

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**EFFECTOS GENOTÓXICOS DEL
METRONIDAZOL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA)

P R E S E N T A:

Q.F.B. SANDRA PATRICIA GAMIÑO
GUTIÉRREZ



Tutor: DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET

MÉXICO, D. F.

Marzo 2005.

34677



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recopilacional.

NOMBRE: Sandra Patricia
Gamiño Gutiérrez

FECHA: 07-Marzo-05

FIRMA: 

A Fidel,

Daniel y Marifer.

EFFECTOS GENOTÓXICOS DEL METRONIDAZOL

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dra. Patricia Ostrosky Shejet	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Jorge Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM
Dra. Martha Menjívar	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Daniel Menéndez, Dra. Ana María Salazar y QFB Monserrat Sordo en los experimentos de evaluación de la genotoxicidad, proliferación celular y determinación de proteínas por Western-Blot.

Se reconoce la asesoría de la Dra. Ana María Salazar en la realización y corrección de la tesis.

El proyecto fue apoyado por donativos del PAPIIT-DGAPA y del CONACYT. Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por el CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Jorge Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto Nacional de Cancerología
Suplente	Dr. Alejandro García Carrancá	Instituto Nacional de Cancerología
Suplente	Dr. Marco A. Cerbón	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haberme encaminado hacia la felicidad con su confianza y apoyo, pero sobretodo por darme la libertad de conquistarla yo sola.

A mis hermanos: Adi, Pepe, Grisel, Nena, Daniel, Miguel y Mary, porque en todos ustedes he encontrado cariño, comprensión y compañía.

A mi esposo Fidel, por ser mi amigo, mi cómplice, mi motor, mi fuerza, mi inspiración y testigo de mi existencia.

A mis hijos Daniel y María Fernanda, por iluminar mi vida con su sonrisa y por su comprensión de niños en los momentos difíciles que les hice pasar al dejarlos sin mamá.

A la Dra. Patricia Ostrosky, por sus enseñanzas, confianza y comprensión, pero sobretodo por su apoyo en todo momento y cuando más lo necesité.

A los miembros del Jurado: Dr. Jorge Vázquez Ramos, Dra. Yolanda López Vidal, Dra. Marcela Lizano Soberón, Dr. Alejandro García Carrancá y Dr. Marco A. Cerbón, por sus sugerencias y correcciones al presente trabajo.

A la Dra. Ana María Salazar, por ayudarme a salir a flote, por llevarme de su mano para regresar a los senderos de la ciencia, por su tiempo invertido en la corrección de mi trabajo, por su amistad y confianza.

A la QFB Monserrat Sordo, por aceptar ser mi comadre en esos momentos de metafases e interfases interminables, siempre regalando una buena charla y una inigualable amistad.

A Elías, por su ayuda e intento de introducirme en el campo de la estadística, por su apoyo en el análisis estadístico de los datos.

A mis compañeros de laboratorio: Adriana, Carmen, Francisco, Marià, MariCarmen, Gaby, Tzutzuy, Mahara, Emilio, Luis, Silvia y Daniel por la alegría que me dieron en los días de trabajo durante los dos años de mi estancia por el DF.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	<i>i</i>
Abreviaturas	<i>ii</i>
1. Introducción	1
1.1 El sistema inmune	1
1.2 El linfocito	2
1.3 La proliferación del linfocito como un biomarcador	3
1.4 El ciclo celular	7
1.5 La proteína P53	9
1.5.1 Estructura de <i>TP53</i> y su proteína	9
1.5.2 Funciones de la proteína P53	12
1.5.2.1 P53 en la detención del ciclo	14
1.5.2.2 P53 y su intervención en la apoptosis	14
1.6 Marcadores de Genotoxicidad	17
1.6.1 Evaluación de la frecuencia de micronúcleos	17
1.7 El Metronidazol	19
1.7.1 Mecanismo de acción	19
1.7.2 Farmacocinética	20
1.7.2.1 Absorción	20
1.7.2.2 Distribución	21
1.7.2.3 Metabolismo	22
1.7.2.4 Excreción	22
1.7.3 Farmacodinamia	23
1.7.4 Toxicidad	23
2. Hipótesis	25
3. Objetivo	25
4. Material y Métodos	26
4.1 Cultivo de linfocitos para evaluar la CPC y el IM	26
4.2 Cultivo de linfocitos para evaluar micronúcleos	27
4.3 Cultivo de linfocitos para evaluar la expresión de P53	28
4.4 Determinación de proteínas por Western-Blot	29
4.5 Método estadístico	29
5. Resultados	30
6. Discusión y Conclusiones	39
7. Apéndice de tablas	44
8. Referencias	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cromosomas de linfocitos humanos en metafase.	6
Figura 2. Diagrama de las fases del ciclo celular en eucariotes.	7
Figura 3. Dominios funcionales de la proteína P53.	12
Figura 4. Funciones de la proteína P53.	16
Figura 5. Células binucleadas con micronúcleos.	18
Figura 6. Imagen de linfocitos humanos cultivados con Cyt-B.	28
Figura 7. IM en cultivos de linfocitos de 5 donadores.	32
Figura 8. CPC en cultivos de linfocitos de 5 donadores.	33
Figura 9. IR en cultivos de linfocitos.	33
Figura 10. CPN en cultivos de linfocitos con Cyt-B.	34
Figura 11. IN en cultivos de linfocitos de 5 donadores.	34
Figura 12. Correlación entre el IR y el IN de cultivos de linfocitos.	35
Figura 13. Evaluación de micronúcleos en cultivos de linfocitos.	36
Figura 14. Patrón de respuestas de la proteína P53.	37
Figura 15. Análisis densitométrico de la expresión de P53	37
Figura 16. Comparación de resultados.	38

RESUMEN.

El metronidazol (MTZ) es uno de los agentes antiparasitarios y antibacterianos más usados en el mundo. No obstante, su potencial genotóxico y carcinogénico para el ser humano es controversial. Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que el tratamiento con MTZ al mismo tiempo que incrementa la proliferación celular produce daño al ADN en linfocitos de individuos tratados, además de ser evidente una respuesta individual a dichos efectos. Con el fin de entender la existencia de diferencias en la sensibilidad al MTZ, evaluamos en cultivos de linfocitos de cinco donadores sanos, la proliferación celular, la inducción de MN y la expresión de la proteína P53, dado el papel que tiene esta proteína supresora de tumores como “guardián del genoma”. Nuestros resultados indican que el MTZ fue capaz de incrementar la proliferación celular en dos donadores, produjo micronúcleos en otro donador cuya proliferación no se modificó. Encontramos diferencias en el patrón de respuesta de la proteína P53, en tres donadores se observó un incremento en la expresión de la proteína con relación a la dosis y en los otros dos no hubo inducción. Finalmente en un donador, el MTZ no indujo cambios significativos en ninguno de los parámetros evaluados. En este estudio *in vitro* se encontraron diferencias individuales en los linfocitos humanos ante el tratamiento con MTZ, lo que demuestra que esta respuesta no está dada por factores extrínsecos sino más bien por factores asociados a las características genéticas individuales.

Es importante analizar el papel que pudiera tener la susceptibilidad individual a los efectos genotóxicos del MTZ en el posible desarrollo de cáncer. Mientras tanto dado que su empleo implica un posible riesgo, el uso de este medicamento debe ser más restringido y vigilado, además la búsqueda de fármacos de igual o mayor eficacia pero menos riesgosos sería una medida recomendable.

ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
PHA	Fitohemaglutinina
BrdU	Bromodesoxiuridina
TP53	Gen humano de la proteína P53
P53	Proteína humana P53
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ICH	Intercambios de Cromátides Hermanas
AC	Aberraciones Cromosómicas
MN	Micronúcleos
Cyt-B	Citocalasina B
MTZ	Metronidazol
μM	micromolar
CPC	Cinética de Proliferación Celular
IM	Índice mitótico
IR	Índice de replicación
CPN	Cinética de Proliferación Nuclear
IN	Índice nuclear

1. INTRODUCCION.

El estudio de la exposición a fármacos, sus efectos, mecanismos de acción y las respuestas que éstos provocan en el organismo es un área de amplia investigación cuya información es necesaria para la evaluación del riesgo a dichas exposiciones. Independientemente de los diseños experimentales usados en estos estudios, la variabilidad individual ha sido un fenómeno constante en todos ellos. Esta información ha generado disciplinas como la farmacogenética que estudia los efectos de la variabilidad genética en la respuesta del organismo a fármacos.

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

1.1 El sistema inmune.

El sistema inmune es responsable de las respuestas contra microorganismos patógenos y agentes extraños a él, llamados antígenos. Su ausencia o deficiencia por enfermedades genéticas o adquiridas pone de manifiesto su relevancia en la protección contra estos antígenos. Este sistema

está constituido por órganos y tejidos como son el bazo, nódulos linfáticos, timo, médula ósea y sangre.

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

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

1.2 El linfocito.

El sistema inmune consiste de aproximadamente 2×10^{12} linfocitos que circulan libremente en la sangre o permanecen en espacios estructuralmente específicos de ciertos órganos tales como el timo, médula ósea, bazo, nodos linfáticos, etc. En términos de masa celular, los linfocitos son equivalentes al hígado o el sistema nervioso central ocupando un volumen similar en el organismo.

Los linfocitos periféricos comprenden dos principales tipos celulares, dependiendo de su origen y función, llamados células T y células B. El número de linfocitos por unidad de volumen de sangre cambia con la edad y estado de salud, con un valor máximo en los recién nacidos y niños. Normalmente,

alrededor del 55 al 80 % de los linfocitos son del tipo T y del 10 al 15% son tipo B. La mayoría de los linfocitos T dejan la sangre, pasan a través de diferentes órganos y vuelven a entrar a la sangre periférica. En promedio del circuito a través de la sangre dura 3 minutos, así que los linfocitos expuestos a un xenobiótico en cualquier parte del cuerpo pueden eventualmente encontrarse en la sangre periférica (Carrano y Natarajan, 1988).

La inducción de proliferación de los linfocitos por mitógenos es un proceso que consta de múltiples pasos. En las células T los mitógenos inducen primero la transcripción de los receptores de interleucina-2 convirtiéndolas en células capaces de interactuar con otras células como los monocitos. Sólo después de estas interacciones las células T responden a la interleucina-1 y son inducidas a sintetizar interleucina-2, que promueve la síntesis de ADN y la división celular (Chatila *et al.*, 1987).

1.3 La proliferación del linfocito como un biomarcador.

El origen de muchas enfermedades tales como el cáncer, enfermedades autoinmunes o defectos al nacimiento en los hombres esta relacionado con la exposición a sustancias tóxicas (Brusick, 1987; Zelikoff *et al.*, 1994). En estudios de poblaciones expuestas, así como en la investigación experimental, se han empleado diferentes estrategias en distintos sistemas de prueba para identificar los cambios bioquímicos y celulares en los sistemas biológicos debidos a la exposición; a estos cambios se les conoce como biomarcadores.

La evaluación de estos biomarcadores en poblaciones humanas, requiere de técnicas no invasivas, por eso son investigados principalmente en tejidos o compartimentos sustitutos tales como orina o sangre y no necesariamente en el tejido u órgano blanco.

Desde la observación hecha por Moorhead *et al.* (1960) de que los linfocitos de sangre periférica podrían ser estimulados con fitohemaglutinina

(PHA), y por la relativa facilidad con que un gran número de células pueden ser obtenidas y cultivadas, este sistema es una valiosa herramienta para los estudios citogenéticos y ha sido extensivamente empleada en los monitoreos biológicos (WHO, 1985). La estimulación de los linfocitos *in vitro* es morfológica y bioquímicamente similar a la respuesta inducida por una estimulación antigénica *in vivo*. Los inmunólogos también utilizan este sistema para monitorear la competencia inmunológica de los linfocitos de pacientes con varios desórdenes inmunológicos y de aquellos con terapias inmunodepresoras (Sharma, 1981), así como para explorar las interacciones de agentes tóxicos con el sistema inmune (Munson *et al.*, 1982; Dean *et al.*, 1985; Orson *et al.*, 1989; Moller *et al.*, 1989; McCarthy *et al.*, 1990; Rodl *et al.*, 1990).

Los cultivos de linfocitos pueden ser iniciados usando la sangre completa o leucocitos aislados mediante un gradiente de Ficoll (Boyum, 1968). La muestra de sangre es tomada y heparinizada en condiciones estériles. Las ventajas de usar la sangre completa para los cultivos es que las condiciones fisiológicas y bioquímicas del tejido son preservadas, además de que no es necesaria la suplementación con suero en el medio de cultivo (Mutchinick *et al.*, 1982; Ostrosky-Wegman *et al.*, 1986) y se evitan manipulaciones innecesarias pues la sangre es directamente puesta en el tubo de cultivo.

La respuesta proliferativa puede ser evaluada por la incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) o bromodesoxiuridina (BrdU), evaluándose en el primer caso con autoradiografía o un contador de centelleo y en el segundo por inmunotinción o una tinción diferencial de las cromátidas hermanas. Latt (1973) observó que el marcado del ADN por la adición de la BrdU a los cultivos, apagaba la fluorescencia del fluorocromo Hoescht 33258, permitiendo la diferenciación de las cromátidas hermanas en los cromosomas metafásicos. Debido a la naturaleza semiconservativa de la replicación del ADN, las células que se han dividido por primera vez en presencia del análogo de timina tendrán

cromátidas conteniendo ADN con una de sus dos cadenas sustituida con BrdU (unifilarmente), la cual fluorescerá más intensamente que aquellas que tengan ADN con ambas cadenas sustituidas (bifilarmente). Esta observación representa la base para la tinción diferencial. Así, después de un ciclo de replicación en presencia de BrdU, los cromosomas metafásicos fluorescerán uniformemente (M1). La segunda generación de cromosomas metafásicos (M2) tienen solo una cromátida conteniendo ADN bifilarmente sustituido con BrdU. La tercera generación de células en metafase (M3) contendrá cromosomas con ADN unifilar y bifilarmente sustituidos. En ciclos de replicación posteriores, se incrementa la proporción del número de cromosomas que tienen ADN bifilarmente sustituido en ambas cromátidas. En 1974, Perry y Wolff introdujeron una técnica de tinción de Giemsa, la cual, a diferencia de los métodos fluorescentes, permite que las preparaciones sean permanentes. Ellos combinaron el Hoeschst 33258, tiñendo los cromosomas sustituidos con BrdU con Giemsa, sin embargo esta técnica es más dependiente de los niveles de BrdU incorporados para producir una tinción que permita una diferenciación óptima de las cromátidas, por lo que la concentración de BrdU añadida al cultivo se debe mantener constante. En el caso de esta técnica, una primera división o M1 presenta todos los cromosomas con ambas cromátidas homogéneamente oscuras mientras que en una M2 todos los cromosomas tienen una cromátida oscura y la otra clara (cromosomas arlequín); finalmente, una M3 muestra ambos, tanto cromosomas arlequín como cromosomas con ambas cromátidas claras (Figura 1).



