.= 21.2%); estos datos refuerzan la idea de la falta de sensibilidad para la detección de este compuesto en particular.

Método de extracción de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH a partir de una matriz biológica compleja.

Para determinar la presencia y cuantificar la formación de los dos principales metabolitos del Metronidazol fue necesario establecer la técnica de extracción óptima, es decir, aquella que permitiera reducir la presencia de contaminantes del medio sin modificar drásticamente el pH de la muestra para mantener la integridad de la columna y las condiciones cromatográficas establecidas. Se probaron tres diferentes protocolos de extracción que fueron tomados y modificados de la literatura [46, 47,48].

Las pruebas se realizaron en extractos celulares, provenientes de la homogenización del paquete celular y el medio sobrenadante de cultivos sin tratamiento, que fueron fortificados, en el caso que se ejemplifica con la Figura 15, con MTZ a una concentración de 25 μ M.

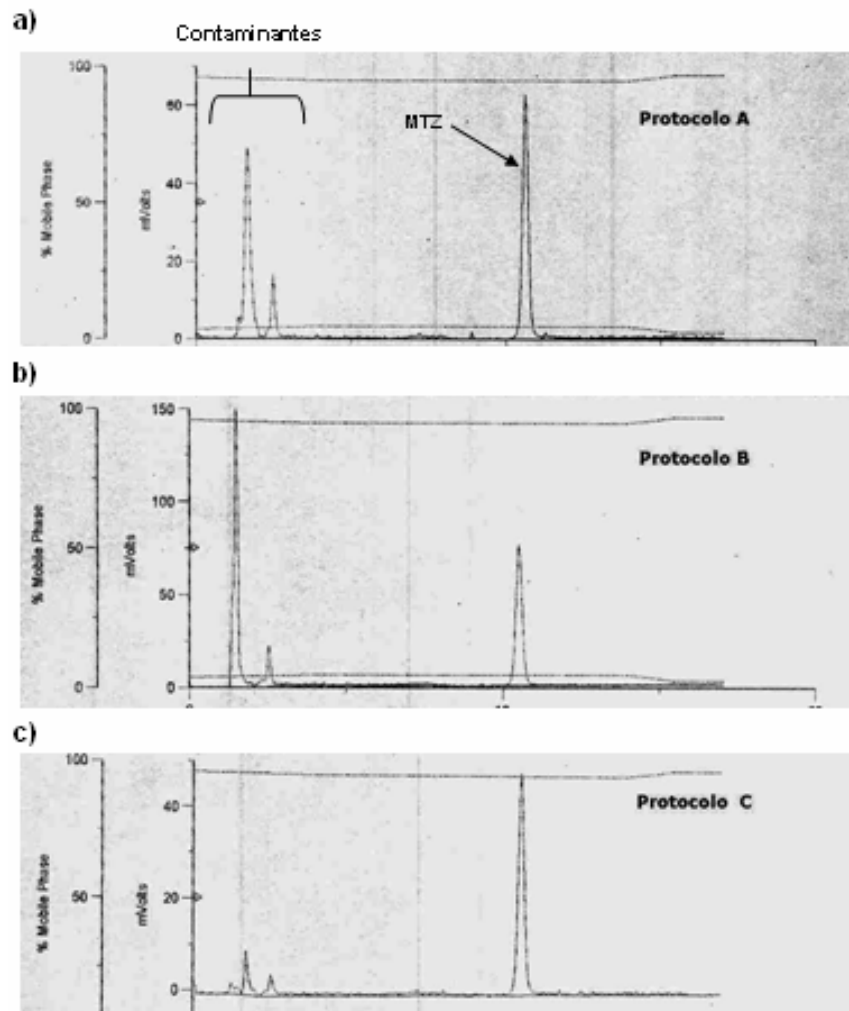


Figura 15. Cromatogramas de protocolos de extracción de una muestra fortificada con MTZ 25 μ M a) Protocolo A, b) Protocolo B c) Protocolo C.

La Figura 15 muestra los cromatogramas obtenidos después de la preparación de la misma muestra biológica con los protocolos de extracción A, B y C. Al comparar los tres protocolos lo primero a destacar es que no se observa una extracción selectiva, pues, de manera simultánea, se obtienen la señal del analito y de señales desconocidas entre los minutos 0 y 5 de la corrida analítica.

Se observa que para el MTZ se obtiene un pico simétrico y bien definido, que varía en altura dependiendo de la eficiencia de la extracción, mientras que las características de los picos desconocidos no se mantienen constantes. Los picos desconocidos son asimétricos e irregulares y presentan variaciones tanto en altura como en separación. Se infiere que se trata de compuestos provenientes de la muestra, que no fueron eliminados con el proceso de extracción, por lo que fueron designados “contaminantes”.

En cuanto a la eficiencia de extracción las diferencias son claras. La eficiencia de extracción del analito se mantiene relativamente constante con variaciones de entre el 8 y 25%, mientras que la extracción de los contaminantes es más variable. Analizando los resultados se observa que empleando el protocolo A (Figura 15a) se extraen ambos, analito y contaminantes, con una eficiencia similar; mientras que con el protocolo B (Figura 15b) la extracción es más eficiente para los contaminantes que para el analito. Como se puede ver en la Figura 15c, es con el protocolo C, con el que los picos desconocidos alcanzan su máxima separación y la menor eficiencia en su extracción, comparada con la del analito y comparada con la propia en los otros protocolos.

En vista de estos resultados, se decidió que por disminuir considerablemente la presencia de contaminantes y mantener la eficiencia de extracción del analito en valores aceptables, el protocolo de extracción C sería el método de elección para continuar con el estudio.

Evaluación del efecto citotóxico de benzo [a] pireno en células A549 y HepG2.

Sobrevida celular

En la Figura 16 se muestran los resultados de sobrevida celular de la línea celular A549 expuestas durante 24 h a distintas concentraciones de BaP (10 nM, 100 nM, 1, 2.5 y 5 μ M). Se observa que ninguna de las concentraciones probadas resultó tóxica pues no redujeron la viabilidad de manera significativa.

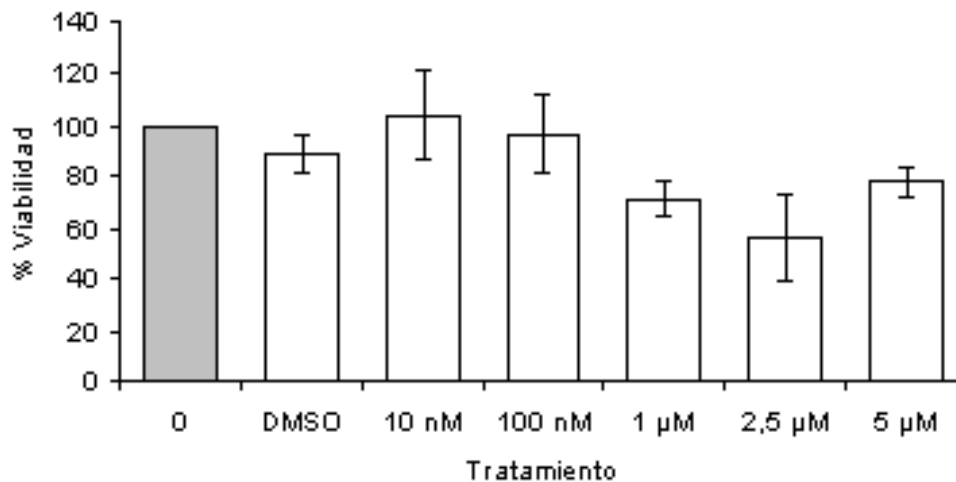


Figura 16. Porcentaje de viabilidad de células A549 tratadas con B(a)P [10 nM, 100 nM, 1, 2.5 y 5 μ M] durante 24 h. Cada barra representa la media \pm DE de tres experimentos por triplicado. Normalizado con control sin exposición. ANOVA seguido por Bonferroni.

En las Figuras 17 y 18 se muestra la viabilidad de A549, expuestas durante 48 y 72 h. En el caso de la exposición durante 48 h se observa que solo la dosis más alta (5 μM) redujo significativamente la viabilidad, mientras que con una exposición a 72 h la viabilidad disminuye de manera significativa desde 2.5 μM .

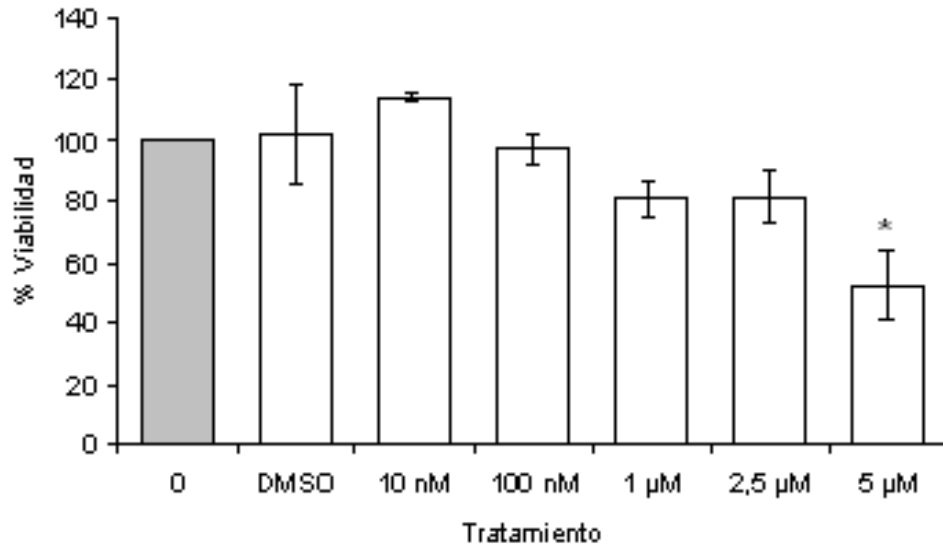


Figura 17. Viabilidad de células A549 tratadas con B(a)P [10 nM, 100 nM, 1, 2.5 y 5 μM] durante 48 h. Cada barra representa la media \pm DE de tres experimentos por triplicado. Normalizado con control sin exposición. ANOVA seguido por Bonferroni, * $p < 0.001$.

