

Revisión / Revision

LOS NITROIMIDAZOLES COMO MODELO DE MUTAGÉNESIS QUÍMICA Y MUERTE CELULAR

NITROIMIDAZOLES AS A MODEL FOR CHEMICAL MUTAGENESIS AND CELL DEATH

MARCELA MABEL LÓPEZ NIGRO*, MARTA ANA CARBALLO

CIGETOX (Citogenética Humana y Genética Toxicológica), INFIBIOC (Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica),
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

* Junín 956, C.P. 1113, C.A.B.A., Argentina, Tel. / Fax: +5411 5950-8707/ 5950-8691, mmllopeznigro@gmail.com

RESUMEN

Los derivados 5-nitroimidazólicos constituyen un grupo bien caracterizado de agentes antibacterianos muy utilizados en la terapéutica humana. Estos agentes inhiben el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias y algunos protozoos tales como *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. En el presente trabajo se presentan los resultados correspondientes a una evaluación de la actividad genotóxica potencial, mediante ensayos citogenéticos, de tres derivados Metronidazol (MTZ), Ornidazol (ONZ) y Tinidazol (TNZ), en sus dosis de uso terapéutico, para contribuir con la evaluación de riesgo de su consumo. Los estudios se llevaron a cabo en cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica, utilizando 4 concentraciones diferentes 0,1, 1, 10 y 50 µg/ml, utilizando como biomarcadores de efecto el Índice Mitótico (IM), la Cinética de Proliferación Celular expresado como Índice de Replicación (IR), el Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) y la frecuencia de Aberraciones Cromosómicas (AC). Los resultados muestran una disminución significativa en el IM ($p < 0,001$), así como un incremento en la frecuencia de ICH ($p < 0,001$) y AC ($p < 0,001$). No se encontraron modificaciones en el IR. Estos resultados muestran un efecto cito y genotóxico para los tres derivados, relacionados con procesos de muerte celular. Para corroborar esta hipótesis se realizaron estudios de fragmentación del ADN (laddering), microscopía de fluorescencia mediante tinción con Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio y citometría de flujo con Ioduro de Propidio. Se puede concluir que estos derivados modulan la muerte celular mediante mecanismos apoptóticos en las condiciones de ensayo utilizadas.

Palabras clave: Genotoxicidad, nitroimidazoles, muerte celular, biomarcadores.

ABSTRACT

5-nitroimidazoles are a well-established group of antiprotozoal and antibacterial agents. Thanks to their antimicrobial activity these chemotherapeutic agents inhibit the growth of both: anaerobic bacteria and certain anaerobic protozoa, such as *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. The aim of the present study is to achieve a precise characterization of the genotoxic activity of these compounds and to establish the value of cytogenetic assays in order to determine the effect of these drugs, at therapeutic doses, to settle an improved risk assessment. Three nitroimidazole were studied, Metronidazole, Ornidazole and Tinidazole, at four different concentrations (0.1, 1, 10 and 50 µg/ml of peripheral blood lymphocyte culture). Endpoints analyzed included: Mitotic Index (MI), Replication Index (RI), Sister Chromatid Exchange (SCE) and Chromosomal Aberrations (CA). An analysis of variance test (ANOVA) was performed to evaluate the results. A significant decrease ($p < 0.001$) in MI as well as an increase in SCE ($p < 0.001$) and CA (0.001) frequencies for the three drugs was observed. No modifications in RI were found. The results suggest a genotoxic and cytotoxic effect of MTZ, ONZ and TNZ related with cell death process. Therefore we decided to evaluate this mechanism by DNA fragmentation (laddering), fluorescence microscopy using the

acridine orange/ethidium bromide staining and flow cytometry (Propidium Iodide). We conclude that these drugs are able to modulate cell death by apoptotic mechanisms in the experimental design employed.

Keywords: genotoxicity, nitroimidazole, cell death, biomarkers.

Recibido: 14.08.08. Revisado: 10.09.08. Aceptado: 12.09.08.

EXPOSICIÓN TERAPÉUTICA. AGENTES ANTIMICROBIANOS: NITROIMIDAZOLES

Las drogas antimicrobianas ocupan un lugar singular en la historia de la medicina. La teoría de los gérmenes causantes de enfermedades fue el vehículo de una gran revolución en esta disciplina, así como los procedimientos asépticos y las drogas antisépticas fueron sus agentes. Las primeras drogas antimicrobianas sistémicas revolucionaron el tratamiento de ciertas infecciones por protozoos, en especial la sífilis, pero se generó una segunda etapa de grandes avances luego de la aparición de la sulfamilamida y la penicilina (Nichols, 1999).

Entre los compuestos nitroheterocíclicos con actividad biológica se incluye a nitrofuranos y nitroimidazoles. El primer compuesto nitroheterocíclico empleado en medicina humana por sus propiedades antibacterianas fue la Nitrofurazona, un derivado nitrofurano. Durante las dos guerras mundiales, este agente se utilizó en aplicaciones tópicas para el tratamiento de quemaduras y heridas. El descubrimiento de estos efectos estimuló el interés hacia las drogas nitroheterocíclicas como agentes quimioterapéuticos (Raether y Hänel, 2003).

En los laboratorios Rhone-Poulenc de Francia se obtuvo un extracto de *Streptomyces spp.* el cual presentaba actividad contra *Trichomonas vaginalis*. En dicho extracto se identificó como componente a la Azomycina, un nitroimidazol (2 nitro-1H-imidazol). Este descubrimiento abrió el camino a la sín-

tesis química y pruebas biológicas de numerosos nitroimidazoles.

Entre los primeros compuestos sintetizados se puede mencionar al Metronidazol, 1-(2-hidroxiethyl)-2-metil-5-nitroimidazol (MTZ). Desde entonces y sobre todo entre los años 1970 y 1975 se sintetizó una amplia variedad de 4- y/o 5-nitrocompuestos con distintos sustituyentes en posición 1 y 2, tales como Flunidazol, Ronidazol, Tinidazol, Ornidazol, entre otros.

Metronidazol (MTZ) demostró ser activo tanto *in vivo* como *in vitro* no sólo contra *Trichomona vaginalis*, sino también *Entamoeba histolítica* y *Giardia lamblia*, agentes causales de la disentería amebiana y síndrome de mala absorción respectivamente (Zaat *et al.*, 1997; Petrin *et al.*, 1998). El mismo reveló ser altamente eficaz frente a una gran variedad de patógenos anaerobios incluyendo bacterias gram-negativas como bacteroides y gram-positivas como *Clostridium* (Freeman *et al.*, 1997). En la actualidad MTZ es un medicamento relativamente económico y altamente empleado en el ámbito hospitalario no sólo en la prevención de infecciones previo y posterior a cualquier procedimiento quirúrgico sino también como agente profiláctico contra infecciones anaeróbicas luego de cirugías del tracto intestinal, en el tratamiento de abscesos y colitis asociadas a *Clostridium difficile* (Chambers, 2001). Además es un compuesto eficaz en la terapia contra *Helicobacter pylori*, la causa más importante de gastritis y factor de riesgo de cáncer estomacal (Falagas *et al.*, 1998). MTZ es considerado por muchos

como el antibiótico “standard” contra el cual otros agentes con actividad anaeróbica deberían ser comparados (Raether y Hänel, 2003).