Figura 1. Fotos de cromosomas de linfocitos humanos en metafase, tratados con bromodesoxiuridina en donde se puede diferenciar una primera división celular o M1 (a), una segunda división o M2 (b) y una tercera división celular o M3 (c).

Así, con esta técnica es posible cuantificar la proporción de células que están en metafase (índice mitótico) y la proporción de células que se han dividido una, dos o más veces en un cultivo. La correlación de estos parámetros permite la caracterización de la proliferación celular (Gonsebatt *et al.*, 1994).

1.4 El ciclo celular.

Se conoce como ciclo celular a los procesos que ocurren desde la formación de una célula hasta su propia división, en dos células progenitoras que tendrán la misma información genética que la original (Nasmyth, 1996). El estudio del ciclo celular permitió establecer dos etapas, una en la que la célula se divide originando las dos células descendientes, caracterizada por la división del núcleo o mitosis (Fase M) y la división del citoplasma o citocinesis; y otra etapa en la que la célula no tiene cambios morfológicos aparentes y comprende el espacio entre dos divisiones celulares sucesivas, denominada interfase, que comprende tres fases que son G1, S y G2 (Figura 2). La fase S es el periodo de síntesis del ADN, durante el cual a partir de ambas cadenas se origina una segunda copia del genoma. Los periodos G1 y G2 son espacios temporales de preparación previos a la duplicación del ADN y a la división celular respectivamente (Salazar, 1998).

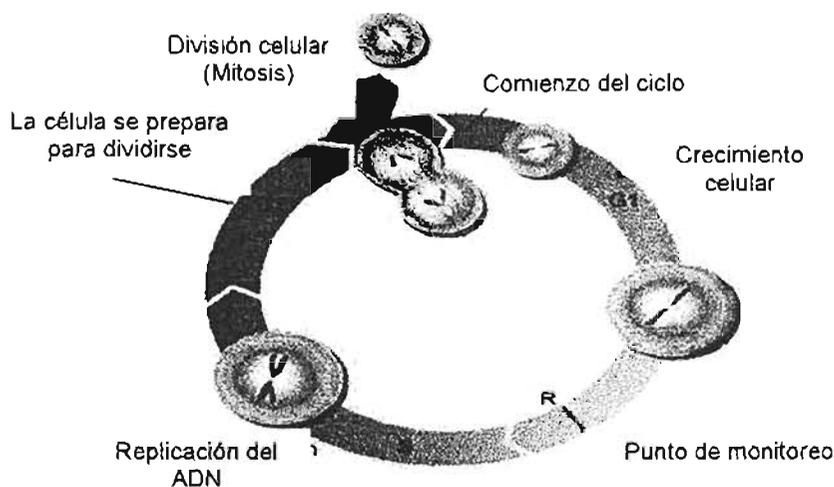


Figura 2. Diagrama de las fases del ciclo celular en organismos eucariotes. El ciclo celular consiste de cuatro fases, en la fase G1, la célula crece en tamaño y verifica el estado de su sistema interno. El punto R marca el lugar donde la restricción del ciclo puede ocurrir, para corregir el daño o bien iniciar el proceso de apoptosis. La siguiente fase es de síntesis llamada fase S, aquí la célula replica y almacena el ADN en los cromosomas. Después hay un periodo de preparación para la división llamado fase G2. Entonces la célula se divide (fase M, mitosis). Las dos nuevas células hijas vuelven a entrar a su propio ciclo celular o se quedan en lo que también se conoce como G0 que es un estado de quiescencia, a partir del cual puede regresar a comenzar el ciclo en G1. Tomado y modificado de www.headstartinbiology.com

Cada una de estas etapas o eventos representa sólo un momento en el cual ocurren cambios moleculares en una molécula reguladora. Sin embargo, existen sobrepuestos a estos eventos sitios de monitoreo ("checkpoints") que evalúan y aseguran que todo el proceso se lleve a cabo sin errores. Cada uno de estos puntos de monitoreo representa un mecanismo de control que hace que la iniciación de uno de los eventos del ciclo celular sea dependiente del evento anterior. La pérdida del control del ciclo celular puede desencadenar ya sea la muerte de la célula o bien la proliferación descontrolada de las células, lo cual es propio del estado canceroso. En la actualidad se acepta que una de las características básicas de las células cancerosas es la pérdida de la capacidad de controlar su crecimiento y división, las células malignas se dividen cuando y donde no deberían de hacerlo, siendo el resultado de su proliferación desorganizada la formación de un tumor (Evan y Voudsen, 2001).

Se plantea que tres categorías de genes son responsables de los procesos que controlan el crecimiento normal de la célula, la localización y la muerte celular: 1) proto-oncogenes, cuyos productos normales son componentes de las vías de transducción de señales que regulan la proliferación y que, en su forma mutada, se convierten en oncogenes dominantes; 2) genes supresores de tumores, que actúan normalmente inhibiendo el crecimiento y su pérdida de función en el cáncer conduce al descontrol de la progresión del ciclo celular y de la adhesión celular; y 3) enzimas de reparación del ADN, en las cuales las mutaciones propician la inestabilidad genética (Vogelstein y Kinzler, 2004).

Una de las moléculas reguladoras más importantes que participa en los puntos de monitoreo del ciclo celular es la proteína supresora de tumores P53, conocida también como "guardián del genoma" por su función de resguardar la integridad del material genómico (Lane, 1992).

1.5 La proteína P53.

Los sistemas de vigilancia en células de mamífero están conformados a diferentes niveles por un gran número de proteínas reguladoras; uno de los elementos más importantes en el control de estos sistemas y de la regulación de las señales es la proteína supresora de tumores, P53. Esta proteína es el sensor universal de estrés que regula la transcripción de genes requeridos para llevar a cabo un arresto en el ciclo celular, la reparación del daño en el ADN o bien activar mecanismos de apoptosis (Semenza y Weasel, 1997).

La proteína P53 en las células no expuestas a agresiones se encuentra en un estado latente y no-funcional. En condiciones de agresión o daño celular, P53 se activa, incrementándose sus niveles, principalmente a través de aumentar la vida media de la proteína. Así, P53 genera una respuesta que conduce a la detención del ciclo celular y a la reparación del posible daño, aunque si el daño es demasiado y no puede ser reparado, P53 induce la entrada de la célula a apoptosis (Rotter *et al.*, 1994; Oren, 1994). De este modo, P53 disminuye la probabilidad de que se generen clones celulares que lleven defectos genéticos como mutaciones, deleciones e inversiones (Lane, 1992).

1.5.1 Estructura del gen *TP53* y su proteína.

En los humanos el gen *TP53* (Wain *et al.*, 2004) se localiza en el brazo corto del cromosoma 17, específicamente en la región p13.1. Tiene una extensión de aproximadamente 20 kb, en donde se localizan 11 exones y 10 intrones. Los exones 2 al 11, comprenden la región que codifica para la proteína, por lo que la región promotora de transcripción se localiza en el primer exon e intron (Vogelstein *et al.*, 2002). Este gen ha sido conservado, en particular en 5 regiones conocidas como los dominios del I al V (Soussi *et al.*, 1990). El avance

en los estudios sobre este gen, ha permitido conocer que estos dominios son primordiales para las funciones de P53 (Soussi y May, 1996).

En el extremo 5' del gen se han identificado dos promotores. El primero de ellos, llamado p1 se localiza secuencia arriba del primer exon y es el responsable de la transcripción de las principales especies de ARN mensajero (ARNm), (Reisman y Rotter, 1989), mientras que al segundo promotor o p2, localizado justo dentro del primer intrón de *TP53*, se le ha relacionado con la diferenciación celular (Reisman y Rotter, 1989; Reisman *et al.*, 1996).

El gen *TP53* se ha dividido funcional y estructuralmente en tres diferentes regiones o dominios (Unger *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994) (Figura 3).

Hacia el extremo amino terminal (aminoácidos del 1 al 99) está contenido el dominio de activación de la Transcripción, el cual interactúa con la maquinaria basal de transcripción para regular la actividad de la proteína P53 como factor de transcripción (Fields y Jang, 1990). Esta función es regulada negativamente por la proteína E1B del adenovirus y la proteína MDM2 a través de la interacción con los aminoácidos L22 y W23 de P53 (Stewart y Pietsenpol, 2001). El extremo amino-terminal presenta la región rica en prolinas entre los aminoácidos 64 al 92, el que es necesario para que P53 realice sus funciones como supresor de crecimiento (Walker y Levine, 1996) y se ha propuesto que interviene dentro del mecanismo de especificidad de los genes que serán activados transcripcionalmente por P53; por ejemplo, esta región no es necesaria para la activación de los genes p21 y bax, pero si se requiere para la activación de otros genes (Venot *et al.*, 1998). Además, este extremo tiene numerosos residuos de serinas y treoninas, aminoácidos que son susceptibles a fosforilación como parte de la regulación de la funcionalidad de P53 (Meek, 1999).

El dominio de unión específica al ADN ocupa casi dos cuartas partes de la proteína y se encuentra ubicado entre los residuos 100 y 293 (Bargonetti *et al.*, 1993). La importancia de esta región está dada por el hecho de que más del 90% de las mutaciones que inactivan la funcionalidad de P53 se encuentran dentro de este dominio (Nigro *et al.*, 1989; Kern *et al.*, 1991; Bode y Dong, 2004).

El extremo carboxilo terminal (aminoácidos 294 al 393) presenta un dominio subdividido funcionalmente en tres diferentes motivos, uno de localización nuclear (residuos 315 al 386), un dominio de oligomerización (residuos 337-355) y uno más de exportación nuclear (residuos 340 al 351). Los dominios de localización y exportación nuclear son los que regulan la localización celular de P53 entre el núcleo y el citoplasma (Shaulsky *et al.*, 1991; Bode y Dong, 2004). El dominio de oligomerización, conformado por una hélice anfipática, juega un papel muy importante en la actividad biológica de P53, por lo que modificaciones covalentes como fosforilaciones y acetilaciones sobre esta región permiten que P53 pase de una conformación inactiva a una conformación activa formando homotetrámeros (Waterman *et al.*, 1995; Sturzbecher *et al.*, 1992; Apella y Anderson, 2001). Este homotetrámero está constituido por cuatro unidades idénticas que reconocen una secuencia específica del ADN permitiéndole la regulación transcripcional de varios genes (Ljungman, 2000). Finalmente esta tetramerización enmascara la señal de exportación nuclear, lo que se traduce en que P53 sea retenido en el núcleo y evita que sea exportado hacia el citoplasma donde es degradado (Stommel *et al.*, 1999).

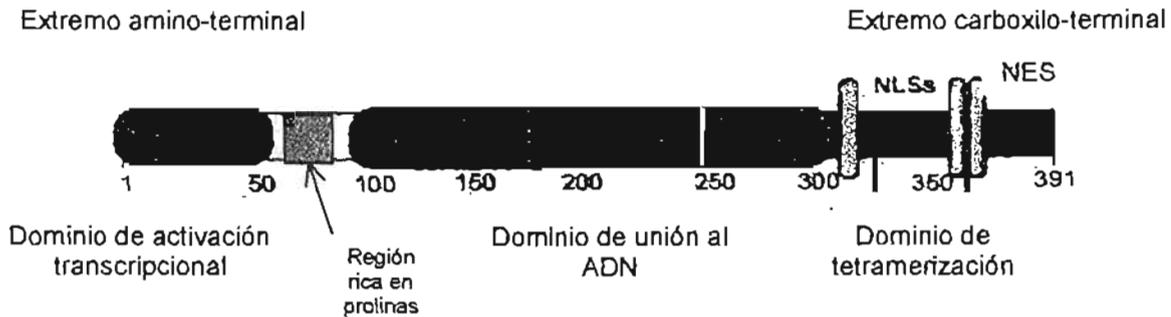


Figura 3. Dominios funcionales de la proteína P53. El dominio amino-terminal consta de los residuos 1 al 42 y regula la función de factor de Transcripción de P53. El dominio central que comprende la mayor parte de la molécula es responsable de la unión al ADN y el dominio situado en el extremo Carboxilo-terminal es responsable de la oligomerización de la proteína, éste último contiene las señales de localización nuclear (NLSs) y las de exportación nuclear (NES).

1.5.2 Funciones de la proteína P53.

La proteína supresora de tumores P53 es una fosfoproteína nuclear con múltiples funciones. El gen es transcrito continuamente al igual que su ARN mensajero traducido que codifica para una proteína de 393 aminoácidos (Bode y Dong, 2004). Sin embargo, el producto proteico es sometido a una rápida degradación vía ubiquitinación por el proteosoma (Chowdary *et al.*, 1994; Maki *et al.*, 1996); esto determina su vida media, que varía entre 5 a 20 minutos, por lo que en circunstancias normales P53 se encuentra en muy baja concentración o en niveles no detectables (Bode y Dong, 2004).

La proteína P53 interviene en diferentes vías de respuesta ante el estrés, como factor de transcripción participa durante la progresión del ciclo celular, ya sea por detención del ciclo, reparación del ADN, senescencia celular y/o apoptosis. P53 facilita la reparación y sobrevivencia de células ligeramente dañadas o elimina a las severamente dañadas, por lo que, alteraciones en el gen

que interfieren con estas funciones propician la sobrevivencia de células dañadas (Hofseth *et al.*, 2004).

La activación de P53 en respuesta a varios tipos de estrés o daño se establece principalmente a través de modificaciones post-traduccionales, lo que permite disminuir su nivel de degradación y cambiar su conformación para así incrementar su actividad funcional. Puede también actuar como represor transcripcional y como factor inhibidor de la traducción de ciertos ARNm (Chumakov, 2000).

P53 tiene la capacidad de unirse al ADN de manera tanto específica como inespecífica. Se ha propuesto que la interacción no específica se presenta cuando la proteína lleva a cabo el reconocimiento del daño al ADN (El-Dery, 1998), dado que P53 presenta actividad de exonucleasa 3'-5' y puede unirse directamente al ADN de cadena sencilla y a bases sin aparear. En cuanto a la interacción específica, P53 trabaja como factor de transcripción al unirse al ADN a través de secuencias específicas. Estas secuencias son conocidas como sitios consenso para la unión de P53 y están compuestas por dos copias de 10 pb con la secuencia 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' separadas por 0 a 13 pb (Vogelstein *et al.*, 2002). Desde su descubrimiento como factor de transcripción numerosos genes y vías de señalización han sido descritos. Se ha propuesto que dentro del genoma humano habría entre 200 y 300 sitios consenso potenciales para P53 (Tokino *et al.*, 1994).

Los rompimientos al ADN provocados por agentes físicos (como la radiación ionizante y ultravioleta), o agentes químicos, hipoxia, señales de crecimiento no controladas por activación de oncogenes, cambios metabólicos como la falta de nutrientes o ribonucleótidos, daño al huso mitótico entre otras, son el principal tipo de señales que inducen a la activación de P53 (Stewart y Pietenpol, 2001; Ryan *et al.*, 2001) (Figura 4).

