

CITOTOXICIDAD Y GLICOPROTEÍNA P EN EL TRATAMIENTO CON NITROIMIDAZOLES

CYTOTOXICITY AND P-GLYCOPROTEIN IN TREATMENT WITH NITROIMIDAZOLES

CATALINA MARÍA CORTADA, MARCELA MABEL LÓPEZ NIGRO Y MARTA ANA CARBALLO*

CIGETOX (Citogenética Humana y Genética Toxicológica)

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
Junín 756, C.P. 1113, C.A.B.A., Argentina.

*Autor para correspondencia: macarballo2003@yahoo.com.ar

RESUMEN

Los compuestos 5-nitroimidazólicos (Metronidazol (MTZ), Ornidazol (ONZ), entre otros) han sido utilizados en la terapéutica como agentes antibacterianos, antifúngicos y antiprotozoos. La presencia de muerte celular debido a los agentes nitroimidazólicos constituye un importante componente del tratamiento. En condiciones aeróbicas, se ha sugerido que su toxicidad estaría vinculada a la generación de especies reactivas del oxígeno. La glicoproteína P, miembro de la familia de bombas de eflujo ABC (ATP-binding cassette), ha demostrado estar involucrada en el transporte de drogas de relevancia clínica. Su sobreexpresión ha sido observada en asociación con la generación de especies libres del oxígeno. Teniendo en cuenta que nuestro sistema de ensayo consiste de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica, decidimos evaluar el MTZ y ONZ y su posible efecto sobre esta glicoproteína mediante citometría de flujo (rodamina 123) así como la caracterización morfológica del proceso de muerte celular (Naranja de Acridina/ Bromuro de Etidio). Los resultados cuantitativos muestran: a) un incremento significativo del porcentaje de células no viables con respecto al control (MTZ₁₀ 11%, p<0,05; MTZ₅₀ 30%, p<0,001; ONZ₁₀ 8%, p<0,05; ONZ₅₀ 16%, p<0,05); b) el transporte de rodamina es mayor al realizarse el ensayo en presencia de MTZ y ONZ (p<0,03). Considerando los datos reportados en la literatura y aquellos obtenidos en este estudio, es posible sugerir que MTZ y ONZ, los cuales inducirían un efecto citotóxico mediado por radicales libres del oxígeno producto de su metabolización intracelular, podrían gatillar una respuesta de estrés en la cual se induzca la expresión de P-gp y lleve a la muerte celular por un mecanismo de apoptosis.

PALABRAS CLAVES: Ornidazol, metronidazol, glicoproteína P, muerte celular.

ABSTRACT

5-nitroimidazolic derivatives have been used in therapeutics as antibacterial, antifungal and antiprotozoal agents. Cell death due to these drugs constitutes an important step in the treatment. In aerobic media, it has been suggested that nitroimidazoles toxicity would be mediated by reactive oxygen species generated in its intracellular metabolism. P-glycoprotein (P-gp), member of the ATP binding cassette efflux pumps, has been involved in relevant clinical drug transport. Its overexpression has been observed in association with reactive oxygen species generation. Taking into account that our assay has been developed with human lymphocyte isolated from peripheral blood, we decided to evaluate metronidazole and ornidazole and its possible effect on P-gp by flow cytometry (rhodamine 123) as well as the morphological characterization of cell death process (acridine orange/ ethidium bromide). Quantitative results show: a) a significant increase in the non viable cell percentage compared against the control (MTZ₁₀ 11%, p<0,05; MTZ₅₀ 30%, p<0,001; ONZ₁₀ 8%, p<0,05; ONZ₅₀ 16%, p<0,05); b) rhodamine transport is increased when the assay includes MTZ and ONZ (p<0,03). Considering the information reported in the literature and our own results, it

becomes possible to suggest that MTZ and ONZ, which would induce a cytotoxic effect mediated by reactive oxygen species, could activate a stress response that may induce P-gp expression and cell death by apoptosis.

KEYWORDS: Ornidazole, metronidazole, P-glicoprotein, cell death.

Recepción: 15/09/06. Revisión: 23/10/06. Aprobación: 24/11/06.

INTRODUCCIÓN

Metronidazol (MTZ, 1-[2-hidroxietil]-2-metil-5-nitroimidazol) es una de las drogas de mayor empleo a nivel mundial que forma parte del listado de drogas esenciales de la OMS (WHO, 1999). Luego de la síntesis de MTZ en 1957, se desarrolló una amplia variedad de 4- y 5-nitrocompuestos con distintos sustituyentes en posición 1 y 2, tales como Dimetridazol (DMZ), Flunidazol (FNZ), Ronidazol (RNZ), Tinidazol (TNZ) y Ornidazol (ONZ). En Latinoamérica MTZ, TNZ, ONZ, Secnidazol y Nimorazol son ampliamente utilizados a nivel clínico (Raether y Hänel, 2003). Como resultado de estudios toxicológicos surgió la sospecha sobre su posible mutagenicidad y carcinogenicidad. El grupo nitro es considerado responsable de las propiedades antimicrobianas así como de su potencial mutagenicidad (Voogd *et al.*, 1977; Dobias *et al.*, 1994).