Compartiendo el mismo espectro terapéutico del MTZ se encuentran derivados nitroimidazólicos tales como el Tinidazol (TNZ), Ornidazol (ONZ) y Secnidazol, los cuales son empleados mayormente en la terapéutica de humanos. En cambio compuestos como Ronidazol, Iprnidazole y Dime-tridazol son utilizados en diversas enfermedades parasitarias en el ámbito veterinario (Ré *et al.*, 1997). Básicamente todas las drogas 5-nitroimidazólicas presentan actividad contra una amplia variedad de protozoos anaerobios como también bacterias anaerobias y microaerófilas. Y dado que penetran con gran facilidad diversos tejidos tales como huesos, articulaciones e incluso sistema nervioso central, donde adquieren concentraciones clínicas efectivas, estos derivados son empleados en el tratamiento de infecciones de oído, nariz, garganta, sistema respiratorio (pulmón y pleura), tracto gastrointestinal, sistema urogenital, piel (dermatitis perioral, acné, rosácea), sistema nervioso central, septicemia, endocarditis o tromboflebitis causadas por bacterias anaerobias obligadas (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Helicobacter*) (Lamp *et al.*, 1999; Raether y Hänel, 2003).

Entre los compuestos empleados en la terapéutica humana, MTZ es el compuesto de uso más extenso y aprobado en Estados Unidos por la FDA (Food and Drug Administration) (Freeman *et al.*, 1997). Por su parte en este mismo país recientemente se ha aprobado la licencia de comercialización para TNZ, mientras que ONZ sólo se considera su uso a nivel investigación para determinadas patologías. Sin embargo, en otros países y en especial en Latinoamérica, TNZ y ONZ, conjuntamente con Secnidazol y Nimorazol son ampliamente utilizados (Gillis y Wiseman, 1996). La elección de una

droga respecto de otra depende de la longitud del tratamiento terapéutico y el intervalo de administración necesario.

5-NITROIMIDAZOLES: FARMACOCINÉTICA, BIOTRANSFORMACIÓN Y GENOTOXICIDAD

Los nitroimidazoles presentan una estructura química compuesta por un anillo imidazólico en el cual un grupo nitro se ubica en posición 5. Diferencias en los sustituyentes presentes en N1 y C2 de este anillo le confieren propiedades particulares a la molécula que se traducen en modificaciones de su farmacocinética. Las formulaciones de estos compuestos disponibles en el mercado farmacéutico son oral, endovenosa, intravaginal y administración tópica. Sin embargo en la literatura los parámetros farmacocinéticos principalmente están referidos a la administración oral y endovenosa (Raether y Hänel, 2003).

Luego de su administración oral, estos nitroimidazoles se absorben de manera rápida y completa, presentando una biodisponibilidad mayor al 90%. Es posible observar una concentración plasmática de 40-51 mg/ml dentro de las 2 horas posteriores a una dosis de 2 g por vía oral. Su unión a proteínas plasmáticas o globulina es muy baja, en promedio menor al 20% de la concentración plasmática total (MTZ 10%; TNZ 12%; ONZ 15%). Presentan muy buena capacidad de penetración tisular y amplia distribución en cuerpo y fluidos corporales. Esto permite que se alcancen concentraciones semejantes en plasma y otros tejidos, incluso sistema nervioso central y leche materna (la concentración en placenta suele ser relativamente menor) (Raether y Hänel, 2003; PR Vademecum, 2007). La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de cada compues-

to en plasma depende de la naturaleza del mismo, siendo en promedio para MTZ de 8 hs. y 14 hs. para TNZ y ONZ. Es decir, TNZ y ONZ permanecen en plasma por más tiempo, hecho que fundamenta la elección de éstos respecto de MTZ a la hora de reducir frecuencia o dosis de administración con el fin de obtener el mismo efecto antimicrobiano (Lamp *et al.*, 1999).

Los mencionados nitroimidazoles se metabolizan principalmente en hígado por medio de enzimas de la familia Citocromo P 450 (CYP). En términos generales, el camino metabólico principal refiere la oxidación de las cadenas alifáticas laterales de estos compuestos, obteniéndose así metabolitos oxidados (hidroxilados y acetilados). Parte de estos metabolitos y la molécula parental es conjugada (sulfato y glucurónico derivados) eliminándose por vía urinaria y heces junto con aquellos metabolitos libres. Los datos hallados en la literatura respecto de TNZ son discordantes. Se indica que TNZ es metabolizado en menor grado que MTZ y ONZ previo a su eliminación; aunque sí se han detectado metabolitos hidroxilados, N-oxidados y de migración del grupo nitro (Espinosa-Aguirre *et al.*, 1996; Bendesky *et al.*, 2002; Raether y Hänel, 2003).

En los organismos anaerobios y microaerófilos el grupo nitro de estos agentes quimioterapéuticos se reduce dando un radical aniónico altamente reactivo (Freeman *et al.*, 1997; Gardner y Hill, 2001), que por sucesivas reducciones enzimáticas conducen a la formación de hidroxilamina y amina primaria (Edwards, 1993), formándose radicales tóxicos capaces de reaccionar directamente con componentes celulares esenciales (ADN y otras biomoléculas vitales) inhibiendo el mecanismo de respiración microbiano (Raether y Hänel, 2003).

Datos hallados en la literatura indicarían que, si bien el primer paso metabólico es la

formación de un radical anión nitro, en presencia de oxígeno este radical sería reoxidado con la consiguiente generación de anión superóxido. Este ciclo denominado “ciclo fútil” sería el generador de especies activadas del oxígeno sin pérdida de la molécula parental. Posteriormente, luego de la formación del anión superóxido, en presencia de SOD (superóxido dismutasa) y trazas de iones metálicos como Fe^{2+} y Cu^{2+} , se llevarían a cabo reacciones que conducirían a la formación de radical hidroxilo (Ré *et al.*, 1997).