1.5.2.1 P53 en la detención del ciclo celular.

En su función de factor de transcripción, se ha propuesto que la proteína se activa en respuesta a cualquier forma de daño que afecte al genoma; si el daño es leve detiene la progresión del ciclo celular en el punto de control de G₁, para permitirle a la célula reparar el ADN y posteriormente reiniciar el ciclo celular, mientras que si el daño es muy grave o irreparable activa el proceso de apoptosis reduciendo de esta manera la posibilidad de que células con mutaciones puedan sobrevivir y contribuir al proceso de carcinogénesis (Ljungman, 2000; Balint y Vousden, 2001). En esta fase específica del ciclo celular, P53 actúa como factor de transcripción para inducir a la proteína P21 (Waf/Cip1), la cual inhibe a los complejos ciclinas-CDK por lo que evita la fosforilación de RB necesaria para que la célula entre en la fase S, bloqueando la progresión del ciclo celular. También, la proteína P53 activa a otros genes reguladores de la reparación como GADD45; además, en la fase S puede actuar directamente frenando la replicación del ADN, ya que esta proteína se une al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Si la reparación del ADN es satisfactoria, P53 activará al gen *MDM2*, cuyo producto se une a la proteína para degradarlo y así quitar el bloqueo del ciclo celular (Vogelstein *et al.*, 2002).

La proteína P53 también se acumula en el punto de control G₂/M para monitorear el daño antes de que se lleve a cabo la mitosis e inclusive en el momento de la división (Pietenpol y Stewart, 2002).

1.5.2.2 P53 y su intervención en la apoptosis.

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso muy conservado evolutivamente en células eucariotes y es un regulador de diferenciación y del desarrollo del organismo, así como de los sistemas de defensa y supresión de tumores (Allen *et al.*, 1998). La activación de la cascada de señalización

apoptótica se puede llevar a cabo por estímulos como daño al ADN que no puede ser reparado. Sin embargo, también participan otras señales apoptóticas como son la falta de factores de crecimiento y la activación de receptores de muerte celular (Fas/APO-17CD95, TNFr) (Okada y Mak, 2004).

Uno de los blancos transcripcionales de P53 es BAX, que codifica para una proteína proapoptótica de 22 kDa perteneciente a la familia BCL2 (Miyashita y Reed, 1995). Esta familia está conformada por proteínas involucradas en el balance pro/antiapoptótico y comparten desde uno hasta cuatro dominios homólogos a través de los cuales se regulan interactuando con los demás miembros de la familia formando homo y heterodímeros. También comparten un dominio transmembranal que facilita su inserción en membranas intracelulares (Gross *et al.*, 1999).

En las células viables, BAX es un monómero que se encuentra libre en el citosol o débilmente asociado a membranas intracelulares y sus niveles proteicos se incrementan con la activación de su expresión a través de P53 (Desagher y Martinou, 2000). Ante el estímulo apoptótico, BAX es promovido a homodimerizarse adquiriendo capacidad de formar poros intermembranales en organelos por medio del dominio transmembranal, y uno de los sitios blanco para este homodímero es la membrana externa de la mitocondria (Nouraini *et al.*, 2000). Se ha descrito que la formación de poros a través de la vía de BAX promueve la liberación de proteínas intramitocondriales como el citocromo c, el factor inductor de apoptosis (AIF) y las procaspasas 2, 3 y 9 hacia el citosol, desencadenando así la vía apoptótica post-mitocondrial (Haupt *et al.*, 2003).

Se ha propuesto que BCL2 regula el balance pro/antiapoptótico a través de su interacción con BAX, inhibiendo su homodimerización y en consecuencia su capacidad para formar canales en la membrana mitocondrial, también se ha reportado su capacidad para bloquear la translocación de P53 al núcleo, evitando así la transcripción de sus genes blanco (Pinton *et al.*, 2002).

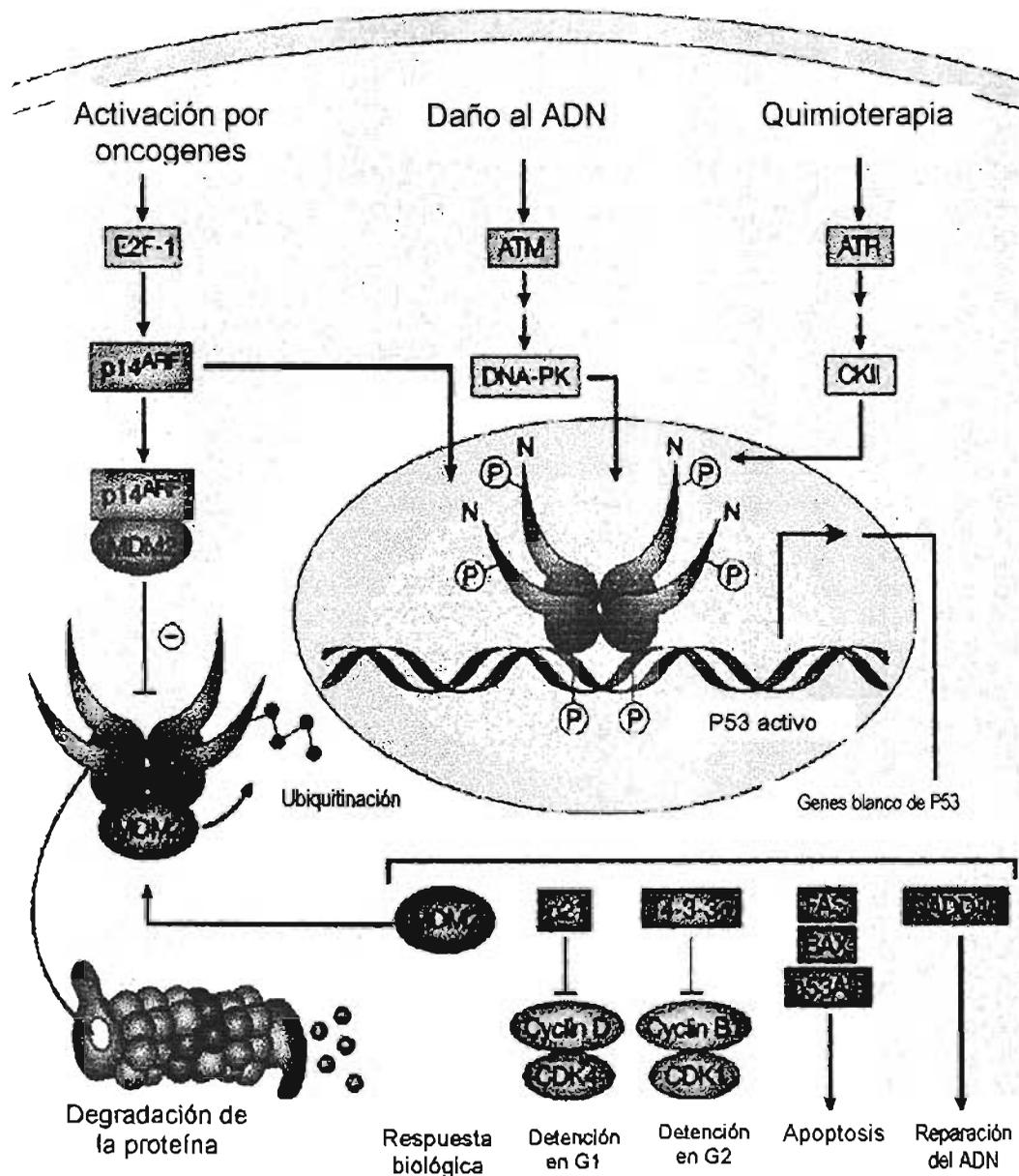


Figura 4. Funciones de la proteína P53. La proteína P53 es estabilizada y activada después de la exposición a diferentes tipos de estrés, incluyendo el daño al ADN. La activación de P53 permite que esta proteína actúe como factor de transcripción de diferentes genes. La respuesta biológica de esta cascada será la detención de la proliferación celular, la reparación del daño o bien la inducción de muerte celular. (Tomado de Bullock y Fersht, 2001).

1.6 Marcadores de genotoxicidad.

Existen varios parámetros que pueden ser empleados para la evaluación de efectos genotóxicos de xenobióticos tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre los más importantes se encuentran la evaluación de aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y en la actualidad se han incorporado nuevas técnicas que se caracterizan por su facilidad y bajo costo como son el ensayo Cometa o electroforesis unicelular y la determinación de la frecuencia de células con micronúcleos (MN).

1.6.1 Evaluación de la frecuencia de micronúcleos.

Los MN son fragmentos del núcleo celular que se forman como consecuencia de una división cromosómica errónea, que provoca la pérdida de un fragmento de cromosoma o del cromosoma completo (Fenech, 1997).

La técnica originalmente se desarrolló para la evaluación del daño inducido por la radiación ionizante, aunque poco después se amplió su uso para el análisis de otros mutágenos (Heddle et al., 1983). Para el análisis de MN en linfocitos de sangre periférica de seres humanos se emplea una metodología que se basa en el bloqueo de la citocinesis utilizando citocalasina-B (Cyt-B), lo que permite identificar a las células que se han dividido una vez en cultivo, observándose éstas como células binucleadas (CBN), debido al efecto inhibitorio de la Cyt-B sobre la citocinesis sin alterar la cariocinesis (Carter, 1967).

Esta técnica se ha convertido en una herramienta muy útil para la detección de daño genético, además de presentar otras ventajas como su rapidez, facilidad y versatilidad, pues es aplicable a diferentes tipos celulares,

siendo en algunos casos capaz de sustituir el análisis de aberraciones cromosómicas (Figura 5).

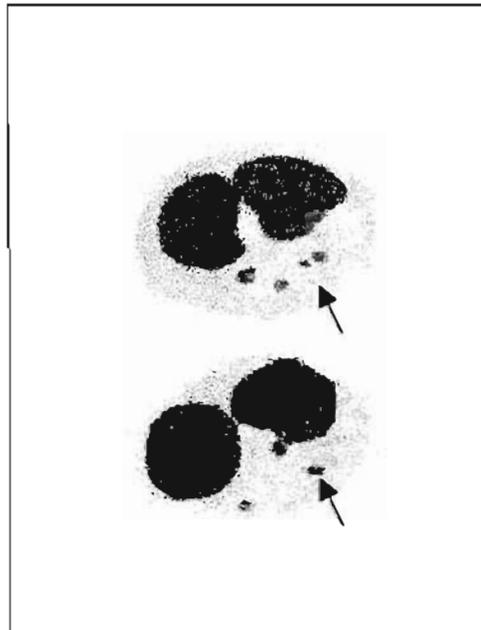


Figura 5. Células binucleadas con micronúcleos, teñidas con Giemsa. Obsérvese los dos núcleos principales y los micronúcleos en el citoplasma (flechas).

1.7 El Metronidazol.

El metronidazol (MTZ) es un agente sintético derivado del 5-nitroimidazol, ampliamente utilizado en nuestro país debido a la alta frecuencia de amibiasis. Su indicación original fue para el tratamiento de infecciones provocadas por *Trichomonas vaginalis* (Corsar y Julou, 1959), pero con el tiempo se ha ido ampliando su espectro de acción para combatir infecciones provocadas por otros protozoarios como por ejemplo *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Khambatta, 1971; Powell, 1966). Tiempo después se descubrió que actuaba como microbicida en bacterias anaerobias como son las especies del género *Bacteroides* (Tally, 1972; O'keefe *et al.*, 1982; Aldrige, 1994). Recientemente es empleado como tratamiento de elección en infecciones por *Helicobacter pylori* (Moore *et al.*, 1995; Frasser, 1994). Finalmente el MTZ ha mostrado ser efectivo como radiosensibilizador para células hipóxicas (Wilson, 1974; Chessin *et al.*, 1978) y hoy en día es empleado también para incrementar la efectividad biológica de la radiación ionizante durante la radioterapia de pacientes con cierta clase de tumores (Andereson, 1981) así como combinarlo con agentes alquilantes para mejorar la eficacia de la terapia antitumoral (Teicher *et al.*, 1991).

1.7.1 Mecanismo de acción.

Se propone que el mecanismo de acción del metronidazol es a través de la eliminación del potencial reductor de microorganismos anaerobios y microaerofílicos, esto ocurre mediante la reducción del grupo nitro del MTZ, llevada a cabo por proteínas transportadoras de electrones, como la ferredoxina, disminuyendo así los equivalentes reductores de la célula (Ewwan *et al.*, 1980; Müller, 1983). Sin embargo éste no es el único mecanismo de acción, también se ha propuesto que la forma nitroreducida produce lesiones bioquímicas y actúa a

nivel del ADN al inhibir su síntesis, provocar la pérdida de su estructura helicoidal y rompimientos en sus cadenas (La Russo *et al.*, 1977).

1.7.2 Farmacocinética.

En cuanto a sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, el metronidazol es uno de los antiparasitarios y antibacterianos más estudiados. El MTZ puede ser administrado por vía oral, intravenosa, tópica y rectal. Las dosis del fármaco son rápidamente absorbidas y distribuidas a casi la totalidad del organismo. Su vida media en plasma es de aproximadamente 8 horas (Amon, 1981).

1.7.2.1 Absorción.

El MTZ puede ser administrado por vía oral, intravenosa, tópica y rectal, aunque la más empleada clínicamente es la oral. Las dosis orales del fármaco (250 o 500 mg por lo general) son rápidamente absorbidas y distribuidas a casi la totalidad del organismo. Los niveles en suero pueden llegar a detectarse después de 1 hora de la ingestión con una concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) con una dosis de 500 mg siendo de 8 a 13 mg/L (50 a 80 μ M) en el $t_{m\acute{a}x}$ de 0.25 a 4.0 horas (Amon *et al.*, 1981), existe una acumulación y consecuentemente se han presentado concentraciones más altas cuando se administran dosis múltiples (Fahrig y Engelke, 1997). La absorción es excelente, presentando una biodisponibilidad que por lo general se reporta como $\geq 90\%$ por vía oral (Bergan *et al.*, 1984) y entre 62 al 82% por una administración de 500 mg por vía rectal que produce valores de C_{max} de 4 a 5.5 mg/L (25 a 50 μ M) (Houghton *et al.*, 1979); mientras que en la administración intravenosa, 7.5 mg/kg de la droga

adultos sanos produce un pico de concentración en el plasma entre 18 y 26 mg/L (105 y 152 μ M) (Ti *et al.*, 1996).