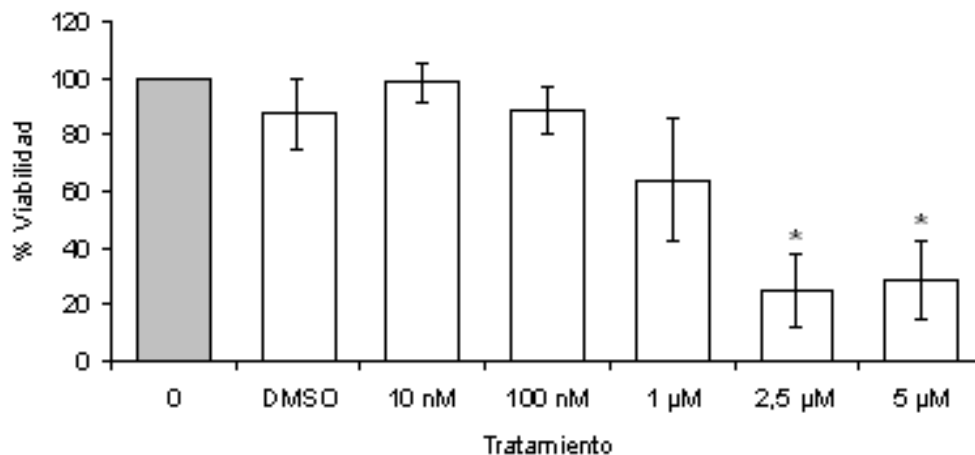


Figura 18. Viabilidad de células A549 tratadas con B(a)P [10 nM, 100 nM, 1, 2.5 y 5 μM] durante 72 h. Cada barra representa la media \pm DE de tres experimentos por triplicado. Normalizado con control sin exposición. ANOVA seguido por Bonferroni, * $p < 0.001$.

Las Figuras 19, 20 y 21 presentan los datos de sobrevivencia obtenidos para la línea HepG2 después de 24, 48 y 72 h de exposición, respectivamente, a distintas concentraciones de BaP (10 nM, 100 nM, 1, 2.5 y 5 μ M).

En este caso, a partir de 5 μ M la disminución fue estadísticamente significativa, para la exposición a 24 y 48 h, mientras que a 72 h la viabilidad disminuye en presencia de 1 y hasta 5 μ M de BaP.

Por otro lado los datos muestran que, para ambos casos, la concentración de DMSO empleada no afecta la viabilidad de las líneas A549 y HepG2 en ninguna de las condiciones de trabajo, por lo que los efectos citotóxicos observados se deben solo al tratamiento con BaP.

A partir de estos resultados se decidió que se utilizaría 2.5 μ M de BaP como concentración subtóxica para los siguientes experimentos.

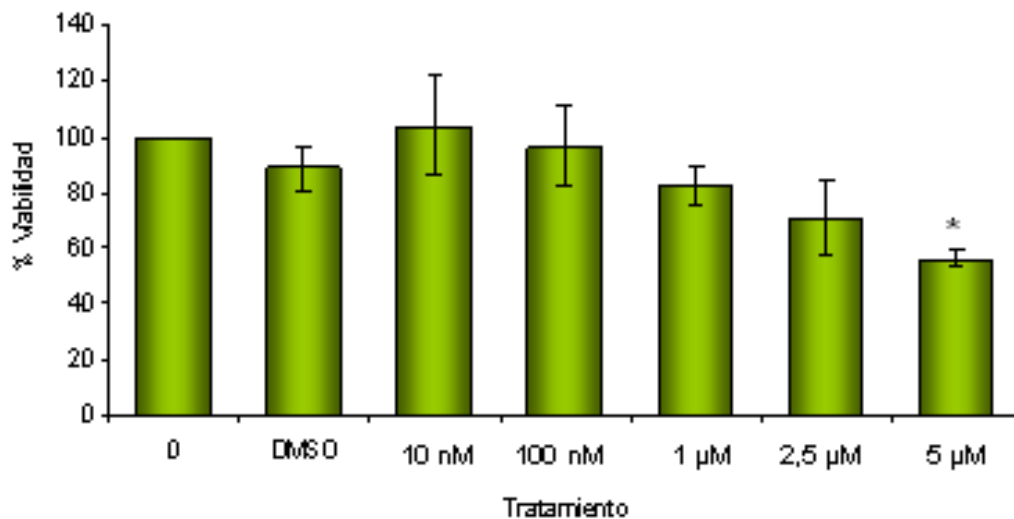


Figura 19. Viabilidad de células HepG2 tratadas con B(a)P [10 nM, 100 nM, 1, 2.5 y 5 μ M] durante 24 h Cada barra representa la media \pm DE de tres experimentos por triplicado. Normalizado con control sin exposición. ANOVA seguido por Bonferroni.

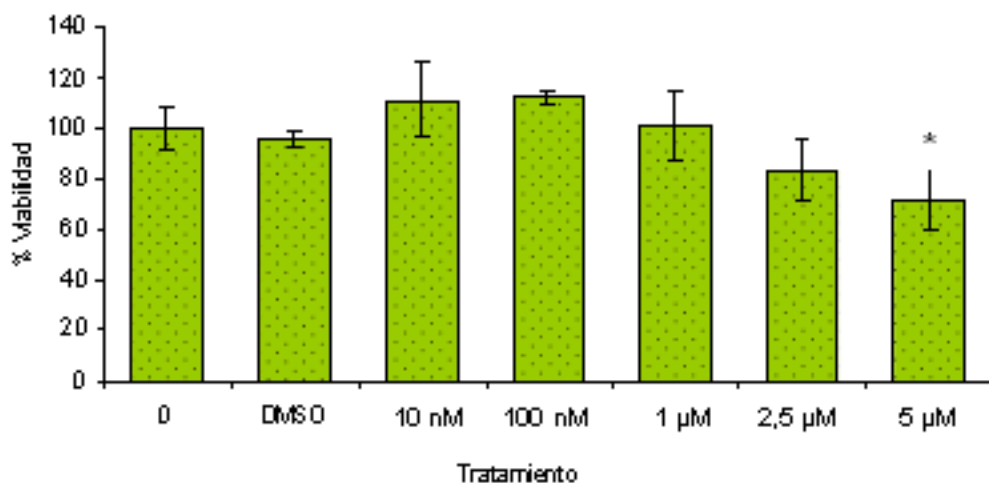


Figura 20. Viabilidad de células HepG2 tratadas con B(a)P [10 nM, 100 nM, 1, 2.5 y 5 µM] durante 48 h. Cada barra representa la media ± DE de tres experimentos por triplicado. Normalizado con control sin exposición. ANOVA seguido por Bonferroni, * p < 0.001.

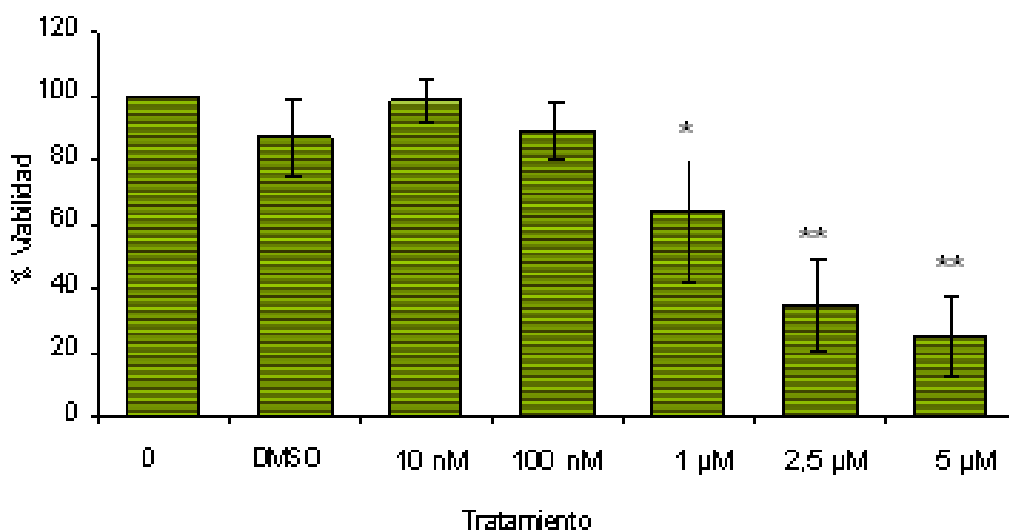


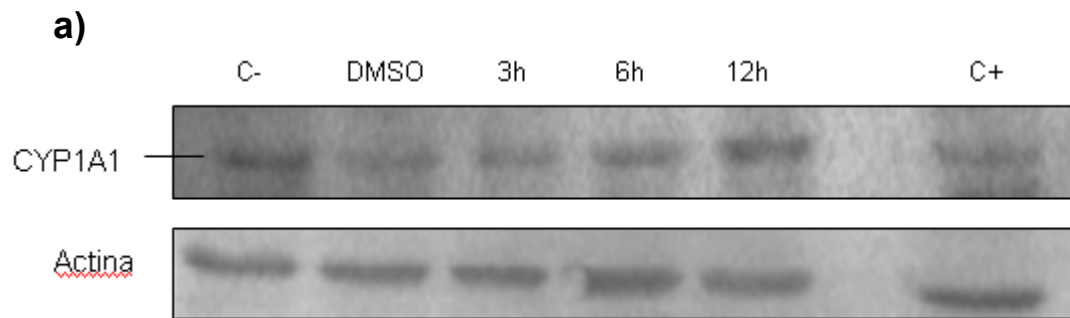
Figura 21. Viabilidad de células HepG2 tratadas con B(a)P [10 nM, 100 nM, 1, 2.5 y 5 µM] durante 72 h. Cada barra representa la media ± DE de tres experimentos por triplicado. Normalizado con control sin exposición. ANOVA seguido por Bonferroni, * p < 0.05 p < 0.001.**

Expresión de la proteína CYP1A1 en cultivos de A549 y HepG2 inducidos con B(a)P.