La actividad genotóxica de los distintos nitroimidazoles se ha estudiado por medio de diferentes ensayos *in vivo* e *in vitro*. Particularmente MTZ es el compuesto sobre el cual la mayor parte de estas investigaciones han detenido su atención. MTZ demostró ser un potente mutágeno en sistemas bacterianos aunque menos en sistemas eucariotas (Dobías *et al.*, 1994; Espinosa-Aguirre *et al.*, 1996). Se ha indicado que es capaz de unirse y dañar al ADN (Tocher y Edwards, 1994), inducir roturas de simple y doble cadena preferentemente en clusters de adenina timina (Edwards, 1993), formar aductos con citosina y guanina, causar sustitución de pares de bases de tipo GC/ÆCG y rotura de la cadena de ADN (Trinh y Reyses, 1998). Los productos derivados del metabolismo de MTZ (principalmente su hidroxiderivado) también han mostrado actividad mutagénica en bacterias (De Meo *et al.*, 1992).

La actividad clastogénica observada por MTZ podría ser el resultado de rupturas en la cadena de ADN no reparadas que se expresarían a nivel cromosómico como producto de la mitosis celular (Horváthová *et al.*, 1998). En estudios desarrollados *in vivo* e *in vitro* utilizando biomarcadores citogenéticos se concluyó que MTZ induce un marcado incremento de aberraciones cromosómicas.

sómicas y anafases anormales en células de la línea CHO y de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica y médula ósea de ratón (Mudry *et al.*, 1994). Otras investigaciones realizadas en roedores evidenciaron un incremento de aberraciones cromosómicas y micronúcleos, infertilidad en machos, incremento de muertes postimplantacionales y la inducción de dominantes letales en las condiciones de ensayo (Mudry *et al.*, 2001; El-Nahas y El-Ashmawy, 2004).

Los resultados obtenidos a través de estudios de genotoxicidad en poblaciones humanas expuestas son desconcertantes (IARC, 1987), ya que se reporta ausencia de respuesta mutagénica o clastogénica (Dobías *et al.*, 1994; Fahrig y Engelke, 1997) así como incremento en el daño a la molécula de ADN (Elizondo *et al.*, 1996; Menéndez *et al.*, 2001) y modificaciones en la cinética de proliferación celular (CPC) (Carballo *et al.*, 2004).

Los ensayos de carcinogénesis realizados en ratones tratados con MTZ demostraron diferente susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de pulmón, así como un incremento en la frecuencia de linfomas malignos, hepatomas y tumores mamarios, pituitarios y testiculares (Cavaliere *et al.*, 1983; 1984). A su vez también se han reportado efectos teratogénicos en *Drosophila melanogaster* y *Rattus norvegicus* (Mudry *et al.*, 2001; Palermo *et al.*, 2004). De este modo existe evidencia suficiente para considerar a MTZ como carcinógeno animal y en este sentido el IARC lo ha clasificado como tal (World Health Organization, WHO, 1999).

Se han realizado diferentes estudios epidemiológicos en humanos con el fin de evaluar el potencial efecto carcinogénico de MTZ. Estos estudios se enfrentan a la dificultad del seguimiento de la población expuesta por períodos prolongados de tiempo (IARC, 1987). Si bien en muchos de ellos

dicho seguimiento se ha realizado por períodos que van entre 2,5 a 11 años, se sabe que para muchos carcinógenos químicos dicho período oscila entre 20 y 30 años (Taningher *et al.*, 1999). No obstante, existen otros estudios en los cuales el período de observación es más extenso y los datos obtenidos revelan un incremento significativo del riesgo de cáncer de pulmón luego de 15-25 años del tratamiento con MTZ (Beard *et al.*, 1988) así como de neuroblastoma en niños expuestos durante la vida fetal (Thapa *et al.*, 1998).

TNZ y ONZ son compuestos desarrollados poco después de MTZ y compartirían su actividad genotóxica, ya que sus propiedades antimicrobianas y genotóxicas provendrían de la reducción del grupo nitro de estos derivados (Dobias *et al.*, 1994). Sin embargo existe poca información acerca de la capacidad de estos dos agentes de ocasionar daño primario al ADN en dosis terapéuticas. Algunos autores han reportado inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón y resultados positivos en Test de Ames en cepas *Salmonella typhimurium* TA 100 (Gupta *et al.*, 1996) y *Klebsiella pneumoniae* (Voogd *et al.*, 1977). Además se ha sugerido que su actividad mutagénica sería dos veces la de MTZ (Coulter y Turner, 1978) observándose un incremento de la misma luego de la activación con S9 mix (Gupta *et al.*, 1996). La orina de pacientes bajo tratamiento con TNZ también mostró Test de Ames positivo en *Salmonella typhimurium* TA 100 (Espinosa-Aguirre *et al.*, 1996).

En cuanto a ONZ, los datos reportados en la literatura acerca de su potencial genotoxicidad son aún más escasos. Este derivado nitroimidazólico y sus metabolitos obtenidos de orina y sangre de pacientes bajo tratamiento con esta droga mostraron actividad genotóxica aunque la misma sería menor que la de MTZ (Cerna *et al.*, 1990).

MARCADORES BIOLÓGICOS DE GENOTOXICIDAD Y MUERTE CELULAR

Los derivados 5-nitroimidazólicos son compuestos ampliamente utilizados en la terapéutica mundial. Son agentes empleados desde la infancia a la edad adulta, en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos anaerobios y microaerófilos así como por protozoos anaerobios. Es decir, su aceptación es tan amplia que son utilizados en la mayoría de los servicios hospitalarios en las unidades de pediatría, ginecología y cirugía (Raether y Hänel, 2003).

Sin embargo estos derivados imidazólicos constituyen en nuestro medio un claro ejemplo de compuestos que, siendo considerados inocuos, exhiben efecto genotóxico en modelos experimentales. Si bien la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) sostiene que existen evidencias suficiente para considerar al MTZ como carcinógeno en modelos animales, los datos sobre la carcinogenicidad en humanos son ambiguos (Bendesky *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se seleccionaron los tres nitroderivados de mayor importancia en la terapia clínica, MTZ, ONZ y TNZ, presentando los resultados obtenidos de una evaluación de genotoxicidad a fin de contribuir con su caracterización. Para la selección de las dosis a ensayar, se tuvo en cuenta las concentraciones plasmáticas que se alcanzan bajo condiciones terapéuticas. Por lo tanto el barrido de concentraciones comprende 0.1, 1, 10 y 50 µg/ml de cultivo. Asimismo, se ensayaron los controles correspondientes teniendo en cuenta que las diluciones se realizaron en agua destilada estéril.

El sistema elegido para realizar la batería de ensayos de cito y genotoxicidad fue el cultivo de linfocitos de sangre periférica de dadores sanos. Este tipo celular posee una serie de ventajas como la homogeneidad de la duración del ciclo celular, la estabilidad

del cariotipo (Preston *et al.*, 1987) y la expresión de oxidasas de función mixta como sistema metabólico (Singh y Clausen, 1981).