En cuanto a la administración tópica, principalmente intravaginal o dérmica, las concentraciones absorbidas son mínimas, aunque se ha reportado que dependiendo del vehículo usado la absorción puede variar. El MTZ vaginal al 0.75% en dosis de 5 g ha producido valores de máxima concentración en plasma de 0.2 a 0.3 mg/L después de 8.5 horas de ser administrado (Cunnigham *et al.*, 1994). En el caso de supositorios vaginales de 500 mg, estos valores son de 1.9 mg/L (Alper *et al.*, 1985; Mattila *et al.*, 1983). La biodisponibilidad de los supositorios de MTZ es de 25% con respecto a la de una dosis oral pero de 56% con respecto a la intravenosa (Alper *et al.*, 1985; Mattila *et al.*, 1983). Por su parte la absorción dérmica del metronidazol en gel al 0.75% está reportada como muy baja en pacientes con rosácea, se detectaron en suero concentraciones de 66 μ g/L después de 24 horas de ser aplicado 1 g del medicamento (Aronson *et al.*, 1987; Schmadel y McEvoy, 1990)

1.7.2.2 Distribución.

Tanto la administración oral como intravenosa del MTZ son ampliamente distribuidas en los tejidos y fluidos del organismo (Dobiás *et al.*, 1994; Freeman *et al.*, 1997). La fijación del MTZ a las proteínas plasmáticas es <20% (Ralph *et al.*, 1983; Andereson, 1981; Schwartz y Jeunet, 1976; Ralph *et al.*, 1974). Los volúmenes de distribución reportados varían de 0.53 a 0.96 L/kg (Schwartz y Jeunet, 1976; Ralph *et al.*, 1974; Loft *et al.*, 1986; Jensen y Gugler, 1983).

El MTZ logra penetrar en el líquido cerebroespinal, alcanzando así el sistema nervioso central donde las concentraciones que se han reportado han sido aproximadamente del 43% (hasta el 100%) de las encontradas en el plasma (Kokipii *et al.*, 1977). También se han encontrado concentraciones bajas en tejido placentario (0-1.4 mg/L) (Visser y Hundt, 1984; Templeton, 1977) y en la leche

materna (3.7-15.5 mg/ml) (Passmore *et al.*, 1988; Heisterberg y Branebjerg, 1983). La excelente absorción y distribución del metronidazol en gran parte se debe a que la unión de proteínas séricas o plasmáticas al metronidazol es relativamente baja (<20%) (Andereson, 1981; Schwartz y Jeunet, 1976; Ralph *et al.*, 1974).

1.7.2.3 Metabolismo.

En los mamíferos incluyendo al humano, la principal vía de biotransformación del metronidazol es el metabolismo oxidativo. Las principales modificaciones que se dan en la estructura química del MTZ son sobre sus cadenas alifáticas, involucrando reacciones tanto de las llamadas de fase I (oxidaciones e hidroxilaciones), como las de fase II (conjugaciones) que finalmente dan origen a las formas metabólicas hidroxilada, acetilada así como a metabolitos conjugados con glucurónidos respectivamente (Stambaugh *et al.*, 1968).

1.7.2.4 Excreción.

El MTZ en humanos es principalmente excretado a través de la vía renal, primordialmente en forma de sus metabolitos y en menor grado como su forma parental (Cunningham *et al.*, 1994). Los valores medios de eliminación varían entre 6 y 12 horas en individuos sanos (Lau *et al.*, 1974; Jensen y Gugler, 1983; Bergan y Arnold, 1980). Usando trazas radiactivas los estudios de farmacocinética de metronidazol en humanos muestran que en un período de 5 días, aproximadamente el 77% de la droga es eliminada en la orina y el 14% es excretada en las heces (Loft, 1990). Alrededor del 5% del metronidazol es excretado como CO₂ como resultado del metabolismo reductivo de la flora intestinal (Ings *et al.*, 1974).

El metabolito hidroxilado del MTZ (1-(2-hidroxi-etil)-hidroximetil-5-nitroimidazol) es el que se encuentra en mayor cantidad en la orina y que junto con la forma 2-metil-5-nitroimidazol, el metabolito acetilado (1-(2-hidroxi-etil)-2-carboxil-5-nitroimidazol) y los demás metabolitos representan entre el 80 y 90% de todos los metabolitos encontrados en la orina, mientras que únicamente entre el 6 y 18% corresponde al MTZ (Templeton, 1977). Bergan y colaboradores (1986) reportaron que en los valores determinados en orina en individuos sanos que recibieron 500 mg de MTZ por vía intravenosa, el MTZ representó el 18.4%, el metabolito hidroxilado el 62.4% y 27.2% para el metabolito acetilado.

El MTZ puede también ser encontrado en otros fluidos corporales incluyendo fluidos seminales y vaginales (Tu *et al.*, 1990), bilis (Lykkesgaard-Nielsen y Jutensen, 1977), saliva (von Know y Nord, 1982) e inclusive como ya se había mencionado con anterioridad, en leche materna donde la vida media es de 9 horas aproximadamente (Passmore *et al.*, 1988; Heisterberg y Branebjerg, 1983; Erickson *et al.*, 1981).

1.7.3 Farmacodinamia.

El MTZ parece tener una velocidad muy rápida de destrucción de los anaerobios susceptibles. Como los aminoglucósidos y fluoroquinolonas, el metronidazol también parece exhibir una efectividad dependiente de la concentración y tiene un efecto postantibiótico que se extiende más de 3 horas. Se ha sugerido la administración de dosis más altas a mayores intervalos en lugar de dosis pequeñas más frecuentemente.

1.7.4 Toxicidad.

Dada la facilidad que tiene el MTZ de atravesar la barrera placentaria, este medicamento presenta un potencial teratogénico y embriotóxico en ratones,

ratas, conejos (Williams y Woodcock, 2000; Eland, 1999). En humanos se ha mostrado que a dosis terapéuticas de MTZ, este fármaco no presenta aparentemente ningún peligro teratogénico serio (Bost, 1977; Mudry *et al.*, 2001). De cualquier modo no se recomienda el tratamiento con MTZ durante el primer trimestre del embarazo.

El MTZ es un mutágeno en sistemas bacterianos, produciendo sustitución de pares de bases (Dobiás, 1994; Diav-Citrin, 2001); no obstante su mutagenicidad y actividad clastogénica en mamíferos es controvertida (Diav-Citrin, 2001; Caro-Paton, 1997).

El MTZ y su metabolito hidroxilado tienen la capacidad de inducir daño al ADN en linfocitos humanos manifestados como rompimientos de cadena sencilla y aberraciones cromosómicas (Caro-Paton, 1997; Elizondo, 1996; Menéndez *et al.*, 2001). Existen suficientes evidencias para aceptar la actividad carcinogénica del MTZ en animales experimentales, produciendo linfomas, cáncer pulmonar y fibroadenomas mamarios y adenocarcinomas (Ostrosky, 1994; Bendesky, 2002). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasifica al MTZ dentro del grupo 2B, es decir que es un agente con evidencia insuficiente para ser considerado carcinógeno humano, pero con suficiente evidencia de carcinogenicidad animal (IARC, 1987).

Datos de nuestro grupo muestran que el MTZ estimula la proliferación de linfocitos humanos tanto *in vivo* como *in vitro* (Elizondo *et al.* 1994 y 1996), y los cultivos que se dividen más, tienen células con más daño cromosómico.

2. HIPÓTESIS.

En cultivos de linfocitos de diversos donadores se observaran diferencias en la sensibilidad a los efectos genotóxicos inducidos por el tratamiento con MTZ.

3. OBJETIVO.

Demostrar *in vitro* en cultivos de linfocitos la existencia de diferencias en la sensibilidad al MTZ, evaluando para ello la proliferación celular, la inducción de MN y la expresión de la proteína P53.

4. MATERIAL Y METODOS.

4.1 Cultivo de linfocitos para evaluar la Cinética de Proliferación Celular (CPC) y el Índice Mitótico (IM).

Se extrajo sangre heparinizada por venopunción de 5 donadores sanos, no fumadores y no expuestos a fármacos.

Se sembraron 0.5 ml de sangre entera en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con aminoácidos no esenciales (10 mM, Gibco) y L-glutamina (2 mM, Sigma). Se agregó 30µl/mL de fitohemaglutinina (PHA, Gibco) y bromodesoxiuridina (BrdU, 32 µM). Los cultivos de linfocitos fueron tratados al inicio del cultivo, con diferentes concentraciones de MTZ y se incubaron a 37^o C por 72 horas. Dos horas antes de la cosecha se agregaron 0.30 ml de Colcemid (GIBCO, 10 µg/ml). Se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 10 ml de una solución hipotónica 0.075M de KCl, la suspensión se mantuvo por 30 min en un baño a 37^oC. Posteriormente se centrifugó a 1200 rpm por 10 min y las células se fijaron en una solución fijadora de metanol-ácido acético (3:1); este procedimiento se repitió hasta obtener un botón blanco, con el cual se realizaron las laminillas (Ostrosky *et al.*, 1986).

Los botones celulares son resuspendidos después del último lavado en 0.5 ml de la solución fijadora. Con una pipeta Pasteur se resuspendió el botón y se goteó sobre un portaobjetos previamente enfriado en etanol, se secó a la flama y se observó al microscopio para asegurarse de la obtención de metafases (Moorhead *et al.*, 1960).

Tinción de laminillas.

En una solución de Hoescht (1 mg/ml) preparada en agua destilada se sumergieron las laminillas por 30 minutos en ausencia de luz, se enjuagaron con agua corriente y se secaron. Posteriormente se cubrieron con un amortiguador de fosfatos (Na_2HPO_4 66mM, KH_2PO_4 66mM, pH 6.8) y se expusieron a la luz negra por 90 minutos. Las laminillas se enjuagaron en el mismo amortiguador y se sumergieron en una solución de Giemsa (Sigma) al 4% en amortiguador de fosfatos por 3 minutos. Se enjuagaron en agua corriente y se secaron (Perry y Wolff, 1974).

Las laminillas son analizadas en un microscopio óptico con un objetivo de 20 aumentos para evaluar el índice mitótico (IM), se cuentan el número de metafases en 2000 núcleos, el IM se determina de la siguiente manera: No. de metafases/2000 núcleos. Para evaluar la cinética de proliferación celular se calculó el índice de replicación (IR) a partir del número de metafases observadas en primera (M1), segunda (M2) y tercera o más divisiones (M3) presentes en 100 metafases (Ivett, 1982). El IR se determinó con la siguiente fórmula: $\text{IR} = [1(\text{M1}) + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3})]/100$ metafases.

4.2 Cultivos de linfocitos para evaluar micronúcleos (MN).

Para el ensayo de micronúcleos se sembraron 0.5 ml de sangre entera en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con aminoácidos no esenciales (10 mM, Gibco) y L-glutamina (2 mM, Sigma). Se agregó 30 μl /mL de fitohemaglutinina (PHA, Gibco) y los cultivos de linfocitos fueron tratados al inicio del cultivo, con diferentes concentraciones de MTZ por 72 horas. Veinticuatro horas antes de la cosecha se añadieron 6 μg /ml de Citocalacina-B. Las células fueron suavemente mezcladas con un fijador de metanol-ácido acético, 3:1 y goteadas en laminillas limpias previamente enfriadas en agua (Fenech y Morley,

1985). Las laminillas fueron teñidas con azul de metileno más eosina (Coloración de Wright), y la frecuencia de micronúcleos fue estimada en al menos 1000 células binucleadas por donador (figura 5).

En estas laminillas se evaluó el índice de proliferación nuclear (IN), contando las células mononucleadas (un solo núcleo), binucleadas (dos núcleos en la misma célula) y polinucleadas (más de dos núcleos en la misma célula) que había en un total de 200 células. En la figura 6 se muestra como se observan las células para la determinación del IN. El IN se determinó con la siguiente fórmula:
$$IN = [1(\text{Mono}) + 2(\text{Bi}) + 3(\text{Poli})] / 200 \text{ células.}$$

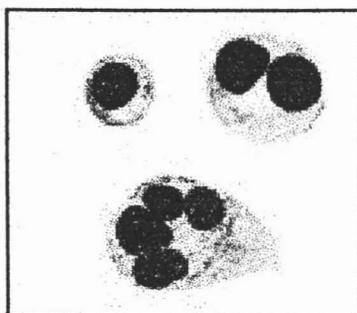


Figura 6. Imagen de linfocitos cultivados con Cyt-B. Obsérvese los núcleos en cada célula teñidos en color más oscuro, lo que permite clasificarlas como mononucleadas (un núcleo por célula), binucleadas (dos núcleos) y polinucleadas (tres o más núcleos).

4.3 Cultivos de linfocitos para evaluar la expresión de P53.

Se obtuvo sangre periférica heparinizada de donadores. Los linfocitos (células mononucleadas) fueron separados por un gradiente de densidad de Fycoll-Hypaque (Sigma). El anillo de células blancas se recuperó, se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI 1640 y se contaron las células recuperadas en un hematocitómetro. Se sembraron 3×10^6 linfocitos en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 15 % de suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales

(10 mM) y L-glutamina (2 mM). Los linfocitos se trataron 48h con diferentes concentraciones de MTZ.

4.4 Determinación de proteínas por Western-Blot.

El análisis por Western-Blot para p53 se realizó como describen Salazar y cols. (1997). Brevemente, las células se cosechan por centrifugación y son lisadas con una solución salina amortiguadora de fosfatos que contiene 1% NP450, 0.5% de deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 3mM de PMFS, 20 µg/ml de aprotinina y 10 µg/ml de ortovanadato de sodio; 50 µg de proteína son calentados por 5 minutos en una solución conteniendo 2% SDS, 80 mM Tris pH 6.8, 10% glicerol, 5% 2-β-mercaptoentanol y 0.01% de azul de bromofenol. Posteriormente las proteínas fueron separadas en un gel al 10% de SDS-poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con leche en polvo al 5% en TBS. La expresión de la proteína P53 fue detectada con el anticuerpo primario, anti-P53 monoclonal D0-1 (1 µg/ml) de Santa Cruz Biotechnology. Se utilizó como control de cargado del gel, la expresión de la proteína constitutiva β-ACTINA. El anticuerpo primario que se empleo fue anti-ACTINA I-19 policlonal (0.5 µg/ml). La inmunodetección se desarrolló siguiendo el método de ECL (Amersham International Amersham, GB).

4.5 Análisis estadístico.

Se utilizó una prueba de ANOVA para determinar la significancia de los resultados tomando como valores estadísticamente significativos aquellos con una $p < 0.05$.

5. RESULTADOS.

Con el fin de estudiar los efectos genotóxicos del MTZ se trataron cultivos de linfocitos de 5 donadores sanos (1 mujer y 4 hombres de 20 a 40 años de edad) con diferentes dosis de MTZ las cuales fueron ajustadas de acuerdo a las concentraciones en plasma reportadas en individuos tratados con el medicamento (Elizondo *et al.*, 1996). Para evaluar los efectos del MTZ en la proliferación celular se utilizaron tres tipos de cultivo de linfocitos: 1.- Con bromodesoxiuridina que se incorpora en el ADN permitiendo analizar metafases y determinar si la célula se dividió una, dos y tres ó más veces, además de poderse evaluar el Índice Mitótico (IM) y el Índice de Replicación (IR); 2.- Con citocalasina-B, en el que se bloquea la citocinesis formándose células bi, tri y polinucleadas en las que se puede evaluar cuántas veces se dividió la célula y determinarse el Índice Nuclear (IN). Este método fue desarrollado específicamente para la evaluación de micronúcleos en células binucleadas, por lo que también lo usamos para determinar el efecto clastogénico del MTZ; 3.- Cultivos estándar de los que se extrajeron las proteínas que se utilizan en el ensayo de inmunolectroforesis para determinar la expresión de la proteína P53.