Para verificar la presencia e inducibilidad de CYP1A1 en las líneas celulares se evaluó el perfil de inducción de CYP1A1 con Benzo(a)Pireno (BaP) considerado un inductor clásico de esta enzima. Lo anterior con la finalidad de inducir cultivos de ambas líneas celulares para después exponerlos a MTZ y verificar si el incremento en la cantidad de enzima modifica la formación *in vitro* de los metabolitos de MTZ.

La determinación de la proteína se realizó mediante Western Blot, cargando de 60 a 70 µg de proteína total. En el ensayo con lisados celulares de la línea A549 se incluyó como control positivo la línea celular HeLa que, de acuerdo a la literatura y a nuestros resultados anteriores, expresa esta enzima.

En la Figura 22a se muestra un inmunoblot representativo obtenido del tratamiento de inducción con BaP en tres diferentes periodos de exposición (3, 6 y 12 h) y el análisis de la densidad óptica (22b)



b)

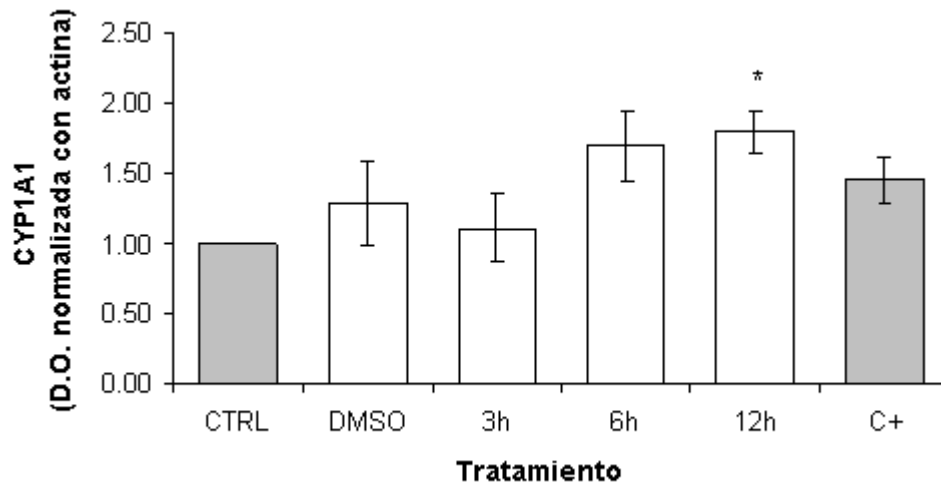


Figura 22 a Determinación de la proteína CYP1A1 en células A549 tratadas con 2.5 μ M de BaP durante 3, 6 y 12 h; empleando la línea celular HeLa como control positivo. El anticuerpo empleado presenta reacción cruzada con las proteínas CYP1A1 y CYP1A2, que pueden ser distinguidas por su movilidad en el inmunoblot: la banda superior corresponde a CYP1A1 y la inferior a CYP1A2. b La gráfica muestra la densidad óptica de las bandas superiores normalizadas con el control de cargado. Cada barra representa la media \pm DE de tres experimentos por duplicado. ANOVA seguido por Bonferroni,* $p < 0.05$.

La Figura 23 muestra los resultados de los experimentos de inducción con BaP en la línea HepG2. Las Figuras 23a y 23 b muestran, respectivamente, un blot representativo obtenido del tratamiento con BaP (2.5 μ M) durante 3, 6 y 12 h y el análisis por densitometría de tres experimentos por duplicado.

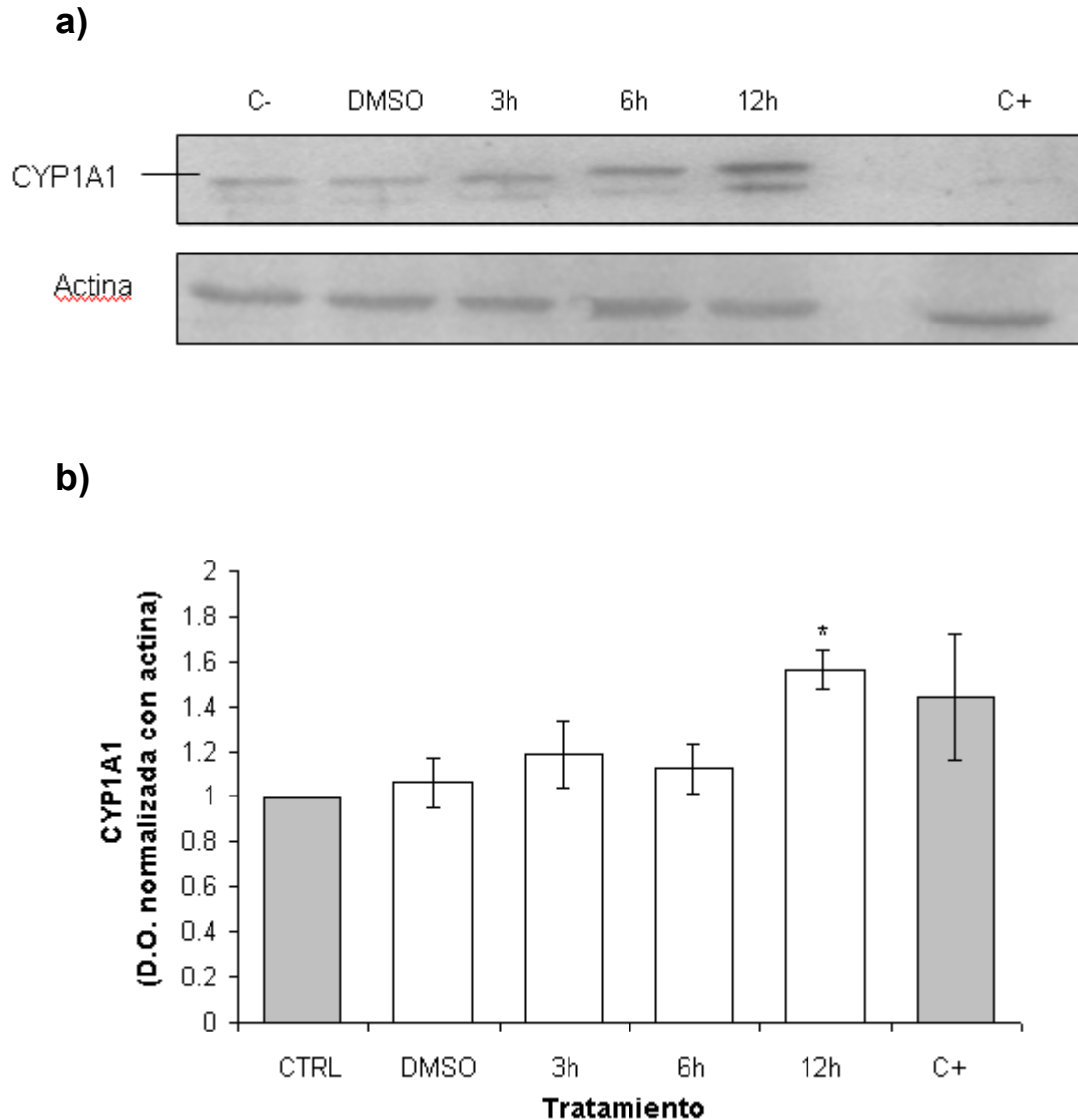


Figura 23. a Determinación de la proteína CYP1A1 en células HepG2 tratadas con 2.5 μ M de BaP durante 3, 6 y 12 h; empleando la línea celular HeLa como control positivo. El anticuerpo empleado presenta reacción cruzada con las proteínas CYP1A1 y CYP1A2, que pueden ser distinguidas por su movilidad en el inmunoblot: la banda superior corresponde a CYP1A1 y la inferior a CYP1A2. **b** La gráfica muestra la densidad óptica de las bandas superiores normalizadas con el control de cargado. Cada barra representa la media \pm DE de tres experimentos por duplicado. ANOVA seguido por Bonferroni, * $p < 0.05$.

Como se observa en los experimentos de inducción, el tratamiento con BaP revela la presencia e inducibilidad de CYP1A1 en ambas líneas celulares, lo que concuerda con lo reportado por otros autores [51, 52, 53, 54, 55], que en base a sus resultados, justifican su uso en estudios de biotransformación *in vitro*.