Algunos biomarcadores tienen gran aceptación entre los especialistas, y se encuentran validados por organismos internacionales como ensayos indicadores de genotoxicidad. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) ha publicado los protocolos validados para la realización de tales ensayos y son los ejes referenciales en todo el mundo para la comparación de datos provenientes de distintas fuentes y el establecimiento de las características nocivas potenciales de una sustancia (EPA, 2003).

Entre los biomarcadores considerados de interés para la presente evaluación se citan: Índice Mitótico (IM), Cinética de Proliferación Celular expresada como Índice de Replicación (IR), Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) y Aberraciones Cromosómicas (AC). A fin de realizar un diseño experimental integrado, se empleó la técnica de tinción diferencial FPG (Fluorescence plus Giemsa) descrita por Perry y Wolff (1974), adicionando al cultivo de linfocitos BrdU (Bromo deoxiuridina).

Asimismo, para relacionar el potencial efecto citotóxico inducido por MTZ, ONZ y TNZ con procesos de muerte celular, se analizaron diferentes marcadores del proceso apoptótico: a) análisis de la fragmentación de ADN por electroforesis en gel de agarosa (Miller *et al.*, 1988); b) caracterización morfológica y viabilidad celular por tinción con naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE) y observando con microscopio de fluorescencia (Cohen y Duke, 1992); y c) análisis del contenido de ADN hipodiploide por citometría de flujo, utilizando una solución hipotónica de yoduro de propidio (Nicoletti *et al.*, 1991). Para esta evaluación se establecieron cultivos de linfocitos de 48 hs. de incubación y las concentraciones ensayadas de cada uno de los nitroderivados fueron 10 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Desde el punto de vista de la salud los potenciales riesgos carcinogénicos asociados a un agente terapéutico deben ser considerados frente a los beneficios que se obtengan de cada tratamiento individual. Los compuestos químicos pueden interactuar directa o indirectamente sobre el ADN, produciendo cambios que afecten el funcionamiento celular y que a largo plazo causen trastornos en la salud, particularmente transformaciones malignas. De ahí la importancia de detectar dicha acción sobre el material genético en sus etapas iniciales (Tucker y Preston, 1996).

Según reportes de la literatura IM e IR, conjuntamente con otros marcadores biológicos son indicadores adecuados de la proliferación celular en estudios de genotoxicidad. Se los considera marcadores útiles y sensibles para determinar la acción citotóxica y citostática de diversos contaminantes ambientales y agentes terapéuticos (Carrano y Natarajan, 1998). Por su parte, IR es un parámetro que permite diferenciar drogas que inducen muerte celular de aquellas que inducen un efecto citostático por detener el ciclo celular en alguna de sus fases (Rojas *et al.*, 1993). En nuestras condiciones de ensayo, la evaluación de la capacidad proliferativa evidenció que ONZ, MTZ y TNZ inducen una disminución estadísticamente significativa (ANOVA $p < 0,001$) de la frecuencia de mitosis. Este efecto citotóxico exhibió un comportamiento dependiente de la dosis (r^2 ONZ= 0,95; r^2 MTZ=0,96; r^2 TNZ=0,94) (Fig. 1). Paralelamente, el análisis de los resultados obtenidos sobre la cinética de proliferación celular, expresado como IR, determinó que la adición de ONZ, MTZ o TNZ al cultivo de linfocitos no produce modificaciones estadísticamente significativas de la velocidad del ciclo celular con respecto a los valores control (ANOVA $p > 0,05$) (datos no presentados). Por lo tan-

to, la ausencia de un comportamiento citostático sugiere que la citotoxicidad inducida por ONZ, MTZ y TNZ estaría relacionada a procesos de muerte celular.

La frecuencia de ICH es una de las técnicas básicas empleadas en dosimetría biológica para evaluar la respuesta citogenética a la exposición a agentes químicos (Tucker y Preston, 1996). En nuestras condiciones experimentales se observó un incremento estadísticamente significativo (ANOVA $p < 0,001$) de la frecuencia de ICH en cultivos expuestos a distintas concentraciones de ONZ, MTZ y TNZ respecto de la frecuencia registrada en cultivos control (Fig. 2). A su vez, la valoración del coeficiente de correlación entre este biomarcador y las concentraciones de los derivados indicó que existe una correlación lineal para cada uno de ellos (r^2 ONZ= 0,95; r^2 MTZ=0,98; r^2 TNZ=0,97). De lo expuesto se concluye que bajo las condiciones ensayadas los tres derivados nitroimidazólicos inducen inestabilidad cromosómica.

Las AC son cambios en la estructura cromosómica, resultado de ruptura o intercambio de material cromosómico y tradicionalmente se las reconoce como un importante biomarcador de exposición humana a radiaciones ionizantes y agentes químicos considerados genotóxicos (Natarajan, 2002). Los resultados obtenidos en nuestra evaluación se expresan en la Fig. 3. Allí se observa que ONZ, MTZ y TNZ indujeron un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas en todas las concentraciones ensayadas (ANOVA $p < 0,001$). Particularmente, se observó que el tipo de aberraciones cromosómicas detectadas corresponde en su mayoría a roturas de tipo cromátide. Asimismo, el tratamiento con los diferentes nitroimidazoles exhibió un comportamiento lineal dosis-respuesta (r^2 ONZ = 0,95; r^2 MTZ= 0,92; r^2 TNZ= 0,89).

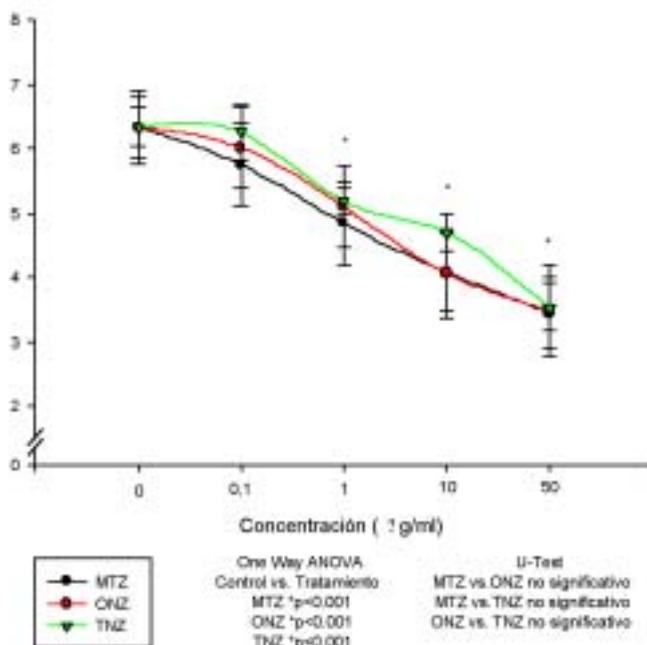


Figura 1. Evaluación de Índice Mitótico en cultivos de linfocitos de sangre periférica expuestos a distintas concentraciones de MTZ, ONZ y TNZ durante 72 horas a 37°C.