Como se aprecia en la figura 7 (tabla 1), hay un incremento significativo en el IM a la dosis de 200 μ M de MTZ con respecto al control, nótese que en cada uno de los donadores, excepto en el donador 3, se observa un incremento de este parámetro siendo estadísticamente significativo a esta misma dosis. En las figuras 8 y 9 (tablas 2 y 3) se puede observar que como grupo no existen cambios en la cinética de proliferación celular. Sin embargo se observa que al analizar cada caso con la dosis de 200 μ M de MTZ, en los donadores 4 y 5 hay un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de segundas y terceras o más divisiones, así como en el IR respectivo. En cuanto a la cinética de proliferación

nuclear tampoco se observan cambios en el grupo, pero a la dosis de MTZ más alta, el donador 5 presenta un incremento significativo en las células binucleadas y polinucleadas, que son las células que se han dividido una, dos o más veces; en cambio, en el donador 4 se observa un incremento en las células mononucleadas y una disminución en las células binucleadas en los cultivos con 200 μ M de MTZ (figura 10, tabla 4). En el índice nuclear no se observaron cambios en los cultivos tratados con respecto al control en ninguno de los donadores (figura 11, tabla 5).

Al comparar los índices que miden la cinética de proliferación celular, el IR y el IN, encontramos que la correlación entre ellos fue de 0.3225 para los cultivos sin MTZ, 0.1792 para los cultivos con 100 μ M de MTZ y 0.1097 para los tratados con 200 μ M de MTZ, con una $p > 0.05$ para todos los casos; la falta de correlación entre estos dos índices indica que no están midiendo lo mismo (figura 12).

En cuanto a la generación de daño al ADN sólo en un donador (el número 1), el MTZ indujo un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos a la dosis de 200 μ M (figura 13, tabla 6).

Encontramos diferencias en el patrón de inducción de la proteína P53 (figura 14). De acuerdo a la evaluación del análisis densitométrico, en 3 donadores se observó la inducción de un incremento en la expresión de la proteína con relación a la dosis y en dos donadores (3 y 5) no hubo inducción (figura 15, tabla 7).

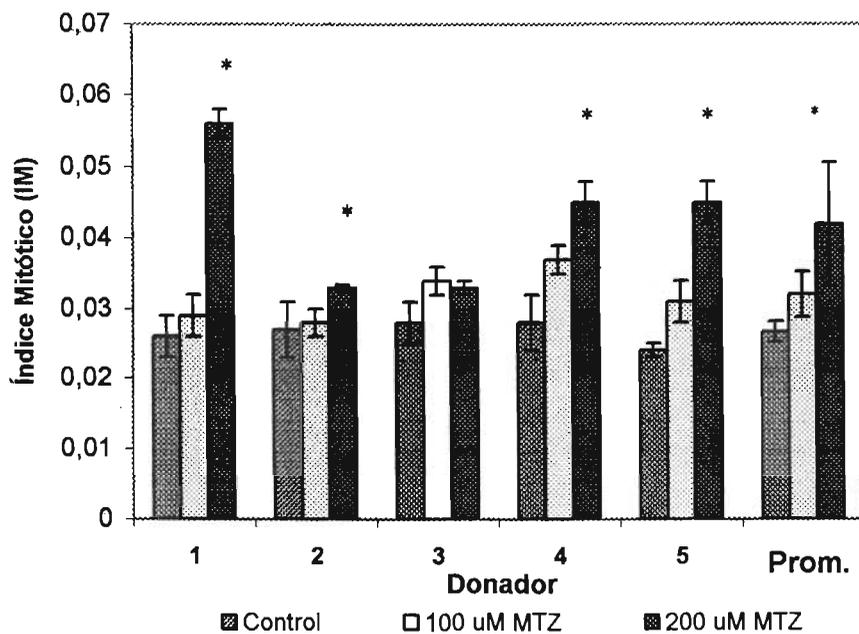


Figura 7. Índice mitótico (IM) en cultivos de linfocitos de 5 donadores. Los cultivos de linfocitos fueron tratados con diferentes concentraciones de MTZ (0, 100 y 200 μM). En todos los donadores hay un incremento del IM con respecto al control a la dosis más alta empleada. Prom.= promedio de todos los donadores para cada una de las concentraciones de MTZ empleadas. * $p < 0.05$ (ANOVA).

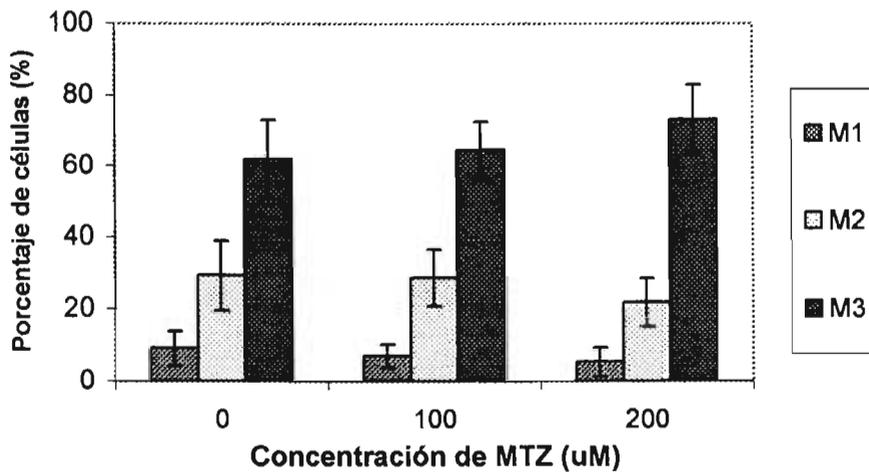


Figura 8. Cinética de Proliferación Celular (CPC) en cultivos de linfocitos. La gráfica muestra el promedio de los resultados de los cinco donadores. Se observa que no hay cambios en la CPC de los cultivos tratados con respecto al control. M1 = primera división; M2 = segunda división; M3 = tercera división. $p < 0.05$ (ANOVA).

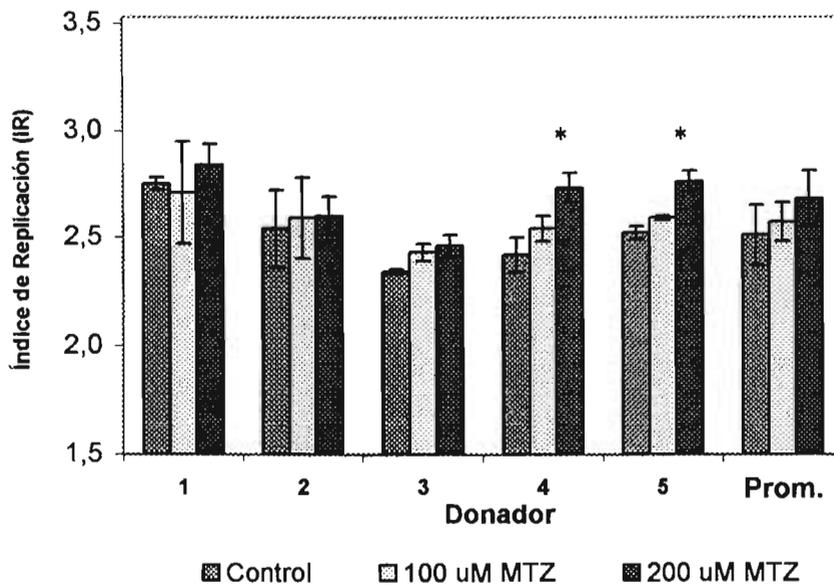


Figura 9. Índice de replicación (IR) en cultivos de linfocitos. Hay un aumento en la dosis de 200 μM de MTZ en los donadores 4 y 5, con respecto al cultivo control de cada uno de ellos. Prom. = promedio de los resultados de los cinco donadores. * $p < 0.05$ (ANOVA).

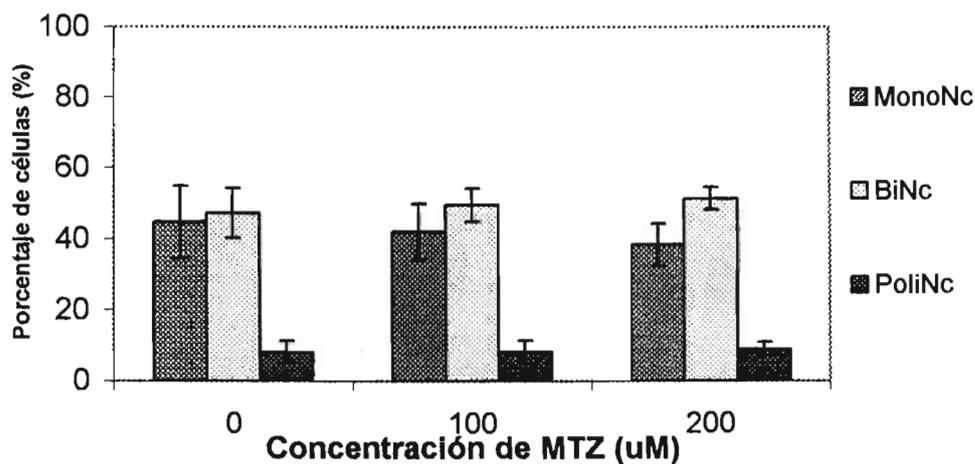


Figura 10. Cinética de Proliferación Nuclear (CPN) en cultivos de linfocitos con citocalasina-B. No se observa ningún cambio estadísticamente significativo en la CPN de los cultivos tratados con MTZ con respecto al cultivo control. La gráfica muestra el promedio de los resultados de los 5 donadores. MonoNc = células mononucleadas; BiNc = células binucleadas; PoliNc = células polinucleadas. * $p < 0.05$ (ANOVA).

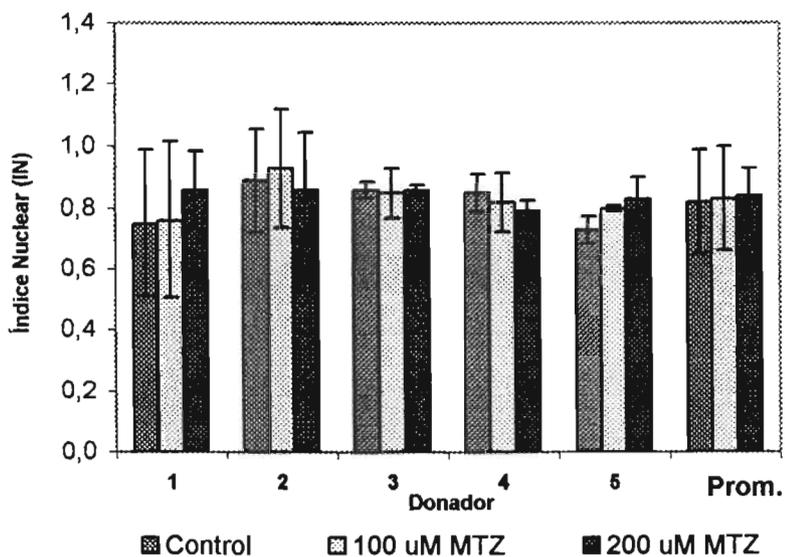


Figura 11. Índice Nuclear de cultivos de linfocitos de cinco donadores. No se observan cambios en los cultivos tratados con MTZ con respecto a los cultivos control en ninguno de los donadores. Prom. = promedio de los cinco donadores. $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA).

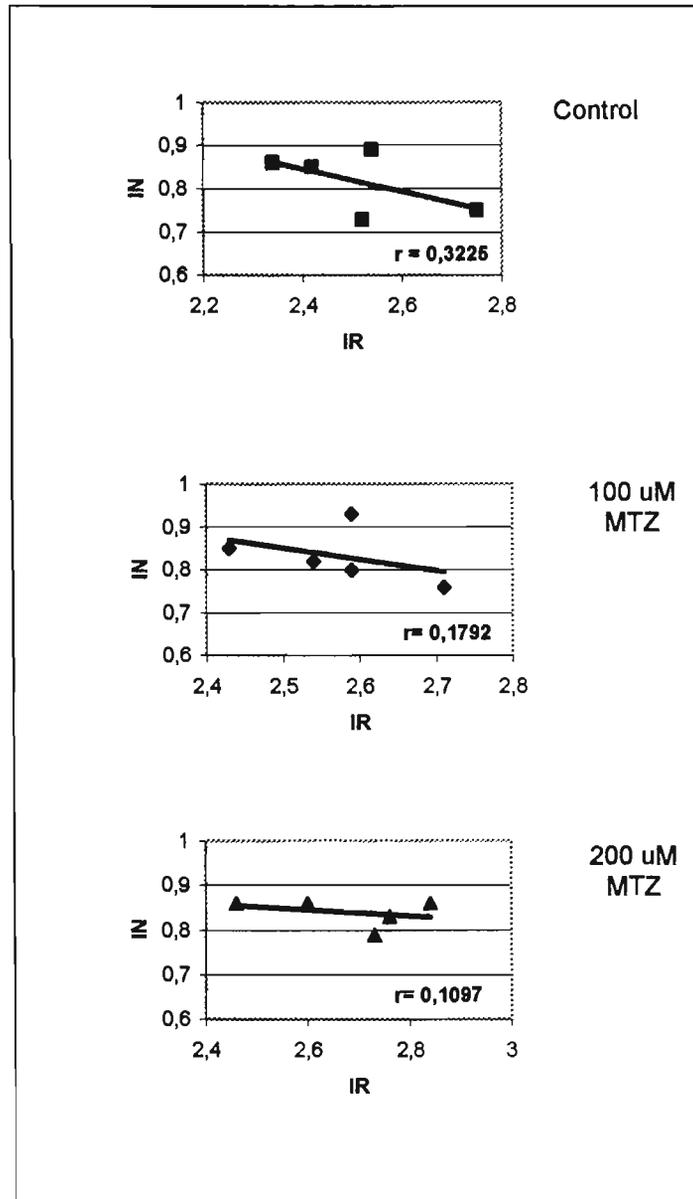


Figura 12. Correlación entre el IR y el IN de cultivos de linfocitos de cada uno de los 5 donadores a las diferentes concentraciones de MTZ empleadas (0, 100 y 200 μ M). El r de cada gráfica nos indica que no existe correlación entre estos parámetros. Cada punto de la gráfica corresponde a los datos obtenidos para cada donador. $p > 0.05$.