A pesar de que la potencia de inducción del BaP, aunque menor a la de otros inductores como el TCDD, es mucho mayor en otros tipos celulares, los niveles de inducción aquí observados en ambas líneas celulares corresponden a otros reportados en la literatura [54, 58, 60], donde son considerados bajos.

Actividad enzimática EROD (7-Etoxiresorufina-O-desetilasa)

La funcionalidad de la enzima se determinó con ensayos de actividad enzimática por la desalquilación de 7-etoxiresorufina mediada por CYP1A1.

Para la optimización del ensayo, se inició con experimentos en los que se monitoreó la formación del producto de la reacción de desalquilación (resorufina) cada 15 min durante un periodo de 90 min, para poder determinar la ventana de tiempo en la que se observa el máximo de actividad enzimática. Al mismo tiempo se evaluó la actividad en diferentes densidades celulares, para observar si el incremento en la cantidad de células pudiera ser un factor que influenciara la fluorescencia; por ejemplo saturando el sistema e impidiendo observar cambios.

La Figura 24 representa la actividad enzimática de CYP1A1 en la línea celular HepG2; donde se observa que las densidades celulares de trabajo empleadas no saturan el sistema; de igual manera, la línea A549 mostró el mismo comportamiento. De estos resultados se eligió el tiempo de 20 min, como el tiempo óptimo de actividad, ya que es donde se observa el comportamiento lineal al inicio de la cinética. Además se estableció una densidad intermedia de 60,000 células para continuar con los experimentos de inducción con BaP.

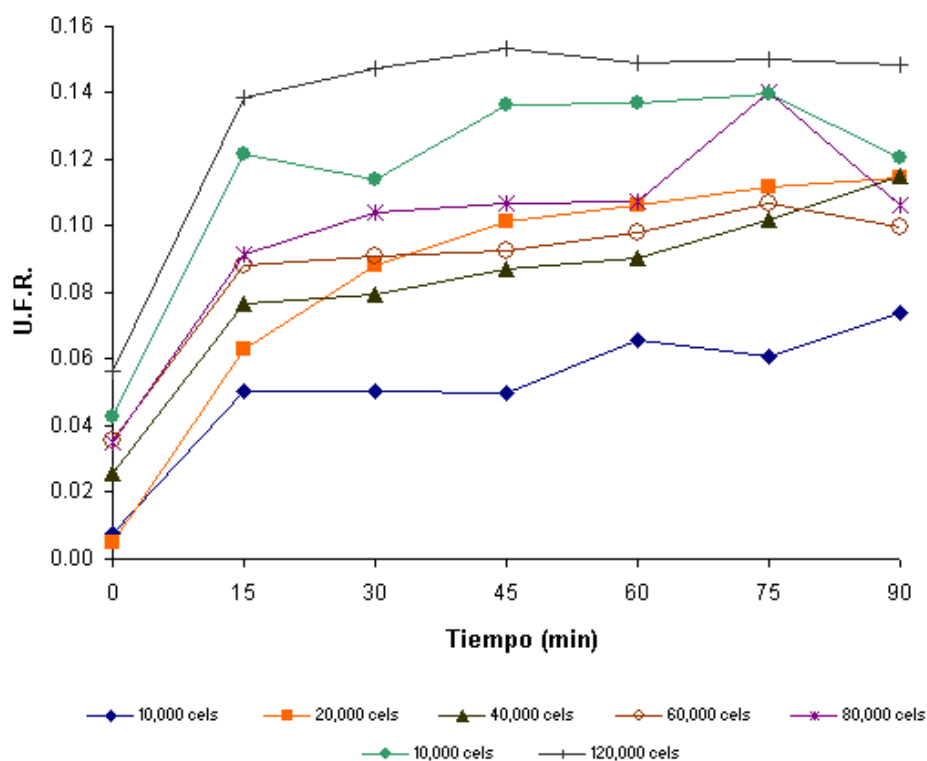


Figura 24. Cinética de actividad basal de CYP1A1 en células HepG2. Promedio de dos experimentos por duplicado.

Una vez establecido el tiempo del ensayo (20 min) y la densidad celular a emplear (60,000 células), se procedió a realizar los experimentos de actividad enzimática EROD en cultivos de A549 y HepG2 tratados con 2.5 μ M de BaP durante tres diferentes tiempos de exposición 3, 6 y 12 h. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25 y 26 respectivamente.

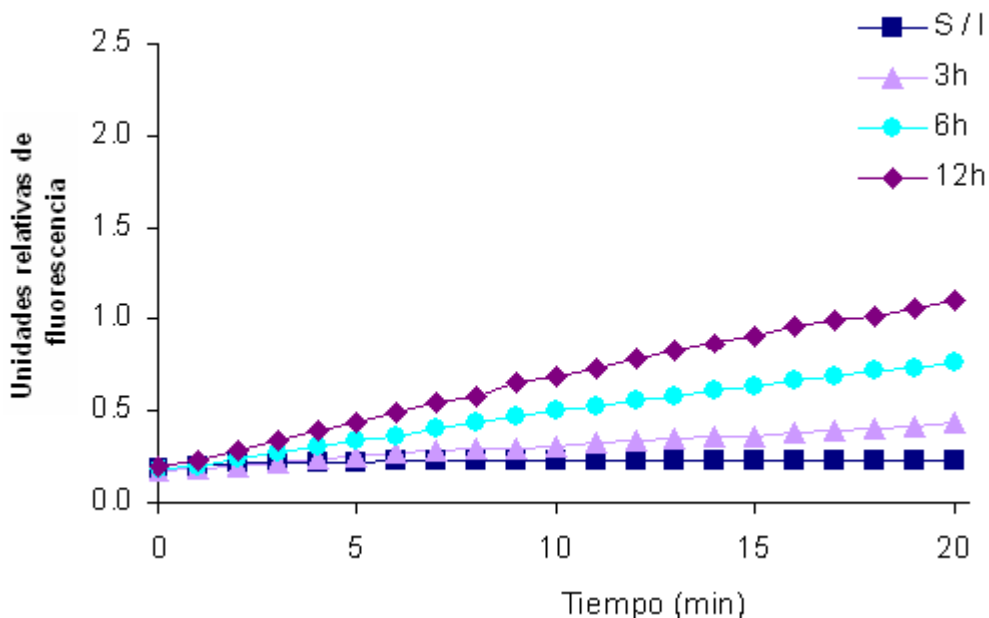


Figura 25. Actividad enzimática CYP1A1 inducido por BaP en células A549. Promedio de tres experimentos por triplicado.

En la Figura 25 se muestra la actividad EROD en células A549 inducidas con BaP. Se puede observar que en todas las condiciones se registra la formación de producto. En la condición en la que las células no se expusieron a BaP la formación de producto se mantiene constante a lo largo del tiempo que dura el ensayo, mientras que en las células expuestas, se observa un incremento en la actividad de CYP1A1 proporcional al tiempo de exposición al inductor. Dicho incremento es el resultado de la inducción por BaP.

Por otro lado, el comportamiento de las células HepG2 sigue el mismo patrón, sin embargo, como se observa en la Figura 26, la actividad en células no- expuestas es ligeramente mayor a la observada con A549 y el incremento observado en la actividad de las células expuestas a BaP, es mucho mayor.

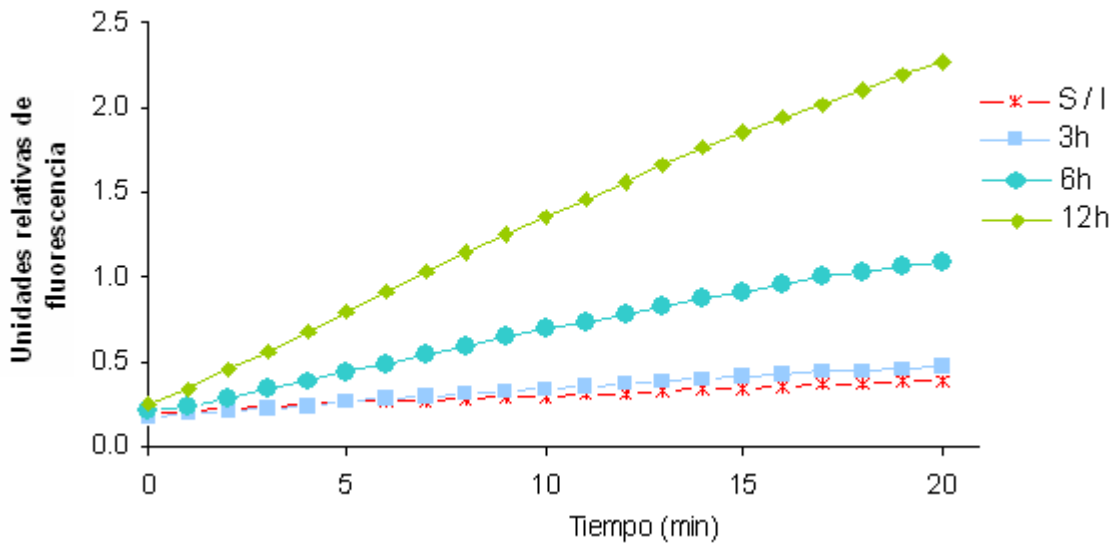


Figura 26. Actividad enzimática CYP1A1 inducida por BaP en células HepG2. Promedio de tres experimentos por triplicado.