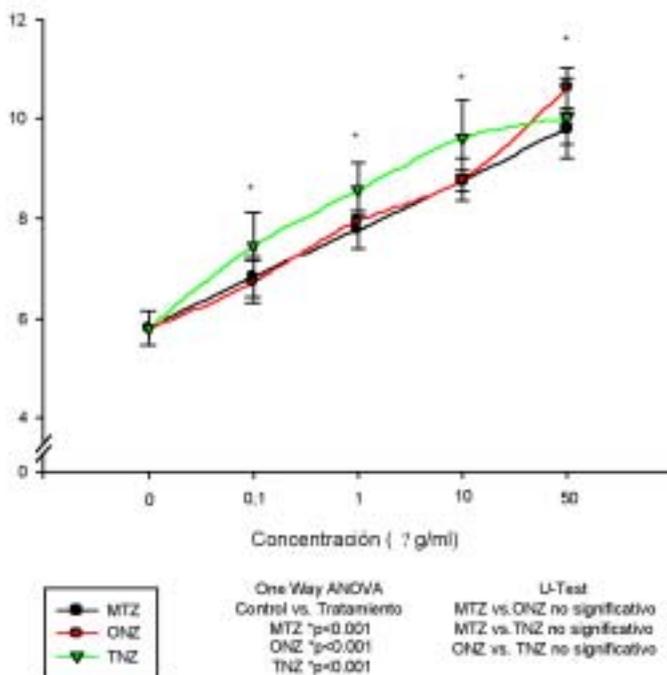


Figura 2. Frecuencia de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) en cultivo de linfocitos de sangre periférica expuestos a distintas concentraciones de MTZ, ONZ y TNZ durante 72 horas a 37°C.

Al realizar un análisis comparativo de los tres derivados nitroimidazólicos para cada uno de los dosímetros biológicos evaluados, se observa que no existe un comportamiento diferencial entre MTZ, ONZ y TNZ para IM, IR e ICH. La evaluación comparativa del último biomarcador, AC, sugiere que ONZ y TNZ no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí en cuanto a la inducción de daño al material genético. En particular, MTZ exhibe un compor-

tamiento semejante a ambos para las dosis evaluadas excepto la mayor de ellas (50 µg/ml), donde este compuesto induce un mayor efecto clastogénico (U-Test $p=0,01$) (Fig. 3).

En este punto podemos sugerir que MTZ, ONZ y TNZ inducen un efecto citotóxico el cual podría estar relacionado con muerte celular. Esta hipótesis adquiere mayor fuerza al considerar el incremento del daño genotóxico observado y expresado como AC.

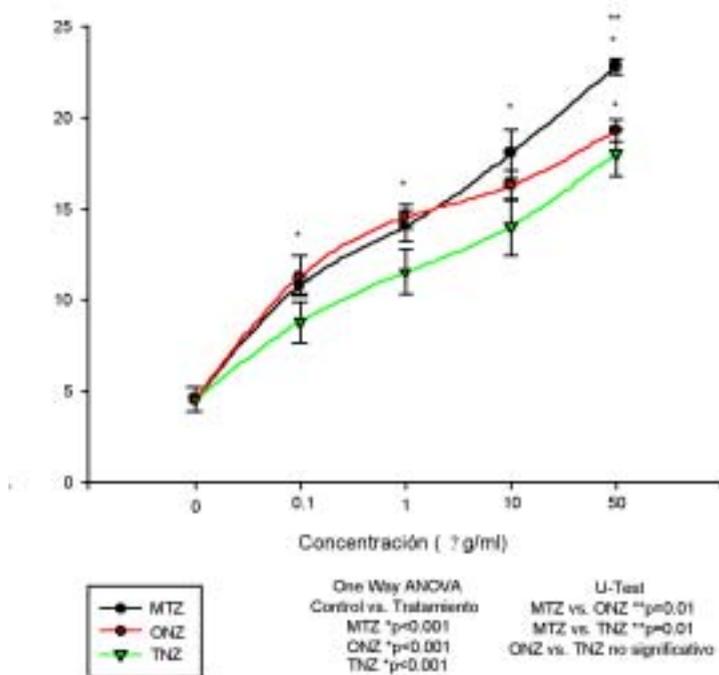


Figura 3. Porcentaje de células con aberraciones cromosómicas (AC) en cultivo de linfocitos humanos expuestos a distintas concentraciones de MTZ, ONZ y TNZ durante 72 horas a 37°C.

Este comportamiento podría vincularse a la interacción directa del xenobiótico con el ADN o a la acción indirecta del mismo sobre biomoléculas relacionadas tales como enzimas o diversas proteínas. De hecho, muchos de los eventos que dan lugar a pérdidas de material genético en mitosis o aque-

llos que inhiben la normal segregación del mismo en anafase, son inductores de muerte celular (Tucker y Preston, 1996). Por lo tanto, en este contexto hemos decidido evaluar el mecanismo de muerte celular por medio de diferentes indicadores.

La apoptosis se describe como el resultado de numerosos eventos morfológicos y moleculares. La mayor parte de los ensayos para determinar la apoptosis están basados en detectar sus evidencias morfológicas o la visualizar el clivaje de ADN internucleosomal (laddering) (Kravtsov *et al.*, 1999). En nuestro estudio, la electroforesis en gel de agarosa del ADN de células tratadas con los distintos nitroderivados permitió identificar la degradación del mismo en fragmentos de bajo peso molecular (nucleosomas y múltiplos de oligonucleosomas). Este rasgo se observó claramente luego de 48 hs. de incubación con cualquiera de los agentes en estudio. Por su parte los cultivos de células control no presentaron dicha fragmentación de ADN durante el mismo período de incubación (Fig. 4). Es decir que se registró una modificación

en el tiempo de aparición del laddering, ocurriendo a tiempos más cortos en expuestos a MTZ, ONZ y TNZ, que los observados en forma espontánea para cultivos control. En términos comparativos, no se observaron diferencias en el patrón de fragmentación de ADN inducido por los tres nitrocompuestos; sin embargo sí se observó una leve diferencia entre las distintas concentraciones ensayadas, siendo 100µg/ml la que presentó mayor fragmentación (Fig. 4).