Entre los estudios de nuestro grupo de trabajo, se realizó una evaluación citotóxica y genotóxica de los derivados MTZ y ONZ, (1- [3-cloro-2-hidroxi] propil-2-metil-5-nitroimidazol) empleando biomarcadores de efecto tales como Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), Aberraciones Cromosómicas (AC), Índice Mitótico (IM), Cinética de Proliferación Celular (CPC) y Ensayo del Cometa (Carballo *et al.*, 2001, 2004; Rodríguez *et al.*, 2002; López Nigro *et al.*, 2003). En condiciones *in vitro*, linfocitos de sangre periférica fueron expuestos a las concentraciones plasmáticas alcanzadas bajo condiciones terapéuticas (0.1, 1.0, 10.0 y 50.0 mg/ml). Nuestros resultados muestran

que MTZ y ONZ inducen un incremento significativo en las frecuencias de ICH ($p < 0.0001$) y AC ($p < 0.0001$), disminución significativa del IM ($p < 0.0001$) y ausencia de modificación de la CPC, sugiriendo que ambos compuestos inducirían un efecto citotóxico, el cual estaría asociado a procesos de muerte celular.

En nuestro país MTZ y ONZ son ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones en el tracto uro-genital debidas a *Trichomonas vaginalis*. Se ha descrito la presencia de la glicoproteína P (P-gp) en *Trichomonas vaginalis* y se ha establecido que la misma es similar a la presente en mamíferos. En estos protozoos no se ha podido establecer si la mencionada bomba de eflujo juega un rol importante en la resistencia a MTZ (Dunne *et al.*, 2003).

Las bombas de eflujo de la familia de proteínas ABC (ATP binding cassette) tienen un alto impacto en el comportamiento farmacológico de gran parte de las drogas utilizadas actualmente. Dentro de esta familia, la glicoproteína P (P-gp), entre otras, demostró estar involucrada en el transporte de drogas de relevancia clínica (Schinkel y Jonker, 2003). Ha sido descrita la sobreexpresión de P-gp dependiendo del estado metabólico de la célula y, en particular, frente a la generación de radicales libres del oxígeno (ROS) (Ledoux *et al.*, 2003; Ziemann *et al.*, 1999).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de MTZ y ONZ sobre la actividad de esta importante glicoproteína y definir el tipo de muerte celular involucrado empleando linfocitos humanos de sangre periférica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

El diseño experimental incluyó dos mujeres y dos hombres sometidos a un protocolo clínico (hemograma, glucemia, creatininemia, colesterol total, triglicéridos, bilirrubina total, transaminasas y eritrosedimentación) que contiene criterios de inclusión y una anamnesis (edad, sexo, altura, peso, raza, nacionalidad, consumo de medicamentos y/o cigarrillo, hábitos alimenticios). Las células mononucleares fueron aislados a partir de sangre entera heparinizada empleando Ficoll Paque Plus (Bøyum, 1964). Posteriormente, se procedió al recuento en cámara de Neubauer con Azul Tripán para el cálculo de la concentración celular.

Viabilidad celular. Caracterización morfológica

Para el análisis de viabilidad y morfología, 10^6 células aisladas / ml (controles y expuestos: MTZ y ONZ (10.0 y 50.0 $\mu\text{g/ml}$)) se incubaron 48 horas a 37°C y 5% CO_2 en RPMI 1640 suplementado con 0,05% de L-glutamina y 10% de suero fetal bovino (SFB). Se tomo una alícuota, se centrifugó y el pellet se resuspendió en solución fisiológica (SF) adicionando 4 μl de una solución fresca de Naranja de Acridina (NA) / Bromuro de Etidio (BE) (NA 100 $\mu\text{g/ml}$ + BE 100 $\mu\text{g/ml}$ en buffer fosfato). Se incubó 5 minutos en oscuridad, se lavó con SF y se realizaron los extendidos. El análisis se efectuó contabilizando 200 células por individuo/droga/concentración con microscopio de epi-fluorescencia.

Ensayo de funcionalidad de P-gp en células mononucleares

Para el ensayo de eflujo de rodamina 123, 10^6 células aisladas se incubaron con el colorante (150 $\mu\text{g/ml}$) por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizaron lavados con PBS frío y se incubó a 37°C durante 3 horas con RPMI 1640 libre de rodamina y 10% de SFB, en presencia y ausencia de verapamilo (100 μM). Finalmente, las células se analizaron mediante citometría de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson) (Chaudhary *et al.*, 1991; Donnenberg *et al.*, 2001). Para el cálculo del eflujo de rodamina, se seleccionó la región linfoidea y la actividad de P-gp se determinó como el cociente entre la fluorescencia intracelular con y sin inhibidor (Rh123+Verapamilo/Rh123) (Machado *et al.*, 2003). Utilizando la metodología descrita, paralelamente se incubaron células con los derivados nitroimidazólicos MTZ y ONZ (10.0 y 50.0 $\mu\text{g/ml}$).