La Figura 27 compara la inducción de la actividad EROD en ambas líneas celulares. Los valores graficados corresponden al promedio de los tres experimentos por triplicado, pero solo del punto final de la determinación (20 min) y después de haberles restado la fluorescencia del control al tiempo cero.

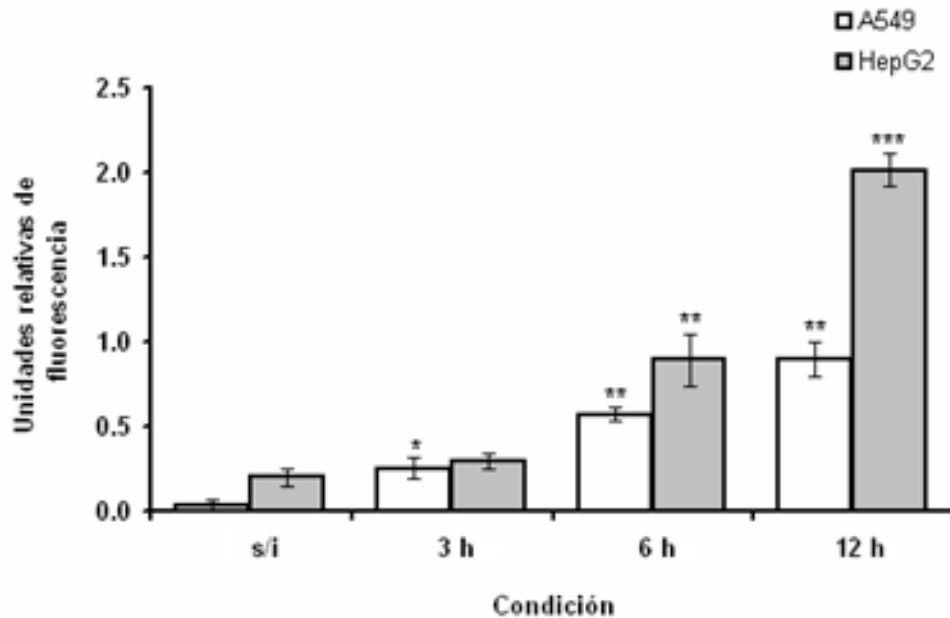


Figura 27. Efecto del BaP en la inducción de la actividad enzimática de CYP1A1 (EROD) en células A549 y HepG2. Cada barra representa la media \pm DE de tres experimentos por triplicado. ANOVA seguido por Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

Como se puede observar, el incremento en la actividad de 7-Etoxiresorufina O-desetilasa es dependiente del tiempo de exposición y es mayor en HepG2, lo que correlaciona con los datos de cuantificación de proteína, donde el mayor incremento en la cantidad de proteína se presenta en HepG2 después de ser inducida con BaP por 12 h.

Con estos resultados se observan la funcionalidad de la enzima en ambos sistemas celulares y diferencias tanto en actividad basal como inducida entre A549 y HepG2.

Determinación del perfil de formación de metabolitos del MTZ in vitro.

Determinación de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH intra y extracelular por HPLC.

Una vez concluidos los experimentos de inducción se determinaron las condiciones de inducción de los cultivos celulares.

Cultivos de A549 y HepG2 fueron tratados simultáneamente con MTZ y BaP. Se expusieron durante 12 h con de 2.5 μ M de BaP y dos concentraciones de MTZ (25 y 50 μ M) durante 24 h, durante las cuales se repuso el tratamiento de BaP.

Concluidas las 24 h de tratamiento se procesaron el paquete celular y el sobrenadante para su análisis con la finalidad de determinar la concentración intra y extracelular, respectivamente, de los compuestos de estudio.

La Figura 28 presenta un cromatograma representativo de la determinación intracelular de MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH.

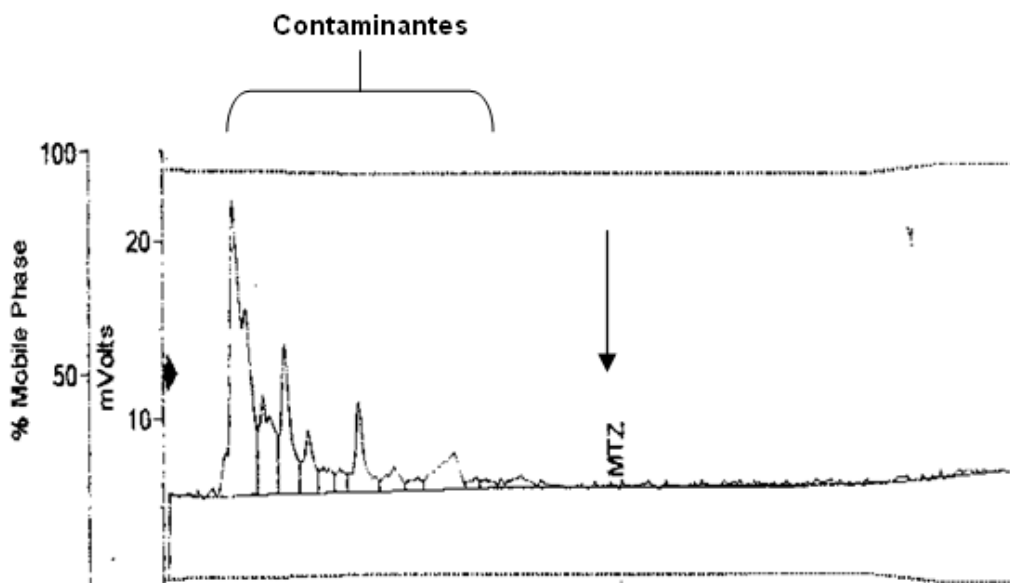


Figura 28. Determinación intracelular de MTZ y metabolitos en células HepG2 tratadas con 25 μ M de MTZ.

En este primer experimento no se logró detectar ninguno de los metabolitos esperados, ni se logró verificar la presencia intracelular del MTZ.

El análisis del sobrenadante de cultivo se analizó por separado, esperando encontrar diferencias. En la Figura 29 se representa el cromatograma obtenido del tratamiento del sobrenadante del mismo cultivo de HepG2 tratado con 25 μ M de MTZ.

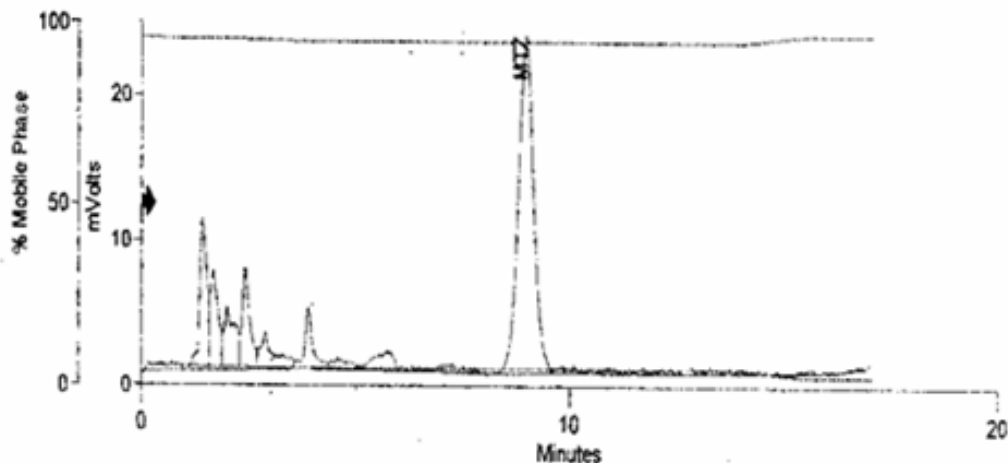


Figura 29. Determinación extracelular de MTZ y metabolitos en células HepG2 tratadas con 25 μ M de MTZ.

Como se observa, es posible determinar la presencia del MTZ de manera extracelular, no así de MTZ-OH y MTZCOOH; ya que no se logró detectar al MTZ intracelular, el manejo de la muestra se llevó a cabo con el homogenado del paquete celular y del sobrenadante de cultivo.

Además de los experimentos con HepG2, se realizaron ensayos de forma paralela con la línea A549 y con linfocitos humanos tratando de determinar la formación de MTZ-OH y MTZ-COOH.

Una vez concluidos todos los experimentos planteados, se obtuvieron siempre los mismos resultados que a continuación se ejemplifican con los resultados obtenidos con la línea celular HepG2.

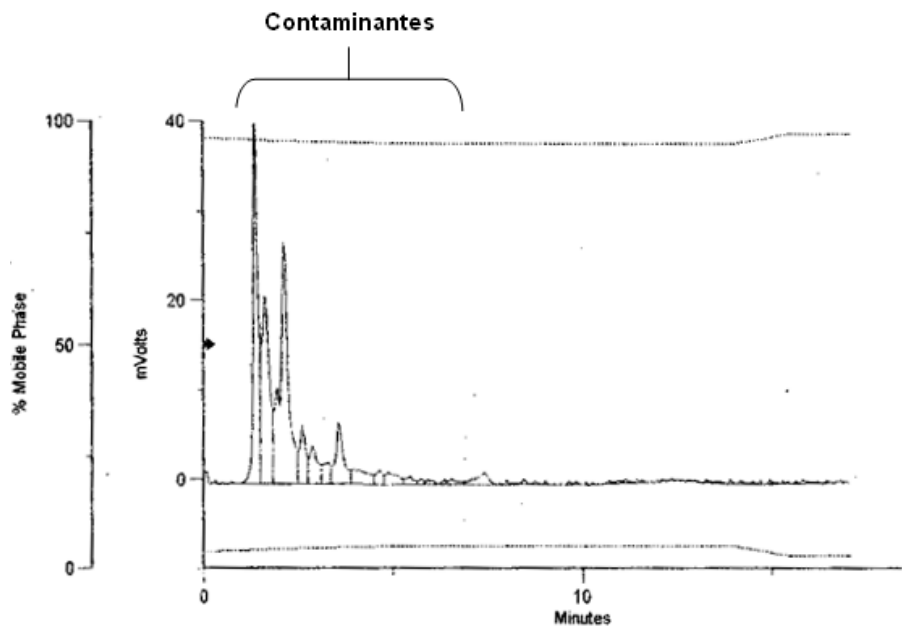


Figura 30. Análisis cromatográfico del homogenizado celular de un cultivo de células HepG2 sin tratamiento.