Dado que la sola presencia de fragmentación de ADN no permite establecer la total participación de mecanismos apoptóticos, se llevó a cabo el análisis morfológico y de viabilidad celular empleando microscopía de fluorescencia. En los cultivos control se observó la presencia de células con citoplasma intacto y núcleo con su estructura cromatí-

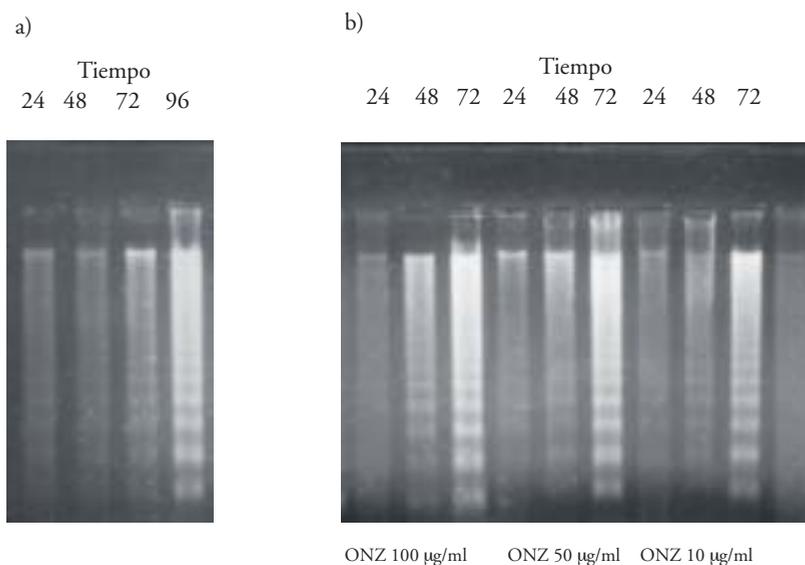


Figura 4. Fragmentación internucleosomal obtenida por electroforesis en gel de agarosa (1,8%). a) Patrón de fragmentación de ADN espontáneo obtenido de cultivos control; b) Fragmentación de ADN de cultivos de linfocitos tratados con ONZ (10, 50 y 100 µg/ml) a distintos tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas).

nica organizada. Por el contrario, los cambios morfológicos nucleares y citoplasmáticos se observaron en los cultivos expuestos a los distintos derivados. En ellos se evidenciaron rasgos típicamente apoptóticos: disminución del tamaño celular, condensación de la cromatina, formación de agregados cromatínicos y fragmentación nuclear. También se observó la aparición gemaciones citoplasmáticas (blebbing) como consecuencia de las alteraciones del citoesqueleto (Fig. 5). El incremento de la concentración de cada uno de los derivados coincidió con la aparición de estas características morfológicas, como

así también con la disminución del porcentaje de viabilidad celular. Los cultivos expuestos presentaron un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de células no viables (muertas) respecto a los controles (ANOVA $p < 0,001$) (Fig. 6).

Las células apoptóticas dan lugar a pequeños fragmentos con menor contenido de ADN que el correspondiente a la población celular normal (diploide). Así empleando un fluorocromo con afinidad específica por el ADN (IP) y efectuando el análisis por citometría de flujo es posible identificar el ADN hipodiploide correspondiente a las células que

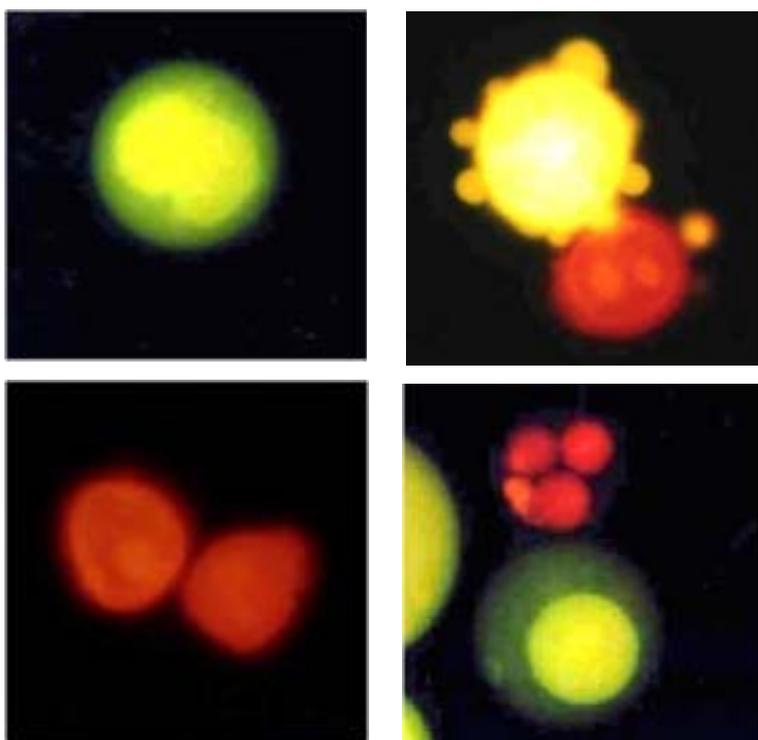


Figura 5. Análisis morfológico de células mononucleares coloreadas con naranja de acridina y bromuro de etidio. a) célula control; b) gemaciones citoplasmáticas (blebbing) y condensación cromatínica inducida por TNZ 10 $\mu\text{g/ml}$; c) condensación cromatínica inducida por MTZ 50 $\mu\text{g/ml}$; d) presencia de células viables con circularización nuclear y muerte celular inducida por ONZ 10 $\mu\text{g/ml}$.

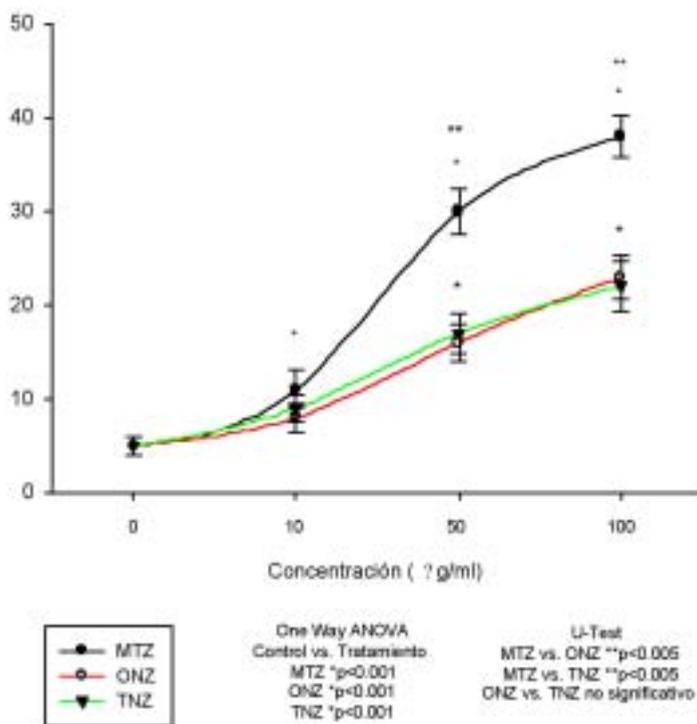


Figura 6. Viabilidad celular en cultivo de células mononucleares expuestas a distintas concentraciones de MTZ, ONZ y TNZ (10, 50 y 100 µg/ml) durante 48 horas a 37°C mediante análisis con microscopio de fluorescencia y tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio.

entran en apoptosis (Sub G1) (Darzynkiewicz *et al.*, 1997). En la Figura 7 se observa el incremento estadísticamente significativo de la población hipodiploide en cultivos tratados respecto de los cultivos control (ANOVA $p < 0,001$). Este comportamiento coincide con los hallazgos anteriormente descriptos.