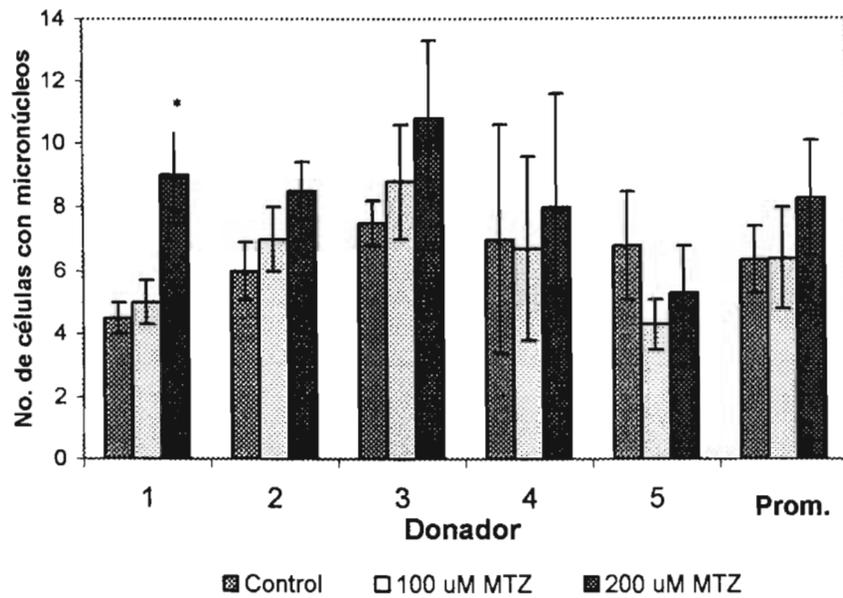


Figura 13. Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en cultivos de linfocitos. En el donador 1 hay un incremento significativo en el no. de células con micronúcleos a la dosis de 200 μM. Prom. = promedio de los cinco donadores. * $p < 0.05$ (ANOVA).

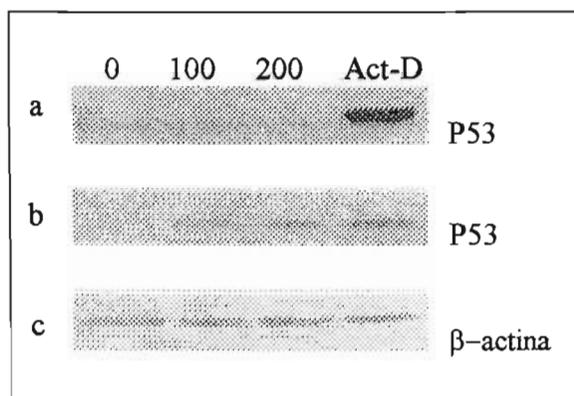


Figura 14. Patrón de respuestas de la proteína P53 en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con MTZ. Se muestra en esta figura las inmunodetecciones más representativas de cada grupo de respuesta, en a), un donador sin inducción de la expresión de la proteína, en b), un donador con inducción dosis-respuesta y c), se realizó la inmunodetección de β -actina como control interno de cargado del gel. El control positivo de inducción de P53 fue actinomicina-D (Act-D). 0 = cultivos sin tratamiento; 100 = cultivos tratados con 100 μ M de MTZ; 200 = cultivos tratados con 200 μ M de MTZ.

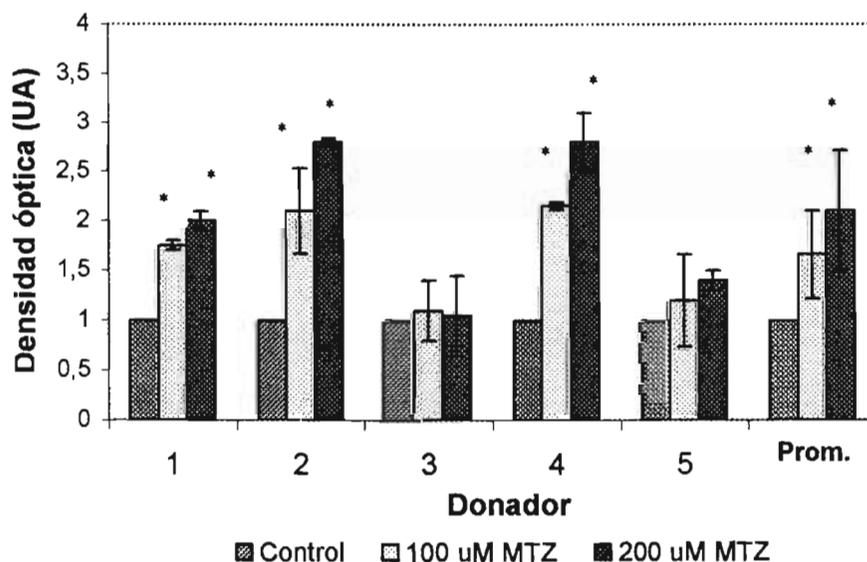


Figura 15. Análisis densitométrico de la expresión de la proteína P53 en cultivos de linfocitos tratados con diferentes concentraciones de MTZ. Prom. = promedio de los resultados de los cinco donadores. * $p < 0.05$ (Prueba estadística de significación que compara una media experimental con un valor normalizado esperado).

Figura 16. Comparación entre la inducción de daño y la capacidad proliferativa con el incremento de los niveles de la proteína P53 en cultivos de linfocitos humanos tratados con MTZ.

Donador	IM	IR	MN	P53
1	Incremento **	SC	Incremento *	Incremento *
2	Incremento *	SC	SC	Incremento *
3	SC	SC	SC	SC
4	Incremento **	Incremento **	SC	Incremento *
5	Incremento **	Incremento **	SC	SC

n = tres experimentos independientes por duplicado, SC = no hay diferencias significativas, * p < 0.05; ** p < 0.01 (ANOVA).

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

La capacidad del MTZ para inducir daño genotóxico en células humanas es un tema controversial (Bendesky y Menendez, 2001). En un estudio realizado en nuestro grupo, observamos que el tratamiento *in vivo* con MTZ incrementó el número de aberraciones cromosómicas en los linfocitos de los participantes. (Elizondo, 1996). En linfocitos criopreservados del estudio mencionado, se encontró la generación de rompimientos de cadena sencilla en el ADN mediante el ensayo de electroforesis unicelular o prueba del cometa y la inducción de la expresión de la proteína P53 (Menéndez *et al.*, 2001). Ambos estudios mostraron diferencias en la sensibilidad de los individuos a los efectos genotóxicos del MTZ.

La variabilidad mencionada nos llevó a realizar un estudio *in vitro*, que permitiera evaluar que estas diferencias en la sensibilidad a los efectos genotóxicos inducidos por el MTZ, se debían a características intrínsecas de las células y no a factores extrínsecos como sería el estado de salud, hábitos alimenticios y en general el estilo de vida de cada individuo.

La evaluación de los efectos genotóxicos del MTZ se realizó en linfocitos de 5 individuos sanos que no estuvieron expuestos a ningún tratamiento en los últimos 3 meses. Fue evidente durante el desarrollo de esta investigación la variabilidad individual en los efectos producidos por el tratamiento con 200 μ M de MTZ en la proliferación celular, en el daño al ADN e incluso en la expresión de la inducción de la proteína P53.

Para la evaluación de la proliferación se emplearon 3 métodos distintos que permiten determinar:

1.- El Índice Mitótico (IM); 2.- La Cinética de Proliferación Celular (CPC) 3.- La Cinética de Proliferación Nuclear (CPN); calculándose el Índice de Replicación

(IR) y el Índice Nuclear para los métodos 2 y 3 respectivamente. Los primeros dos parámetros han sido validados en nuestro laboratorio (Rojas *et al.*, 1992), y el tercero requería ser validado por lo que comparamos los datos obtenidos de CPC con los de CPN y los calculados del IN con el IR. Los resultados obtenidos tanto para CPC como para CPN muestran un comportamiento similar y solo en los individuos 4 y 5 se observa un incremento en proliferación estadísticamente significativo utilizando cualquiera de los dos métodos. No fue así con los índices, el IN no mostró diferencias estadísticas en ninguno de los individuos mientras que el IR sí mostró un aumento estadísticamente significativo en la proliferación de los individuos 4 y 5, los mismos en los que CPC y CPN mostraron un incremento significativo en la proliferación.

No se observó ninguna correlación entre el IN y el IR (figura 6) y consideramos que esto podría deberse a que el IR considera células que se han dividido una, dos y hasta tres o más veces, en cambio el IN se utiliza con células que han tenido solo una o dos divisiones principalmente. Cabe señalar que en ambos métodos se pueden evaluar también marcadores de genotoxicidad como son las aberraciones cromosómicas (AC) en las laminillas donde se evalúa el IR y micronúcleos (MN) en las laminillas cuyos datos se utilizan para calcular el IN. Es necesario hacer mención de que la evaluación de MN es más sencilla y requiere de menor grado de especialización que la evaluación de AC; sin embargo la prueba de MN es menos específica, ya que en la evaluación de AC se observa cada cromosoma de forma individual pudiéndose identificar diferentes tipos de daño en el ADN, así como en qué cromosoma está ocurriendo el daño.

Por otro lado por el método de CPC se puede evaluar también el IM que mide las células que han pasado por mitosis y que en este estudio mostró un incremento significativo en 4 de los individuos evaluados (1, 2, 4 y 5) de los cuales solo en 2 se observaron alteraciones en la cinética de proliferación (figura 16) lo que significa que más linfocitos fueron estimulados a entrar en división, lo que posiblemente implica un efecto inmunoestimulador del MTZ, similar al del levamisol cuya actividad inmunoestimuladora, ha sido demostrada al aumentar la

respuesta de los linfocitos humanos al estímulo de mitógenos, la síntesis de ADN de timocitos y la producción de linfocinas (Sunshine *et al.*, 1977, Merluzzi *et al.*, 1975 y Whitcomb *et al.*, 1976). Sin embargo, el levamisol no es muy utilizado en la clínica ya que no en todos los individuos estimula la proliferación de los linfocitos y no puede predecirse en que individuos será útil, desconociéndose la causa de la variabilidad de estos efectos inmunoestimuladores (comunicación personal, J. Villareal, 1997) que pudieran a su vez estar relacionados con la susceptibilidad individual.

La Tabla 8 muestra que la expresión de P53 se incrementó en 3 individuos (1, 2 y 4), entre los cuales solo el individuo 4 muestra un incremento significativo en el IR, también se observa (figura 9) que aumentan las células mononucleadas y disminuyen las binucleadas y polinucleadas, que de hecho es lo que se esperaba, dado que al prenderse P53 debería detenerse la proliferación de los linfocitos. En los individuos 1 y 2 se expresa P53, sin embargo la CPC no se altera lo que podría deberse a que la proteína no fuera funcional, como en el caso de la línea celular C33 la cual tiene niveles elevados, pero la proteína es no funcional (Salazar *et al.*, 1997). En este contexto, corresponde preguntar si el MTZ podría dañar la función de la proteína P53.

En la figura 16 se observa también que el donador 1 fue el único de los 5 individuos estudiados, en el que el MTZ indujo un incremento en la frecuencia de MN y en los niveles de expresión de P53. En los donadores 2 y 4 también se incrementó la expresión de P53 pero no hay inducción de MN, lo que nos podría indicar que no son los MN los que están induciendo a la proteína P53. Esta inducción pudiera ser producto de rompimientos de cadena sencilla producidos tempranamente o a rompimientos cromatídicos, los cuales no se expresan en forma de MN, ambos daños ya han sido reportados en los linfocitos de individuos tratados con MTZ (Menéndez *et al.*, 2001; Elizondo *et al.*, 1996).

Interesantemente, en el donador 3 no se observaron cambios en ninguno de los parámetros evaluados. Cabe preguntarse si esta falta de respuesta pudiera estar relacionada con un menor riesgo de efectos adversos ó de padecer cáncer

cuando este individuo tuviera que recibir una terapia con este medicamento. Sin embargo, dado que este es un dato aislado, solo puede especularse al respecto y pensar en un diseño apropiado para responder a esta pregunta.

En este estudio *in vitro* se encontraron diferencias individuales en los linfocitos humanos ante el tratamiento con MTZ lo que demuestra que esta respuesta no esta dada por factores extrínsecos sino más bien por factores asociados a las características genéticas individuales: como la presencia de polimorfismos en genes encargados de la regulación del ciclo celular, de los puntos de vigilancia y de la reparación del daño al ADN. También pudieran estar involucrados los genes relacionados en el metabolismo del MTZ. Se ha propuesto que el MTZ es metabolizado por las enzimas del citocromo P450 1A1 y 2E1 (Loft *et al.*, 1990), produciéndose dos metabolitos principales: el carboxilado y el hidroxilado, siendo este último más potente en sus efectos inmunoestimuladores (Bahr y Ullmann, 1983) y más genotóxico que el MTZ (Elizondo *et al.*, 1996). También se ha determinado que un polimorfismo a nivel de CYP1A1 generará dos fenotipos: individuos con un CYP1A1 altamente inducible e individuos con un CYP1A1 de baja inducibilidad, lo que pudiera traer como consecuencia diferencias en la respuesta a los xenobióticos transformados por esta enzima. De manera que un individuo con un fenotipo altamente inducible formará más del metabolito hidroxilado y por lo tanto será más sensible a los efectos genotóxicos del MTZ. Cabe señalar, que se ha reportado que el linfocito presenta actividad de las enzimas CYP1A1 y CYP2E1 (Raucy *et al.*, 1999).

Por último es necesario mencionar que el MTZ es un medicamento de uso muy común en nuestro país debido al gran número de infecciones parasitarias y bacterianas existentes. A nivel mundial, incluyendo a los países desarrollados, el MTZ es ampliamente utilizado contra diversas enfermedades, e incluso es posible que su empleo se incremente por la aparición de infecciones emergentes y reemergentes en el mundo. Si bien, su efectividad no está en duda, es evidente que aún no es posible realizar una evaluación adecuada del riesgo-beneficio de su uso ya que su potencial genotóxico para seres humanos no está bien definido. Por

lo que habría que estudiar el potencial genotóxico del MTZ y sus metabolitos en un número significativo de individuos y que incluya pacientes que padezcan de las diferentes parasitosis para las cuales el medicamento está indicado. Una de las consecuencias más graves del daño al ADN de células humanas es el desarrollo de neoplasias malignas. De manera que, de demostrarse la genotoxicidad del MTZ en seres humanos, habría que continuar estudiando su posible carcinogenicidad, un efecto que ha sido muy difícil de analizar en seres humanos pero que está ampliamente demostrado en animales. Es importante analizar el papel que pudiera tener la susceptibilidad individual a los efectos genotóxicos del MTZ en el posible desarrollo de cáncer. Mientras tanto dado que el empleo del MTZ implica un posible riesgo, su uso debe ser más restringido y vigilado, además la búsqueda de medicamentos de igual o mayor eficacia pero menos riesgosos sería una medida recomendable.

7. APÉNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Índice mitótico (IM) en cultivos de linfocitos (con BrdU)

Donador	DOSIS MTZ (μM)		
	0 ($X \pm \text{DE}$)	100 ($X \pm \text{DE}$)	200 ($X \pm \text{DE}$)
1	0.026 \pm 0.003	0.029 \pm 0.003	0.056 ** \pm 0.002
2	0.027 \pm 0.004	0.028 \pm 0.002	0.033 * \pm 0.0005
3	0.028 \pm 0.003	0.034 \pm 0.002	0.033 \pm 0.001
4	0.028 \pm 0.004	0.037 \pm 0.002	0.045 ** \pm 0.003
5	0.024 \pm 0.001	0.031 \pm 0.003	0.045 ** \pm 0.003
Promedio	0.027 \pm 0.0015	0.032 \pm 0.0033	0.042* \pm 0.0087

μM = micromolar; X = promedio de tres experimentos independientes; DE = desviación estándar; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA).

Tabla 2. Cinética de Proliferación Celular (CPC) en cultivos de linfocitos (con BrdU).

Donador	DOSIS MTZ (μM)								
	0 ($X \pm \text{DE}$)			100 ($X \pm \text{DE}$)			200 ($X \pm \text{DE}$)		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	5.85 ± 0.6	14.75 ± 2.8	79.9 ± 1.3	6.9 ± 2.2	14.8 ± 3.4	78.3 ± 5.4	3.1 ± 1.2	10.3 ± 3.1	86.76 ± 2.8
2	8.17 ± 3.3	22.06 ± 3.3	69.78 ± 4.9	7.67 ± 5.5	25 ± 8.3	67.33 ± 13.7	6.78 ± 2.4	26.67 ± 6.1	66.56 ± 7.8
3	17.25 ± 3.2	31.25 ± 7.4	51.5 ± 4.2	12.25 ± 0.35	31.75 ± 4.6	56 ± 4.2	12.5 ± 0.7	29.25 ± 6.0	58.25 ± 5.3
4	10.5 ± 2.1	36.5 ± 7.8	53 ± 9.9	4.5 ± 0.7	37 ± 1.4	58.5 ± 0.7	1.5* ± 0.7	23.5* ± 6.4	75** ± 5.6
5	3.5 ± 2.1	41.5 ± 7.8	55 ± 5.6	3 ± 1.4	34.5 ± 3.5	62.5 ± 2.1	2.5 ± 0.7	19.5* ± 3.5	78** ± 4.2
Promedio	9.05 ± 4.7	29.2 ± 9.7	61.8 ± 11.1	6.9 ± 3.2	28.6 ± 7.9	64.5 ± 7.9	5.3 ± 4.0	21.8 ± 6.6	72.9 ± 9.8

μM = micromolar; X = promedio de tres experimentos independientes; DE = desviación estándar; M1 = primera división, M2 = segunda división, M3 = tercera división. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA).

Tabla 3. Índice de replicación (IR) en cultivos de linfocitos (con BrdU).

Donador	DOSIS MTZ (μM)		
	0 ($\bar{X} \pm \text{DE}$)	100 ($\bar{X} \pm \text{DE}$)	200 ($\bar{X} \pm \text{DE}$)
1	2.75 \pm 0.03	2.71 \pm 0.24	2.84 \pm 0.10
2	2.54 \pm 0.18	2.59 \pm 0.19	2.60 \pm 0.09
3	2.34 \pm 0.01	2.43 \pm 0.04	2.46 \pm 0.05
4	2.42 \pm 0.08	2.54 \pm 0.06	2.73 * \pm 0.07
5	2.52 \pm 0.03	2.59 \pm 0.01	2.76 * \pm 0.05
Promedio	2.51 \pm 0.14	2.57 \pm 0.09	2.68 \pm 0.13

μM = micromolar; \bar{X} = promedio de tres experimentos independientes; DE = desviación estándar; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA).

Tabla 4. Cinética de Proliferación Nuclear en cultivos de linfocitos (con Cyt-B)

Donador	DOSIS MTZ (μM)								
	0 (X \pm DE)			100 (X \pm DE)			200 (X \pm DE)		
	MonoNc	BiNc	PoliNc	MonoNc	BiNc	PoliNc	MonoNc	BiNc	PoliNc
1	55.9 \pm 14.8	39.1 \pm 11.6	5.06 \pm 3.3	52.4 \pm 16.3	42.8 \pm 14.2	4.71 \pm 2.2	36.9 \pm 6.6	53.21 \pm 0.76	9.83 \pm 5.9
2	34 \pm 5.2	53.9 \pm 8.7	12.4 \pm 3.5	29.3 \pm 7.7	56.3 \pm 9.2	14.4 \pm 4.0	36.3 \pm 10.4	54.8 \pm 9.6	8.9 \pm 2.5
3	37.8 \pm 1.8	51.4 \pm 1.2	10.9 \pm 0.5	38.6 \pm 1.2	52.1 \pm 2.3	9.2 \pm 3.5	35.1 \pm 0.5	52.8 \pm 1.1	12.1 \pm 0.2
4	37.9 \pm 3.5	53.9 \pm 2.2	8.3 \pm 1.5	42.5 \pm 5.7	51.0 \pm 3.6	6.5 \pm 2.1	48.0 * \pm 1.6	45.8 * \pm 1.2	6.2 \pm 1.0
5	58.1 \pm 4.0	38.2 \pm 3.2	3.7 \pm 0.8	47.7 \pm 5.1	45.9 * \pm 2.6	6.4 \pm 3.4	41.2 * \pm 4.6	50.8 * \pm 2.5	8.01* \pm 2.3
Promedio	44.7 \pm 10.1	47.3 \pm 7.1	8.1 \pm 3.3	42.1 \pm 7.9	49.6 \pm 4.7	8.2 \pm 3.4	38.4 \pm 6.1	51.5 \pm 3.1	9.0 \pm 1.9

μM = micromolar; X = promedio de tres experimentos independientes; DE = desviación estándar; MonoNc = células mononucleadas, BiNc = células binucleadas, PoliNc = células con tres o más núcleos; * p < 0.05, ** p < 0.01 (ANOVA).

Tabla 5. Índice nuclear (IN) en cultivos de linfocitos (con Cyt-B).

Donador	DOSIS MTZ (μM)		
	0 ($\bar{X} \pm \text{DE}$)	100 ($\bar{X} \pm \text{DE}$)	200 ($\bar{X} \pm \text{DE}$)
1	0.745 \pm 0.24	0.76 \pm 0.255	0.865 \pm 0.125
2	0.895 \pm 0.165	0.925 \pm 0.19	0.86 \pm 0.85
3	0.865 \pm 0.025	0.85 \pm 0.08	0.855 \pm 0.015
4	0.855 \pm 0.06	0.82 \pm 0.95	0.79 \pm 0.035
5	0.73 \pm 0.045	0.795 \pm 0.10	0.835 \pm 0.07
Promedio	0.82 \pm 0.17	0.83 \pm 0.17	0.84 \pm 0.09

μM = micromolar; \bar{X} = promedio de tres experimentos independientes; DE = desviación estándar; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA).

Tabla 6. Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en cultivos de linfocitos (con Cyt-B)

Donador	DOSIS MTZ (μM)		
	0 ($X \pm \text{DE}$)	100 ($X \pm \text{DE}$)	200 ($X \pm \text{DE}$)
1	4.5 ± 0.5	5 ± 0.7	$9^* \pm 1.5$
2	6.0 ± 0.9	7.0 ± 1.0	8.5 ± 0.9
3	7.5 ± 0.7	8.8 ± 1.8	10.8 ± 2.5
4	7.0 ± 3.6	6.7 ± 2.9	8.0 ± 3.6
5	6.8 ± 1.3	4.3 ± 0.8	5.3 ± 1.5
Promedio	6.36 ± 1.05	6.4 ± 1.6	8.3 ± 1.8

μM = micromolar; X = promedio de tres experimentos independientes; DE = desviación estándar; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA).

Tabla 7. Expresión de la proteína P53 en cultivos de linfocitos.

Donador	DOSIS MTZ (μ M)		
	0 Densidad óptica (UA) (X \pm DE)	100 Densidad óptica (UA) (X \pm DE)	200 Densidad óptica (UA) (X \pm DE)
1	1.0 \pm 0.0	1.75 * \pm 0.05	2.0 * \pm 0.09
2	1.0 \pm 0.0	2.1* \pm 0.43	2.8* \pm 0.04
3	1.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.3	1.5 \pm 0.4
4	1.0 \pm 0.0	2.15 * \pm 0.04	2.8 * \pm 0.3
5	1.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.46	1.4 \pm 0.1
Promedio	1.0 \pm 0.0	1.66* \pm 0.44	2.1* \pm 0.61

μ M = micromolar; X = promedio de tres experimentos independientes; DE = desviación estándar; * p < 0.05, ** p < 0.01 (Prueba estadística de significación que compara una media experimental con un valor normalizado esperado, Miller y Miller, 1988).

8. REFERENCIAS.

Aldrige KE, Gelfand M, Reller LB, et. al. . A five year multicenter study of the susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group isolates to cephalosporins, cephamycins, penicilins, clindamycin and MTZe in the United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 18:235-241 (1994).

Alper MM, Barwin N, McLean WM. Systemic absorption of metronidazole by the vaginal route. *Obstet. Gynecol.* 65:781-784 (1985).

Amon I, Amon K, Franke G, Mohr C. Pharmacokinetics of MTZe in pregnant women. *Chemother.* 27: 73-79 (1981).

Andereson KE. Pharmacokinetics of nitroimidazoles. Spectrum of adverse reactions. *Scand. J. Infect. Dis.* 26:60-67 (1981).

Apella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268:2764-2772 (2001).

Aronson IK, Rumsfield JA, West DP, Alexander J, Fischer JH, Paloucek FP. Evaluation of topical MTZe gel in acne rosacea. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 21: 346-351 (1987).

Bahr V, Ulman U. The influence of metronidazole and its main metabolites on murine in vitro lymphocytes transformation. *Eur J clin Microbiol* 2:568-570 (1983).

Balint E, Vousden KH. Activation and activities of the p53 tumor supresor protein. *Brit J Cancer* 85:1813-1823 (2001).

Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR, Prives C. A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA binding activity when generated from wild-type but non from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev.* 7:2565-2574 (1993).

Bendesky A, Menéndez D. Metronidazol: una visión integral. *Rev Fac Med UNAM* Vol. 44 No. 6:255-259 (2001).

Bendesky A, Menéndez D, Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? *Mutat Res.* 11(2):133-144 (2002).

Bergan T, Arnold E. Pharmacokinetics of MTZe in healthy volunteers after tablets and suppositories. *Chemotherapy* 26: 231-241 (1980).

Bergan T, Leinebo O, Blom-Hagen T. Pharmacokinetics and bioavailability of metronidazole after tablets, suppositories and intravenous administration. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 19, 19:45-60 (1984).

Bergan T, Throsteinsson SB. The pharmacokinetics of MTZe and its metabolites in reduced renal function. *Chemother.* 32: 305-318 (1986).

Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4:793-805 (2004).

Bost RG. Metronidazole : toxicology and teratology. In SM Finegold, editor metronidazole proceedings of the international metronidazole conference, Montreal. 126-131 (1977).

Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21:51-76 (1968).

Brusick D. Principles of Genetic Toxicology, 2nd edition, Plenum Press, pp 1-9 (1987).

Bullock, A., Fersht, A., Rescuing the function of Mutant p53. *Nature Reviews Cancer* 1 68-76 (2001).

Carrano AV, Natarajan A. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Res.* 204:379-406 (1988).

Caro-Paton T, Carvajal A, Martin de Diego I. Is metronidazole teratogenic ? A meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 44 :179-182 (1997).

Chatila TA, Schwartz DH, Miller R, Geha RS. Requirement for mitogen, T-cell-accessory cell contact, and interleukin 1 in the induction of resting T-cell proliferation. *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 44:235-247 (1987).

Chessin H, McLaughlin T, Mroczokowski Z, Rupp WD, Low KB. Radiosensitization, mutagenicity and toxicity of Escherichia coli by several nitrofurans and nitroimidazoles. *Radiat. Res.* 75:424-431 (1978).

Chowdary DR, Dermody JJ, Jha KK, Ozer JL. Accumulation of p53 in mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol. Cell Biol.* 14:1997-2003 (1994).

Chumakov PV. Function of the p53 gene: choice between life and death. *Biochemistry*. 65:28-40 (2000).

Coursar C, Julou L. Activitiè de 1' (hydroxy-2-ethyl)-1-methyl-2-nitro-5-imidazole vis-a-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis*. *Ann Inst. Pasteur* (Paris), 96:238-241 (1959).

Cunningham FE, Kraus DM, Brubaker L, Fischer JH. Pharmacokinetics of intravaginal MTZe gel. *J. Clin. Pharmacol.* 34: 1060-1065 (1994).

Dean J, Luster A, Munson A, Amos H. Immunotoxicology and immunopharmacology, Raven Press, New York (1985).

Dobiás L, Cerná M, Rössner P, Srám R. Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mut. Res.* 317:177-194 (1994).

Desagher S, Martinou J. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Cell Biol* 10:369-377 (2000).

Diav-Citrin O, Shechtman S, Gotteiner T. Pregnancy outcome after gestational exposure to metronidazole: A prospective controlled cohort study. *Teratology* 63:186-192 (2001).

Eland IA, van Puijenbroek EP, Sturkenboom MJ, Wilson JH, Stricker BH. Drug associated acute pancreatitis: twenty-one years of spontaneous reporting in The Netherlands. *Am J Gastroenterol* 94:2417-2422 (1999).

El-Deiry WS. Regulation of p53 downsteam genes. *Sem. Cancer Biol.* 8:345-347 (1998).

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

Elizondo G, Ostrosky-Wegman P. Effects of metronidazole and its metabolites on histamine immunosuppression activity. *Life Sciences*, 59:285-297 (1996).

Erickson SH, Oppenheim GL, Smith GH. MTZ in breast milk. *Obstet. Gynecol.* 57: 48 (1981).

Evan GI, Voudsen KH. Proliferation cell cycle and apoptosis. *Nature*, 411:342-348 (2001).

-
- Ewan J, Chrystal T, Koch RL, McLafferty MA, Goldman P. Relationship between metronidazole metabolism and bacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18:566-573 (1980).
- Fahrig R, Engelke M. Reinvestigation of in vivo genotoxicity studies in man. I. No induction of DNA strand breaks in peripheral lymphocytes after metronidazole therapy. *Mutat Res.* 395:215-221 (1997).
- Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Res.* 148:29-36 (1985).
- Fenech M, Perepetskaya G, Mikhalevich L. A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations-experience from the Chernobyl catastrophe. *Environ Mol Mutagen.*30:112-118 (1997).
- Fields S, Jang SK. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science.* 249:1046-1049 (1990).
- Frasser AG, Sim R, Sankey EA, Dhillon AP, Pounder RE. Effect of eradication on *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell proliferation. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 8:167-173 (1994).
- Freeman CD, Klutman NE and Lamp KC. Metronidazole: a therapeutic review and uptake. *Drugs* 54: 679-708 (1997).
- Gonsebatt ME, Vega L, Montero R, García Vargas G, Del Razo LM, Albores A, Cebrian ME, Ostrosky-Wegman P. Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutation Res.* 313:293-299 (1994).
- Gross A, McDonnell JM, Stanley J, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899-1911 (1999).
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis- the p53 network. *J Cell Sci* 116:4077-4085(2003).
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 123:61-118 (1983).
- Heisterberg L, Branebjerg PE. Blood and milk concentrations of metronidazole in mothers and infants. *J. Perinat. Med.* 11: 114-20 (1983).

Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 25:177-181 (2004).

Houghton GW, Thorne PS, Smith J. Plasma metronidazole concentrations after suppository administration. In: Philips Y, Collier J, editors. MTZe: proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Infections. Academic Press, New York. Royal Society of Medicine, 41-44 (1979)

IARC. Evaluation of carcinogenic risk to human. Supplement 7, World Health Organization, Lyon France, pp 399-405 (1987).

Ings RMJ, McFadzean JA, Ormerod WE. The mode of action of MTZe in *Trichomonas vaginalis* and other micro-organisms. *Biochem. Pharmacol.* 23: 1421-1429 (1974).

Ivett JL, Tice RR. Average generation time: a new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetic. *Environ Mutagen* (abstract) 4:358 (1982).

Jensen JC, Gugler T. Single and multiple-dose MTZe kinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 34: 481-487 (1983).

Khambatta RB. Metronidazole in giardiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 65:487-489 (1971).

Kern SE, Kinzler KW, Baker SJ, Nigro JM, Rotter V, Levine AJ, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Mutant p53 proteins bind DNA abnormally in vitro. *Oncogene*. 6:131-136 (1991).

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA binding-protein. *Science*. 252:1708-1710 (1991).

Kokipii AMM, Myllyla VV, Hokkanen E, Jokipii L. Penetration of the blood barrier by MTZe and tinidazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 3: 239-245 (1977).

Lane DP. P53 guardian of genome. *Nature* 358:15-16 (1992).

La Russo NF, Tomas M, Müller M, Lipman R. In vitro interaction of metronidazole with nucleic acids. *Mol. Pharmacol.* 13:978-982 (1977).

Latt, SA. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:188-195 (1973).

Lau AH, Emmons K, Seligsohn R. Pharmacokinetics of intravenous MTZe at different dosages. *Int. J. Clin. Pharmacol.* 16: 384-386 (1974).

Ljungman M, Lane DP. Transcription-guarding the genome by sensing DNA damage. *Nat Rev Cancer* 4:727-736 (2004).

Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: Mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* 2:208-225 (2000).

Loft S, Dossing M, Poulsen HE, Sonne J, Olesen KL, Simonsen K, Andreasen PB. Influence of dose and route of administration on disposition of MTZe and its metabolites. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 30: 467-473 (1986).

Loft S. Metronidazole and antipyrine as probes for the study of foreign compound metabolism. *Pharmacol. Toxicol.* 66:3-31 (1990).

Lykkegaard-Nielsen N, Jutesen T. Excretion of metronidazole in human bile. Investigation of hepatic bile, common duct bile and gall bladder bile. *Scand. J. Gastroenterol.* 12:1002-1008 (1977).

Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res.* 56:2649-2654 (1996).

Mattila J, Männistö PT, Mäntylä R, Nykanen S, Lamminsivu U. Comparative pharmacokinetics of MTZe and tinidazole as influenced by administration route. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 721-725 (1983).

McCarthy MA, Michalski JP, Sears ES, McCombs CC. Inhibition of polyamine synthesis suppresses human lymphocyte proliferation without decreasing cytokine production or interleukine 2 receptor expression. *Immunopharmacol.* 20:11-20 (1990).

Meek DW. Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification?. *Oncogene.* Dec 13;18(53):7666-75 (1999).

Merluzzi VJ, Badger AM, Kaiser CW and Cooperband SR. In vitro stimulation of murine lymphoid cell cultures by levamisole. *J Clin Exp Immunol,* 22:486-490 (1975).

Menéndez D, Rojas E, Herrera LA, López MC, Sordo M, Elizondo G, Ostrosky-Wegman P. DNA breakage due to metronidazole treatment. *Mutation Research* 478:153-158 (2001).

Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gene. *Cell* 27:293-299 (1995).

Moller J, Hoffman B, Langhoff E, Damgard Jacobsen K, Odum N, Dickmeiss E, Ryder LP, Thastrup O, Sharff O, Foder B. Immunodeficiency after allogeneic bone marrow transplantation in man. Effect of phorbol ester (phorbol myristate acetate) and calcium ionophore (A23187) in vitro. *Scan. J. Immunol.* 30:441-447 (1989).

Moore RA, Beckthold B, Bryan LE. MTZe uptake in *Helicobacter pylori*. *Can. J. Microbiol.* 41:746-749 (1995).

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20:613-616 (1960).

Mudry MD, Martínez-Flores I, Palermo AM, Carballo MA, Egozcue J, García Caldes m. Embryo lethality induced by metronidazole in *Rattus norvegicus*. *Teratog Carcinog Mutagen.* 21:197-205 (2001).

Müller M. Mode of action of metronidazole on aerobic bacteria and protozoa. *Surgery* 93:165-171 (1983).

Munson A, Sanders V, Douglas K., Kauffman B, White. In vivo assessment of immunotoxicity. *Environ. Health Perspect.* 43:41-52 (1982).

Mutchinick O, Ruz L, Gonsebatt ME, Mauleon P, Lisker R, García G. Frequency and types of induced and spontaneous chromosome aberrations in relation to cell kinetics. *Human Genet.* 59(2):137-140 (1981).

Nasmyth, K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* Dec 6;274(5293):1643-5 (1996).

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Binger SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature.* 342:705-708 (1989).

Nouraini S, Six E, Matsuyama S, Krajewski S, Reed J. The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-XL. *Mol Cell Biol* 20:1604-1615 (2000).

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4:592-603 (2004).

O'keefe JP, Troc KA, Thompson KA. Activity of MTZe and its hydroxy and acid metabolites against clinical isolated of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22:426-430 (1982).

Orson FM, Saadeh CK, Lewis DE, Nelson DL. Interleukin 2 receptor expression by T cells in human aging. *Cell Immunol.* 124:278,291 (1989).

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

Ostrosky-Wegman P, Lares I, Santiago P, Elizondo G, Montero R. Metronidazole hprt mutation induction in sheep and the relationship with its elimination rate. *Mutat Res.* 307:253-259 (1994).

Ostrosky-Wegman P, Montero R, Hernández L, Ruiz L, Gasque L, Herrera LA, Ruiz M, Cortinas de Nava C, Rodríguez R. Lymphocyte proliferation kinetics as cytostatic screening system. *Env. Mol. Mutagen.* 11:80 (1988).

Passmore CM, McElany JC, Rainey EA, D'Arcy PF. Metronidazole excretion in human milk and its effect on the suckling neonate. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 26: 45-51 (1988).

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

Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 27:275-481(2002).

Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. A role for calcium in Bcl-2 action? *Biochimie* (2002) 84:195-201.

Powell SJ, McLeod AJ, Wilmont R, Eldson-Drew. Metronidazole in amoebic dysentery and hepatic liver abscess. *Lancet* 404-408 (1966).

Ralph ED, Clarke JT, Libke RD, et.al. Pharmacokinetics of MTZe as determined by bioassay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6: 691-696 (1974).

Ralph ED, Darwish R, Austin TW, Smith EA, Pattinson FL. Susceptibility of *Trichomonas vaginalis* strains to MTZe: response to treatment. *Sex. Transm. Dis.* 10: 119-122 (1983).

Raucy JL e Ingelman-Sundberg. Drug Metabolizing Enzymes in Lymphocytes. *J Biochem Molecular Toxicology*. 13:223 (1999).

Reisman D, Balint E, Loging T, Rotter V, Almon E. A novel transcript encoded within the 10Kpb first intron of the human p53 tumor suppressor gene (D17S2179E) is induced during differentiation of myeloid leukemia cells. *Genomics*.38:364-370 (1996).

Reisman D, Loging WT. Transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Sem. Cancer Biol*. 8:317-324 (1998).

Reisman D, Rotter V. Two promoters that map to 5'-sequences of the human p53 gene are differentially regulated during terminal differentiation of human leukemia cells. *Oncogene*. 4:945-953 (1989).

Rodl S, Fuchs G, Khoshsorur G, Iberer F, Tscheliessnigg KH. Lipoprotein-induced modulation of cyclosporine-a-mediated immunosuppression. *Eur. J. Clin. Invest*. 20:248-252 (1990).

Rojas E, Montero R, Herrera LA, Sordo M, Gonsebatt ME, Rodríguez R, Ostrosky-Wegman P. Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? *Mutation Research*. 282 :283-286 (1992).

Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor supresor protein. *Curr. Opin. Cell Biol*. 13:332-337 (2001).

Salazar AM. Mecanismos moleculares de la alteración proliferativa inducida por el arsénico. Tesis de Doctorado, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (1998).

Salazar AM, Ostrosky-Wegman P, Menéndez D, Miranda E, García-Carrancá A, Rojas E. Induction of p53 expression by sodium arsenite. *Mutat Res* 381:259-265 (1997).

Schmadel K, McEvory GK. Topical metronidazole: a new therapy for rosacea. *Clin. Pharm*. 9:94-101 (1990).

Schwartz DE, Jeunet F. Comparative pharmacokinetics studies of ornidazol and MTZ in man. *Chemotherapy*. 22: 19-29 (1976).

Semenza JC, Weasel LH. Molecular Epidemiology in environmental health: The potential of tumor suppressor gene p53 as a biomarker. *Environ. Health Perspecto*. 105 Suppl. 1:155-162 (1997).

Sharma R. Splenic lymphocyte transformation in culture as a tool for immunotoxicologic evaluations of chemicals, Immunologic considerations in toxicology, R. P. Sharma Ed., CRC Press, Florida, pp. 134-146 (1981).

Shaulsky G, Goldfinger N, Tosky MS, Levine AJ, Rotter V. Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene*. 6:2055-2065 (1991).

Soussi T, Caron de Fromental C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*. 5:945-952 (1990).

Soussi T, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J. Mol. Biol.* 260:623-637 (1996).

Stambaugh JE, Feo LG, Manthei RW. The isolation and identification of the urinary oxidative of metronidazole in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 161: 373-376 (1968).

Stewart ZA, Pietenpol JA. p53 signaling and cell cycle checkpoints. *Chem. Res. Toxicol.* 14:243-263 (2001).

Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope T, Wahl GM. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* 18:1660-1672 (1999).

Sturzbecher HW, Brai R, Addison C, Rudge K, Remm M, Grimaldi M, Keenan E, Jenkins JR. A C-terminal alpha helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene*. 7:1513-1523 (1992).

Sunshine GH, López-Corrales E, Hadden EM, Coffey RG, Wanebo H, Hadden JW and Rojas A. Modulation of host immune resistance in the prevention of treatment of induced neoplasia. *Fogarty International Proceeding, Washington*. 38 pp (1977).

Tally FP, Sutter VL, Finegold SM. MTZe versus anaerobes: in vitro data and initial clinical observations. *Calif. Med.* 117:22-26 (1972).

Teicher BA, Herman TS, Schulman L, Bublely G, Coleman CN, Frei E. Combination of metronidazole with cyclophosphamide and platinum complexes. *Cáncer Chemother. Pharmacol.* 28:153-158 (1991).

Templeton R. Metabolism and pharmacokinetics of metronidazole: a review. In: Finegold SM, McFadzean, JA, Roe FJC, editors. *Proceedings of the International*

Metronidazole Conference; 1976 May; Montreal. Amsterdam: Excerpta Medica, 28-48 (1977).

Ti TY, Lee HS, Khoo YM. Disposition of intravenous MTZe in Asia surgical patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2248-2251 (1996).

Tokino T, Thiagalingam S, El-Deiry WS, Waldmann T, Kinzler KW, Vogelstein B. p53 tagged sites from human genomic DNA. *Hum. Mol. Genet.* 3:1537-1542 (1994).

Tu YH, Wang Y, Allen Jr LV, Albers DD, Gorgin MK. Pharmacokinetics of metronidazole administered intravenously to male rats. *Int. J. Pharmaceut.* 61:119-125 (1990).

Unger T, Mietz JA, Scheffner M, Yee CL, Howley PM. Functional domains of wild-type p53 and mutant p53 proteins involved in transcriptional regulation, transdominant inhibition, and transformation suppression. *Mol. Cell Biol.* 13:5186-5194 (1993).

Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debusshe L. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J.* 17:4668-4679 (1998).

Vesell ES. Twin studies in pharmacogenetic. *Human. Genet.*, 1:19-30 (1978).

Visser AA, Hundt HKL. The pharmacokinetics of a single intravenous dose of MTZe in pregnant patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 13: 279-283 (1984).

Vogelstein B, Kenneth W, Kinzler. *The genetic basis of human cancer.* 8^a edición. McGraw-Hill New York (2002) 389-396.

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med* 10:789-799 (2004).

von Know L, Nord CE. Concentrations of tinidazole and metronidazole in serum saliva and alveolar bone. *J. Antimicrob. Chemother.* 10:165-172 (1982).

Wain HM, Lush MJ, Ducluzeau F, Khodiyar VK, Povey S. Genew: the Human Gene Nomenclature Database, 2004 updates. *Nucleic Acids Research* 32, Database issue:D255-D257 (2004).

Walder KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:15335-15340 (1996).

Wang P, Reed M, Wang Y, Mayr G, Stenger JE, Anderson ME, Schwedes JF, Tegrmaeyer P. p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol. Cell Biol.* 13:5182-5191 (1994).

Waterman JL, Shenk JI, Halazonetis TD. The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding. *EMBO J.* 14:512-519 (1995).

Whitcomb ME, Merluzzi VJ and Cooperband SR. The effect of levamisole on human lymphocyte mediated production in vitro. *Cell Immunol.* 21:272-277 (1976).

WHO. Environmental Health Criteria 46, Guidelines for the Study of Genetic Effects in Human Populations, World Health Organization, Geneva pp. 29-43 (1985).

Williams CS, Woodcock KR. Do ethanol and metronidazole interact to produce a disulfiram like reaction?. *Ann Pharmacother* 34:255-257 (2000).

Wilson RL, Cramp WA, Ings RM. Metronidazole ("Flagyl"): mechanisms of radiosensitization. *Int. J. Radiat. Biol.* 26:557 (1974).

Zelikoff J, Smialowicz R, Bigazzi PE, Goyer RA, Lawrence DA, Maibach HI, Gardener D. Immunomodulation by Metals, *Fund. And Appl. Toxicol*, 22:1-7 (1994).