La Figura 30 muestra el cromatograma del homogenizado celular de un cultivo control de HepG2 que no fue tratado; se puede observar como el ruido es mucho mayor al observado en los experimentos de extracción con el mismo protocolo (Protocolo C).

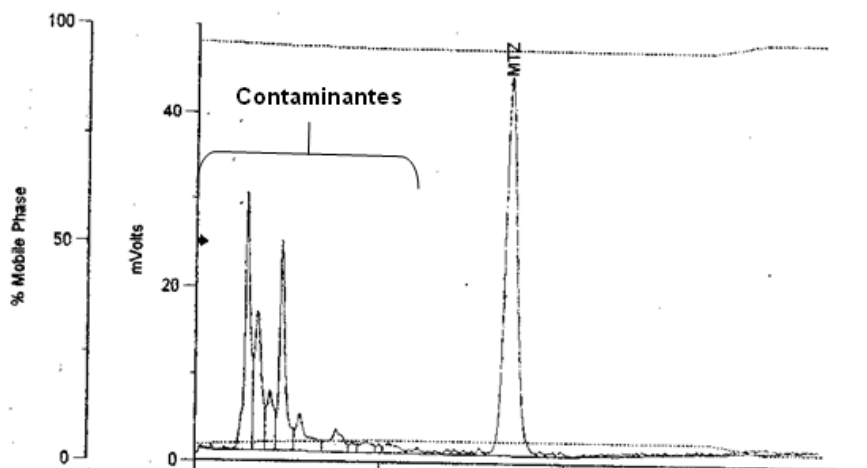


Figura 31. Análisis cromatográfico del homogenizado celular de un cultivo de células HepG2 tratadas con 50 μ M de MTZ.

Como se observa en la Figura 31, al llevar a cabo el análisis de cultivos de HepG2 tratados con MTZ, sí es posible verificar la presencia de este compuesto en el medio; pero no de sus dos metabolitos, pues las señales de ambos compuestos en el cromatograma son enmascaradas por la presencia de los contaminantes del medio y es prácticamente imposible establecer si alguno de los picos que se observan entre el tiempo cero y los cinco minutos, corresponden a los compuestos de interés.

10. Discusión

El Metronidazol (MTZ) es uno de los medicamentos más empleados en el mundo y uno de los fármacos de uso más frecuente en países en vías de desarrollo.

En el humano, el hígado es el principal órgano involucrado en la biotransformación del MTZ y el metabolismo oxidativo (fase I) forma sus dos principales metabolitos, el MTZ-OH y el MTZ-COOH. El metabolismo de fase I es realizado por diferentes complejos enzimáticos de citocromos P450 (CYP450). Existe evidencia que vincula este sistema enzimático con la biotransformación del MTZ; y en particular con CYP1A1.

Este trabajo planteó estudiar el impacto sobre el perfil metabólico *in vitro* del MTZ al inducir específicamente a CYP1A1, como un método indirecto de verificar la posible participación de esta isoforma en la formación *in vitro* de los dos principales metabolitos del MTZ.

Para ello se estableció el método analítico para la cuantificación de MTZ y dos de sus metabolitos. Se evaluaron distintos parámetros como la linealidad del método, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, así como la variación *intra* día e *inter* día que se relacionaran con la precisión del método.

Se encontró que el método es lineal para los tres compuestos hasta una concentración de 0.12 µg/mL, mientras que a concentraciones menores solo lo es para el MTZ y MTZ-COOH. Lo mismo sucede para otros parámetros evaluados donde, el coeficiente de variación se mantiene en valores dentro de los parámetros establecidos para definir la linealidad del método (C. V. ≤15%) hasta la concentración de 0.06 µg/mL, mientras que para el MTZ-OH el C.V. se mantiene dentro de los parámetros hasta 0.12 µg/mL.

Algo parecido sucede con los valores de los Límite de Detección (LD) y Cuantificación (LC), donde los valores son diferentes para los tres compuestos. Se determinó que el LC es mayor que el LD en los tres casos, lo que indica que aunque los compuestos de interés puedan ser detectados a concentraciones de 0.04 – 0.11 µg/mL, pero su cuantificación no será posible por debajo de un rango concentración de aproximadamente el doble (0.08 – 0.22 µg/mL) que corresponde a los valores del LC.

En cuanto a los valores límite antes descritos, podemos decir que son considerablemente mayores a los reportados, para este tipo de compuestos, que varían entre: 0.1-0.20 µg/mL [61] 0.05-0.15 µg/mL [62], y algunos otros del orden de concentraciones nanomolares [63], lo que sugiere una sensibilidad, relativamente, limitada.

En el caso particular del MTZ-OH se observa que los valores límites resultan mayores que para los otros dos compuestos; lo mismo que su linealidad, por lo que se puede decir que la determinación de este compuesto es menos sensible.

Por otro lado al calcular el error relativo para el valor promedio de la respuesta de cada compuesto y la exactitud, también se observa que para MTZ-OH ambos parámetros se encuentran fuera de rango (C.V.= 17.3% y E.R.= 21.2%). Estos datos refuerzan la idea de la falta de sensibilidad para la detección de este compuesto en particular.

Para cumplir con el objetivo principal del proyecto es necesario determinar la presencia de los dos principales metabolitos del Metronidazol (MTZ) en el medio en donde se lleva a cabo el ensayo *in vitro*.

El manejo de la muestra para su análisis cuantitativo es primordial para la obtención de los resultados deseados. El objetivo principal es que la muestra se presente en una forma adecuada para su introducción en el equipo. Cuando se trabaja con HPLC, donde la fase móvil es líquida; la muestra debe encontrarse en solución, preferentemente, disuelta en la fase móvil o algún líquido compatible.

Para ello consideramos establecer una técnica de extracción con solventes óptima; es decir, aquella que permitiera reducir la presencia de contaminantes del medio sin modificar drásticamente el pH de la muestra para mantener la integridad de la columna y las condiciones cromatográficas establecidas. Por esta razón, en este trabajo, se realizó una revisión de los varios métodos reportados en la literatura; para realizar la extracción de los compuestos de interés.

La mayoría de los métodos reportados hacen uso de una mezcla de solventes miscibles que inyectan en el equipo ya sea directamente, o después de evaporar y resuspender en la fase móvil, lo que, efectivamente, reduce las pérdidas del analito al minimizar los pasos en el manejo de la muestra, pero incrementan la cantidad de picos desconocidos [6, 46, 64, 65]

Dentro del manejo de una muestra proveniente de una matriz biológica compleja, como cultivos celulares, plasma, etc., uno de los pasos más críticos es la eliminación de proteínas. El empleo de solventes como éter, diclorometano, acetato de etilo, etanol o isopropanol en diferentes proporciones no ha resultado útil para realizar una extracción selectiva [48], mientras que el uso de Acetonitrilo como solvente de extracción y agente para la precipitación de proteínas se ha reportado exitoso [6, 48].

El uso de algunos otros agentes para precipitar proteínas como metanol resultan inefectivos y otros, como el ácido perclórico, generan grandes picos de interferencia [6, 46]. De los métodos empleados aquí este fenómeno se observa representado en el protocolo de extracción B, donde el uso de ácido perclórico incrementa la selectividad de extracción por otros compuestos sobre la del analito. Existen trabajos reportados donde se emplea HPLC para la determinación de imidazoles, entre ellos el MTZ [46, 47, 66], y en algunos otros el MTZ-OH [6] y se observa la aparición de picos similares; pero que bajo sus condiciones cromatográficas, no interfieren con la determinación de los compuestos que estudian. Poco se discute acerca de la naturaleza de estos compuestos; y en nuestro caso desconocemos la identidad de los compuestos extraídos simultáneamente con los compuestos bajo estudio. Solo podemos decir que se trata de compuestos de naturaleza polar, pues sus tiempos de retención en la columna (C18) son muy bajos, lo que desafortunadamente, bajo nuestras condiciones de trabajo, hace que coincidan con los de los metabolitos que buscábamos.

Considerando los resultados obtenidos determinamos que el protocolo C, era el mejor de los tres para llevar a cabo el tratamiento de las muestras; pues, a pesar de presentar el mismo problema con la extracción selectiva, la eficiencia de extracción de contaminantes fue la menor comparada con los otros dos.

Una vez que se validó el método analítico de detección y cuantificación y se eligió en protocolo de tratamiento de las muestras, procedimos a validar el sistema biológico para realizar los ensayos de biotransformación *in vitro*.