El análisis comparativo sugiere que el tratamiento con dosis 50,0 y 100 µg/ml de MTZ exhibe un mayor efecto apoptótico respecto a ONZ y TNZ a la misma concentración (U-Test $p < 0,005$). Por su parte, ONZ y TNZ no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre si (Figs. 6 y 7).

Por lo tanto, en las condiciones de ensayo y como consecuencia del efecto cito y genotóxico inducido por MTZ, ONZ y TNZ, el proceso de muerte celular evidenciado tendría características predominantemente apoptóticas. Éste se desarrollaría con la misma cinética de aparición y guardando un comportamiento dependiente de la dosis para los tres derivados evaluados. Probablemente la reparación incompleta del daño cromosómico generado esté asociada a la activación de este programa de muerte celular. A su vez de todo lo expuesto se desprende que en nuestro diseño experimental,

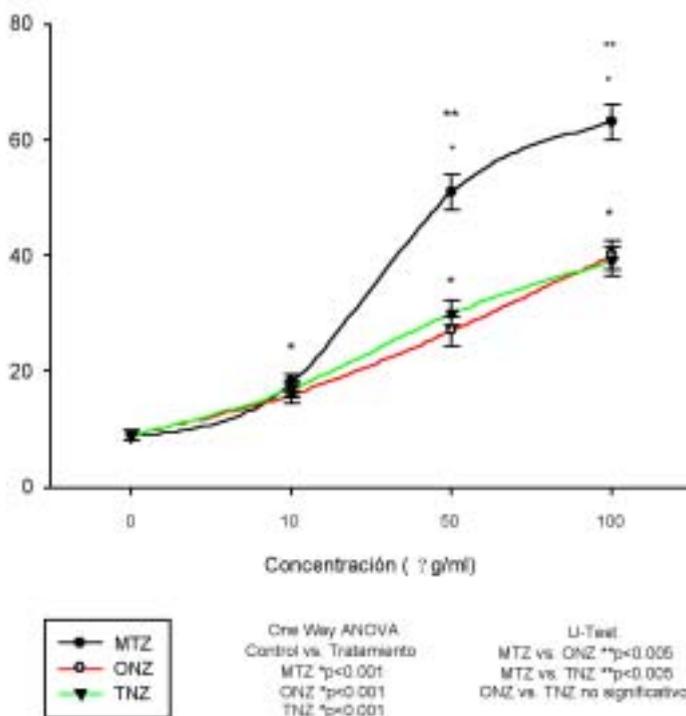


Figura 7. Porcentaje de núcleos hipodiploides en cultivos de células mononucleares expuestas de distintas concentraciones de MTZ, ONZ y TNZ (10, 50 y 100 µg/ml) durante 48 horas a 37°C mediante análisis por citometría de flujo y tinción con ioduro de propidio.

MTZ mostró un componente apoptótico más acentuado.

La valoración de los cambios citogenéticos *in vitro* es considerada el paso inicial dentro de los procedimientos destinados al asesoramiento de riesgo para agentes genotóxicos. En el caso particular de los 5-nitroimidazoles, es probable que la actividad antimicrobiana y genotóxica no puedan separarse y que ambas estén mediadas por intermediarios comunes. Por lo tanto la evaluación a partir de biomarcadores de efecto sigue siendo herramienta útil para determinar los efectos tóxicos sobre el material ge-

nético e identificar carcinógenos potenciales con el fin de proteger la salud pública.

REFERENCIAS

- BENDESKY A, MENÉNDEZ D, OSTROSKY-WEGMAN P (2002) Is metronidazole carcinogenic? Mutation Research 511:133-144.
- CARBALLO MA, PALERMO AM, MUDRY MD (2004) Toxicogenetic evaluation of MTZ in the treatment of women infected with *Trichomonas vaginalis*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 98(2):139-147.

- CARRANO AV, NATARAJAN AT (1998) Commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. ICPEMC Publication N° 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research* 204:379-406.
- CAVALIERE A, BACCI M, AMOROSI A, DEL GAUDIO M, VITALI R (1983) Induction of lung tumors and lymphomas in BALB/c mice by metronidazole. *Tumori* 69:379-382.
- CAVALIERE A, BACCI M, VITALI R (1984) Induction of mammary tumors with metronidazole in female Sprague-Dawley rats. *Tumori* 70:307-311.
- CERNÁ M, DOBÍA L, HAJEK V, ROSSNER P, SRAM RJ (1990) Mutagenic activity analysis of body fluids in the first phase of clinical drug trials. *Ceskoslovenska Farmacie* 39:127-130.
- CHAMBERS HF (2001) Antimicrobial agents: general consideration. In Goodman Gilman A (consult eds), Hardman JG, Limbird L E (eds) *Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics*, 10th int edn New York: McGraw-Hill, pp 1143-1170.
- COHEN JJ, DUKE RC (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annual Review of Immunology* 10:267-293.
- COULTER JR, TURNER JV (1978) Tinidazole (TNZ) (ethyl[2-(methyl-5-nitro-1imidazolyl) ethyl] sulphone) is mutagenic in a *Salmonella thyphimurium* assay. *Mutation Research* 57:97-101.
- DARZYNKIEWICZ Z, JUAN G, LI X, GORCZYCA W, MURAKAMI T, TRAGANOS F (1997) Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27:1-20.
- DE MEO M, VANELLE P, BERNARDI E, LAGET M, MALDONADO J, JENTZER O, CROZET MP, DUMENIL G (1992) Evaluation of mutagenic and genotoxic activities of 48 nitroimidazoles and related imidazole derivatives by the Ames test and the SOS chromotest. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 19:167-170.
- DOBÍAS L, CERNÁ M, RÖSNER P, SRÁM R (1994) Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutation Research* 317:177-194.
- EDWARDS DI (1993) Nitroimidazoles drugs. Action and resistance mechanisms. I. Mechanism of action. *Journal of Antibiotics and Chemotherapeutics* 31:9-20.
- ELIZONDO F, GONSEBATT ME, SALAZAR AM, LARES I, HERRERA J, HONG E, OSTROSKY-WEGMAN P (1996) Genotoxic effects of metronidazole. *Mutation Research* 370:75-80.
- EL-NAHAS AF, EL-ASHMAWY IM (2004) Reproductive and cytogenetic toxicity of Metronidazole in male mice. *Pharmacology and Toxicology* 94:226-231.
- EPA (Environmental Protection Agency) (2003) Biomarkers for assessing health effects in humans. Report N°22.02.00 B4328, National Academy of Sciences, U.S.A.
- ESPINOSA-AGUIRRE JJ, DE LA TORRE RA, LARES-ASSEFF I, RUBIO J, DORADO V, WONG M, HERNÁNDEZ JM (1996) Bacterial mutagens in the urine of patients under tinidazole treatment. *Mutation Research* 359:133-140.
- FAHRIG R, ENGELKE M (1997) Reinvestigation of in vivo genotoxicity studies in man. I. No induction of DNA strand break in peripheral lymphocytes after metronidazole therapy. *Mutation Research* 395:215-221.
- FALAGAS MD, WALKER AM, JICK H, RUTHAZER R, GRIFFITH J, SNYDMAN DR (1998) Late incidente of cancer after metronidazole use: a matched metronidazole user/nonuser study. *Clinical Infectious Diseases* 26:384-388.
- FREEMAN CD, KLUTMAN NE, LAMP KC (1997) Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs* 54:679-708.
- GARDNER TB, HILL DR (2001) Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 14:114-128.
- GILLIS JC, WISEMAN LR (1996) Secnidazole, a review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in protozoan infections and bacterial vaginosis. *Drugs* 51:621-638.

- GUPTA RL, VATS V, JUNEJA TR (1996) Activation of Tinidazole, an antiprotozoal drug to a mutagen by mammalian liver S9. *Mutation Research* 370:195-201.
- HORVÁTHOVÁ E, SLAMENOVÁ D, HLINCÍKOVÁ L, MANDAL TK, GÁBELOVÁ A, COLLINS AR (1998) The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research* 409(3):163-71.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1987) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Suppl. 7. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, pp250-252.
- KRAVTSOV VD, DANIEL TO, KOURY MJ (1999) Comparative analysis of different methodological approaches to the *in vitro* study of drug-induced apoptosis. *American Journal of Pathology* 155 (4):1327-1339.
- LAMP KC, FREEMAN CD, KLUTMAN NE, LACY MK (1999) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nitroimidazole antimicrobials. *Clinical Pharmacokinetics* 36: 353-373.
- MENÉNDEZ D, ROJAS E, HERRERA LA, LÓPEZ MC, SORDO M, ELIZONDO G, OSTROSKY-WEGMAN P (2001) DNA breakage due to metronidazole treatment. *Mutation Research* 478:153-158.
- MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215.
- MUDRY MD, CARBALLO MA, LABAL DE VINUESA M, LARRIPA I (1994) Mutagenic bioassays of certain pharmacological drugs: III Metronidazole (MTZ). *Mutation Research* 305:127-132.
- MUDRY MD, MARTÍNEZ-FLORES I, PALERMO AM, CARBALLO MA, EGOZCUE J, GARCÍA CALDÉS M (2001) Embryo lethality induced by Metronidazole (MTZ) in *Rattus norvegicus*. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 21:197-205.
- NATARAJAN A (2002) Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research* 504:3-16.
- NICHOLS W K (1999) Drogas antimicrobianas. In, Gennaro, AR (ed) Remington Farmacia 19ª edición, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, pp 1919-2041.
- NICOLETTI I, MIGLIORATI G, PAGLIACCI MC, GRIGNANI F, RICCARDI C (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 139:271-280.
- PALERMO AM, REYNOSO AS, LÓPEZ NIGRO MM, MUDRY MD, CARBALLO MA (2004) Teratogenic evaluation of metronidazole and ornidazole using *Drosophila melanogaster*. *Birth Defects Research part A: Clinical and Molecular Teratology* 70 (4): 157-162.
- PERRY P, WOLFF S (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid. *Nature (London)* 261:156-161.
- PETRIN D, DELGATY K, BHATT R, GARBER F (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* 11:300-317.
- PRESTON RJ, SAN SEBASTIAN JR, MC FEE AF (1987) The *in vitro* human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. *Mutation Research* 189:175-183.
- PR VADEMECUM ON LINE ARGENTINA (2007) <http://www.prvademecum.com/>
- RAETHER W, HÄNEL H (2003) Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research* 90: S19-S39.
- RÉ JL, DE MÉO MP, LAGET M, GUIRAUD H, CASTEGNARO M, VANELLE P, DUMÉNIL G (1997) Evaluation of the genotoxic activity of metronidazole and dimetridazole in human lymphocytes by the comet assay. *Mutation Research* 375:147-155.
- ROJAS E, HERRERA LA, SORDO M, GONSEBATT ME, MONTERO R, RODRIGUEZ R, OSTROSKY-WEGMAN P (1993) Mitotic index and cell proliferation kinetics for the identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs* 4:637-640.

- SINGH N, CLAUSEN J (1981) Mixed function oxidase and glutathione S-transferase activities in normal human peripheral blood lymphocytes. *Cancer Letters* 13 (1):53-61.
- TANINGHER M, MALACARNE D, IZZOTTI A, UGOLINI D, PARODI S (1999) Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutation Research* 463:227-261.
- THAPA PB, WHITLOCK JA, BROCKMAN WORRELL KG, GIDEON P, MITCHEL JR EF, ROBERSON P, PAIS R, RAY WA (1998) Prenatal exposure to metronidazole and risk of childhood cancer: a retrospective cohort study of children younger than 5 years. *Cancer* 83: 1461-1468.
- TRINH S Y REYSSET G (1998) Mutagenic action of 5-nitroimidazoles: in vivo induction of GCÆCG transversion in two *Bacteroides fragilis* reporter genes. *Mutation Research* 398:55-65.
- TOCHER JH, EDWARDS DI (1994) Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases. *Biochemical Pharmacology* 48:1089-1094.
- TUCKER JD, PRESTON, R (1996) Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mutation Research* 365:147-159.
- VOOGD CE (1981) On the mutagenicity of nitroimidazoles. *Mutation Research* 86:243-277.
- WHO (World health organization) Essential Drugs. 1999. WHO Drug Information 13 249-262.
- ZAAT JO, MANK TG, ASSENDELFT WJJ (1997) A systematic review on the treatment of giardiasis. *Tropical Medicine and International Health* 2:63-82.