En este tipo de estudios es importante conocer cuantos y cuales son los metabolitos que se forman a partir de la biotransformación de un xenobiótico, para ello es necesario emplear sistemas metabólicos primarios *in vitro*. Estos sistemas incluyen modelos celulares intactos con capacidad metabólica (ej. Hepatocitos primarios, líneas celulares hepáticas, etc.) o fracciones subcelulares hepáticas como microsomas hepáticos o la fracción S9 [56]. Los sistemas *in vitro* considerados ideales son aquellos que emplean hepatocitos primarios o en cultivo, o bien líneas celulares que conserven capacidades metabólicas significativas [57]. En este trabajo se eligieron dos líneas celulares metabólicamente competentes (A549 y HepG2) para determinar el estatus de CYP1A1.

En el caso de A549, una línea proveniente de un adenocarcinoma pulmonar humano, se sabe que conserva la capacidad metabólica de las células pulmonares tipo II y expresa varios CYP450, entre ellos CYP1A1 y CYP1B1 que son inducibles por el consumo de cigarro [58].

Por otro lado el uso de HepG2 es más común, pues al tratarse de una línea celular hepática representa mejor al hígado humano *in vivo*. En base a la cantidad total de CYP450s que presenta y a estudios de biotransformación se estima que en esta línea conserva y expresa la mayoría de los CYP450s; que además conservan su funcionalidad [67].

Sin embargo, y a pesar de que se ha reportado la presencia e inducibilidad de CYP1A1 en ambas líneas celulares, en la literatura abundan los trabajos donde encuentran diferencias importantes. La evidencia es controversial; e incluso se ha señalado que la ausencia de la proteína o de su inducibilidad [52, 60] es

responsables de que, aproximadamente el 30% de los compuestos evaluados, sean erróneamente clasificados como no tóxicos [52, 59].

Por ello no nos sorprendió encontrar que la inducibilidad, ante la exposición a BaP que presentaron ambas líneas celulares, fuera mucho menor a la reportada por algunos autores para compuestos similares.

Una vez demostrada la expresión e inducibilidad de la proteína dependiente del tiempo de exposición al inductor, se correlacionó con el incremento en la actividad EROD; donde, en concordancia con el incremento en la cantidad de proteína, la mayor actividad enzimática se registró en HepG2 después de 12 h de exposición a 2.5 μ M de BaP.

La determinación del perfil de formación de metabolitos del MTZ *in vitro*, se llevó a cabo bajo varios enfoques que van desde el escalamiento de la densidad celular de trabajo hasta el manejo de la muestra.

Se inició con experimentos que se llevaron a cabo en placas de cultivo de 12 pozos manteniendo la densidad celular de 10^4 células /pozo . Al procesarlas para su análisis solo se logró verificar la presencia del MTZ en el medio, y se pensó que de no detectarse los metabolitos sería por la poca cantidad de células presentes. Por ello el experimento se escaló en tres etapas incrementando la densidad celular (1^6 , 5^6 y 10^6 células). Se consideró manejar por separado, el sobrenadante y el paquete celular, para determinar la concentración intra y extracelular de los compuestos de estudio. Al no lograrse verificar la presencia de los compuestos intracelularmente, se plantearon dos posibilidades; primero que el MTZ no había ingresado a las células y segundo que la cantidad internalizada no es detectable por el sistema, por lo que los análisis posteriores se llevaron a cabo sobre un homogenizado del medio y del paquete celular y no por separado como se hizo previamente.

Una vez concluidos todos los experimentos planteados se obtuvieron siempre los mismos resultados. Los contaminantes provenientes del medio ocasionan que la señal de MTZ-OH y MTZ-COOH se enmascare, ya que los tiempos de retención coinciden entre el tiempo cero y los cinco minutos. Debido a esto resulta prácticamente imposible establecer si alguno de los picos observados en el mismo periodo de tiempo, corresponden a los compuestos de interés y la consecuencia directa es que no se haya logrado detectar y cuantificar los metabolitos MTZ-OH y MTZ-COOH que esperábamos se formaran después de tratar las células con MTZ.

Consideramos que la suma de factores como las limitaciones en la extracción selectiva de los compuestos bajo estudio y que las líneas celulares empleadas presentan un fenotipo de inducibilidad baja contribuyeron a disminuir la sensibilidad del método analítico empleado. Todo lo anterior presenta limitantes que hacen que la metodología seguida no permita determinar si el CYP1A1 participa o no en la biotransformación *in vitro* del MTZ. Por ello es necesaria la búsqueda de sistemas de extracción y detección más sensibles y selectivos a los empleados en este trabajo.

11. Conclusiones

En este estudio se logró validar la técnica analítica de HPLC para la detección y cuantificación del MTZ, MTZ-OH y MTZ-COOH en solución usando estándares comerciales. Para ello, se consideraron los parámetros de linealidad, límite de cuantificación, límite de detección, estabilidad, precisión y exactitud.

Se estableció el método de extracción más adecuado a partir del medio en donde se lleva a cabo el ensayo *in vitro*. Se seleccionó el protocolo que consiste principalmente en la precipitación de proteínas con ácido acético, seguido de la extracción con acetonitrilo frío y cloruro de sodio, que permitió la separación de los compuestos bajo estudio en una fase orgánica. Se obtuvo un pico bien definido para el MTZ y que presentó una disminución considerable de los contaminantes de la muestra, en comparación a los otros dos métodos empleados. Sin embargo, tuvimos dificultad para la detección de los metabolitos, ya que encontramos la extracción simultánea de contaminantes que generaron picos que coinciden y se traslapan con los generados por la presencia de los metabolitos.

Se logró comprobar utilizando benzo(a)pireno la inducibilidad de la enzima CYP1A1 en las líneas celulares A549 y HepG2 utilizadas en este estudio. La evaluación de la actividad enzimática, en función del ensayo de 7-etoxiresorufina O-desetilasa, demostró la funcionalidad de la enzima CYP1A1. Sin embargo, no logramos cuantificar los metabolitos MTZ-OH y MTZ-COOH en las células tratadas con el MTZ, por lo que no fue posible correlacionar la formación de metabolitos del MTZ *in vitro* con la presencia, inducibilidad y funcionalidad de la enzima CYP1A1. Cabe señalar que aunque se demostró la inducción de la enzima, se encontró que es menor a la reportada en la literatura. Por lo que no descartamos que las líneas celulares empleadas presenten una disminución en el perfil de expresión de estas enzimas y que esto pudiera ser otro factor que influya en una disminución de la formación de los metabolitos y por lo tanto, no haya sido posible detectarlos.

En base a los hallazgos encontrados en el presente estudio, proponemos que la sensibilidad del método analítico empleado no es lo suficientemente sensible para detectar los metabolitos formados *in vitro* en el sistema celular. Una alternativa metodológica podría ser la utilización de la cromatografía de gases acoplada a masas, donde también se ha considerado la modificación química para hacer más estables al metronidazol y sus metabolitos.

12. Bibliografía

1. Glue P, Clement RP. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism- Basic concepts and methods of assessment. *Cell Mol Neurobiol.* 1999; 19(3):309-23.
2. Nebert DW, Russell DW, Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet.* 2002; 360(9340):1155-62.
3. Guengerich FP, Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact.* 1997; 106: 161-182.
4. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA, Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci.* 1999; 20(8): 342-9.
5. Bendesky A, Menendez D, Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? *Mutat Res,* 2002; 511(2):133-44.
6. Loft S. Metronidazole and antipyrine as probes for the study of foreign compound metabolism. *Pharmacol Toxicol,* 1990; 66 Suppl 6:1-31.
7. Loft S, Otton SV, Lennard MS, Tucker GT, Poulsen HE. Characterization of metronidazole metabolism by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol,* 1991; 41(8):1127-34.
8. Donato Ma. Teresa. ¿Qué es el Citocromo P-450 y cómo funciona? *Monografía Nº XIV. Citocromo P450.* Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. 2004; Cap.1: 29-62.
9. Schmidt, J.V. & Bradfield C.A., Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996, 12:55-89.
10. Gonzalez, F.J. & Fernandez-Salguero, P., The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos.* 1998, 26: 1194-1198.
11. Pelkonen, O. & Raunio, H., Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect,* 1997, 4:767-774.
12. Whitlock JP Jr. Induction of cytochrome P4501A1, *Annu Rev Pharmacol Toxicol,* 1999; 39:103–25.

13. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in environmental Toxicity and Cancer. *J Biol Chem.* 2004; 279(23):23847-50.
14. Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P. & Sutter, T.R., Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* 1996, 56: 2979-2984.
15. Murray, G.I., Taylor, M.C., McFadyen, M.C., McKay, J.A., Greenlee, W.F., Burke, M.D. & Melvin, W.T. Tumor-specific expression of cytochrome P-450 CYP1B1. *Cancer Res.* 1997, 57: 3026-3031.
16. Sotaniemi, E.A., Rautio, A., Backstrom, M., Arvela, P. & Pelkonen, O. , CYP3A4 and CYP2A6 activities marked by the metabolism of lignocaine and coumarin in patients with liver and kidney diseases and epileptic patients. *Br J Clin Pharmacol.* 1995, 39: 71-6.
17. Miyamoto, M., Umetsu, Y., Dosaka-Akita, H., Sawamura, Y., Yokota, J., Kunitoh, H., Nemoto, N., Sato, K., Ariyoshi, N. & Kamataki, T. , CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 261: 658-660.
18. Gu, J., Su, T., Chen, Y., Zhang, Q.Y. & Ding, X. , Expression of biotransformation enzymes in human fetal olfactory mucosa: potential roles in developmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000, 165: 158-162.
19. Spatzenegger, M., Liu, H., Wang, Q., Debarber, A., Koop, DR. & Halpert, J.R. , Analysis of differential substrate selectivities of CYP2B6 and CYP2E1 by site-directed mutagenesis and molecular modeling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 304: 477-487.
20. J. Goldstein, J.A. , Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol.* 2001, 52: 349-355.
21. Miranda E, Ostrosky Wegman P. Bases científicas de las respuestas idiosincrásicas en la terapéutica. El papel del gen CYP2D6. *Acta Med Grupo Ángeles* 2004; 2(1):59-63.
22. Skoda RC, Gonzalez FJ, Demierre A, Meyer UA. Two mutant alleles of the human cytochrome P-450db1 gene(P450c2D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5240-5243.

23. Tanaka, E., Terada, M. & Misawa, S., Cytochrome P-450 2E1: its clinical and toxicological role. *J Clin Pharm Ther.* 2000, 25: 165-175.
24. Thummel, K.E. & Wilkinson, G.R., In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998, 38: 389-430.
25. Krusekopf, S., Roots, I. & Kleeberg, U., Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43. *Eur J Pharmacol.* 2003, 466: 7-12.
26. Vecchini F, Lenoir-Viale MC, Cathelineau C, Magdalou J, Bernard BB, Shroot B. Presence of a retinoid responsive element in the promoter region of the human cytochrome P4501A1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* , 1994; 201, 1205–12012.
27. Denison M S, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003; 43:309–34.
28. Delescluse C, Lemaire G, de Sousa G, Rahmani R. Is CYP1A1 induction always relates to AHR signaling pathway?, *Toxicology*, 2000;153(1-3):73-82.
29. Heath-Pagliuso S, Rogers WJ, Tullis K, Seidel SD, Ceniñ PH, et al., Activation of the Ah receptor by tryptophan; and tryptophan metabolites. *Biochemistry*, 1998; 37:11508–15.
30. Kafafi SA, Afeefy HY, Said HK, Kafafi AG., Relationship between aryl hydrocarbon receptor binding, induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and 7- ethoxyresorufin o-deethylase enzymes and toxic activities of aromatic xenobiotics in animals.Anewmodel. *Chem. Res. Toxicol*, 1993; 6:328–34.
31. Ciolino HP, Daschner PJ, Wang TTY, Yeh GC., Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* , 1998; 56:197–206.
32. MacDonald CJ, Ciolino HP, Yeh GC., Dibenzoylmethane modulates aryl hydrocarbon receptor function and expresión of cytochromes P50 1A1, 1A2, and 1B1. *Cancer Res.* 2001; 613919–24.

33. Gradelet S, Astorg P, Leclerc J, Chevalier J, Vernevaut M-F, Siess M-H., Effects of canthaxanthin, astaxanthin, lycopene and lutein on liver xenobiotic metabolizing enzymes in the rat. *Xenobiotica* , 1996; 6:49–63
34. Bjeldanes LF, Kim J-L, Grose KR, Bartholomew JC, Bradfield CA., Aromatic hydrocarbon responsiveness receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop-dioxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88:9543–47.
35. Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC., Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J.* , 1999; 340:715– 22.
36. Ciolino HP, Wang TTY, Yeh GC., Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Res.*, 1998; 58:2754–60.
37. Canivenc-Lavier MC, Vernevaut MF, Totis M, Siess MH, Magdalou J, Suschetet M., Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug- metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology*, 1996; 114:19–27.
38. Daujat M, Peryt B, Lesca P, Fourtanier G, Domergue J, Maurel P., Omeprazole, an inducer of human CYP1A1 and 1A2, is not a ligand for the Ah receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1992; 188:820– 25.
39. Aix L, Rey-Grobellet X, Larrieu G, Lesca P, Galtier P., Thiabendazole is an inducer of cytochrome P4501a1 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1994;202:1483–89.
40. Ledirac N, Delescuse C, de Sousa G, Pralavorio M, Lesca P, et al., Carbaryl induces CYP1A1 gene expression in HepG2 and HaCaT cells but is not a ligand of the human hepatic Ah receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997; 44:177–82.
41. Fontaine F, Delescuse C, de Sousa G, Lesca P, Rahmani R., Cytochrome 1A1 induction by primaquine in human hepatocytes and HepG2 cells: absence of binding to the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem. Pharmacol.* 1988;57:255–62.

42. Bendesky A, Menendez D. Metronidazol: una visión integral. Monografía *Rev Fac Med UNAM*, 2001; 44 (6): 255-259.
43. Drug information for the Health Care Professional. USP DI, Vol. I, 20 edición; Micromedex, 2000.
44. Dobiás L, Cerná M, Rössner P, et al. Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mut Res*, 1994; 317: 177-194.
45. Menendez D, Bendesky A, Rojas E, Salamanca F, Ostrosky-Wegman P. Role of P53 functionality in the genotoxicity of metronidazole and its hydroxyl metabolite, *Mutat Res*, 2002;501(1-2):57-67.
46. Loft S, Dossing M, Poulsen HE, Donne J, Olesen K-L, Simonsen K, Andreasen PB, Influence of dose and route of administration on disposition of metronidazole and its major metabolites, *Eur J Clin Pharmacol* , 1986; 30, 467:473.
47. Jessa M, Barrett D, Shaw P, Spiller R, Rapid and selective high-performance liquid chromatographic method for the determination of metronidazole and its active metabolite in human plasma, saliva and gastric juice, *J Chrom B*, 1996; 374-379.
48. Jarillo M. Respuestas individuales en el metabolismo del Metronidazol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM 2004.
49. Jacques M, Lambert V, Todazo A, Kremers P, Mitogen-activated lymphocytes: a good model for characterising lung CYP1A1 inducibility, *Eur J Epidemiol*, 1997; 13 (2): 177-83.
50. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. México, 7/05/1999. [Fecha de consulta: 01-08-2005], Formato html, Disponible en Internet:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/177ssa18.html>.
51. Westerink W, Schoonen W, Cytochrome P450 levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells, *Toxicology in Vitro*. 2007 Dec; 21(8):1581-91.

52. Vakharia d, liu N, Pause R, Fasco M, Bessette E, Zhang QY, Kaminsky L, Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 in human HepG2 cells, *Drug Met and Disp.* 2001 Jul;29(7):999-1006.
53. Bapiro T., Andersson T., Otter C, Hasler J., Masimirembwa C., Cytochrome P450 1A1/2 induction by antiparasitic drugs: dose-dependent increase in ethoxyresorufin O-deethylase activity and mRNA caused by quinine, primaquine and albendazole in HepG2 cells. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002 Nov; 58(8):537-42.
54. Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL., Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism, *Exp Cell Res.* 1998 ;243(2):359-66.
55. Hukkanen J, Lassila A, Päivärinta K, Valanne S, Sarpo S, Hakkola J, Pelkonen O, Raunio H., Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line, *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;22(3):360-6.
56. Guidance for Industry, Drug Metabolism/Drug Interaction Studies in the Drug Development Process: Studies *In Vitro*, Food and Drug Administration, April 1997. [Fecha de consulta: 15-08-2005], Formato PDF/Adobe Acrobat, Disponible en Internet: <http://www.fda.gov/cder/Guidance/clin3.pdf>
57. Gunaratna C. Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery: a primer for bioanalytical chemists, part I. *Curr Sep*, 2000; 19:17-23.
58. Roberts E, Johnson K, Harper P, Okey A, Characterization of the Ah receptor mediating aryl hydrocarbon hydroxylase induction in the human liver cell line Hep G2, *Arch Biochem Biophys.* 1990 ; 276(2):442-50.
59. Rodríguez-Antona C, Donato M, Boobis A, Edwards R, Watts P, Castell J, Gómez-Lechón M, Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells, *Xenobiotica.* 2002;32(6):505-20.

60. Iwanari M, Nakajima M, Kizu R, Hayakawa K, Yokoi T, Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences, *Arch Toxicol.* 2002 ;76(5-6):287-98. Epub 2002 Apr 10.
61. Jessa M, Barrett D, Shaw P, Spiller R., Rapid and selective high-performance liquid chromatographic method for the determination of metronidazole and its active metabolite in human plasma, saliva and gastric juice. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996;677(2):374-9.
62. Lanbeck, K; Lindström, B. Determination of metronidazole and tinidazole in plasma and feces by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1979 1;162(1):117–121.
63. Loft S, Otton S, Lennard M, Tucker G, Poulsen H, Characterization of metronidazole metabolism by human liver microsomes, *Biochem Pharmacol.* 1991 15;41(8):1127-34.
64. Dibson R, Lattanzio L, McGee H, Optimized liquid-chromatographic determination of metronidazole and its metabolites in plasma, *Clinical Chemistry*, 1984;30: 784-787.
65. Wibawa J, Shaw P, Barrett D, Quantification of metronidazole in small-volume biological samples using narrow-bore high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;761(2):213-9.
66. Nilsson I, Ursing B, Nilsson O, Liquid chromatographic assay for metronidazole and tinidazole: pharmacokinetic and metabolic studies in human subjects, *Antimicrob Agents Chemother.* 1981; 19(5): 754–760.
1. Rodríguez-Antona C, Donato M, Boobis A, Edwards R, Watts P, Castell J, Gómez-Lechón M, Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells, *Xenobiotica.* 2002; 32(6):505-20.