Análisis estadístico

Para la evaluación estadística tanto de los resultados del ensayo de viabilidad como para el eflujo de rodamina se empleó el test de U-Mann Whitney de dos colas.

RESULTADOS

Para caracterizar morfológicamente el proceso de muerte celular se emplearon dos fluorocromos con afinidad por el ADN como son NA y BE. Luego de exponer las células a MTZ y ONZ, se contabilizó el porcentaje de células viables (verdes; NA positivas) y no viables (rojas; BE positivas).

Se tomó registro de las modificaciones morfológicas observadas en cada uno de los ensayos realizados. Los resultados cuantitativos muestran un incremento significativo del porcentaje de células no viables para cada una de las concentraciones ensayadas con

respecto a los valores control, encontrando el mayor porcentaje de muerte con MTZ 50 mg/ml (MTZ₁₀ 11%, p<0,05; MTZ₅₀ 30%, p<0,001; ONZ₁₀ 8%, p<0,05; ONZ₅₀ 16%, p<0,05; control 5%) (Figura 1).

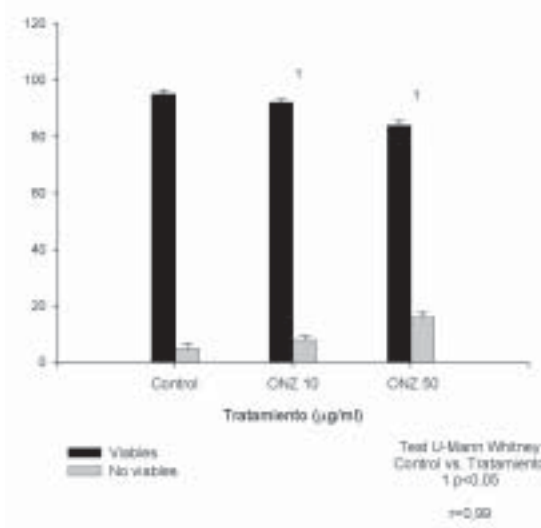
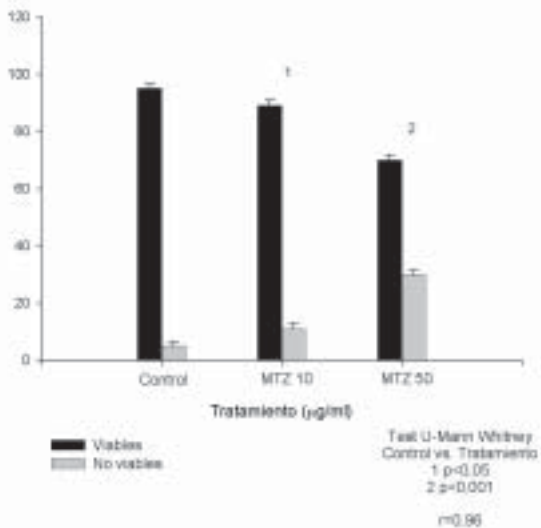


FIGURA 1. Niveles de viabilidad de células mononucleares expuestas a distintas concentraciones de MTZ y ONZ.

Análisis de los niveles de viabilidad, apoptosis y necrosis en cultivo de células mononucleares. Luego de la incubación en medio de cultivo a 37°C durante 48 hs con MTZ y ONZ 10 y 50 mg/ml se realiza la tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio. Los preparados son observados con microscopio de fluorescencia. Se presentan los valores promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes.

La observación microscópica de los controles mostró núcleos con estructura cromática homogénea y citoplasma intacto; en aquellos expuestos se observaron rasgos típicos de apoptosis tales como disminución del tamaño celular, condensación de la cromatina, formación de agregados cromatínicos, fragmentación nuclear y cambios en la membrana plasmática como la presencia de blebbing citoplasmático (Fig. 2).

El ensayo de eflujo de rodamina 123 se fundamenta en que el colorante es sustrato de P-gp; éste ingresa por difusión pasiva a la célula y al incubarse a 37°C, la P-gp lo bombea hacia el espacio extracelular. El agregado de un inhibidor químico como el verapamilo bloquea en forma competitiva la salida de rodamina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I. La expresión de resultados sugiere que un dato numérico



Figura 2. Análisis morfológico de células mononucleares expuestas a MTZ y ONZ.

Microscopía de fluorescencia analizada a través de tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio luego de 48 horas de incubación: a) Célula control; b) Apoptosis inducida por 50 mg/ml de MTZ.; c) Apoptosis inducida por 50 mg/ml de ONZ.

Tabla I. Transporte de rodamina en células mononucleares expuestas a MTZ y ONZ. Los valores representan el cociente de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de linfocitos tratados con respecto al control. El análisis estadístico realizado con el test de U-Mann Whitney determinó diferencia significativa entre el control y los diferentes tratamientos ($p < 0,03$).

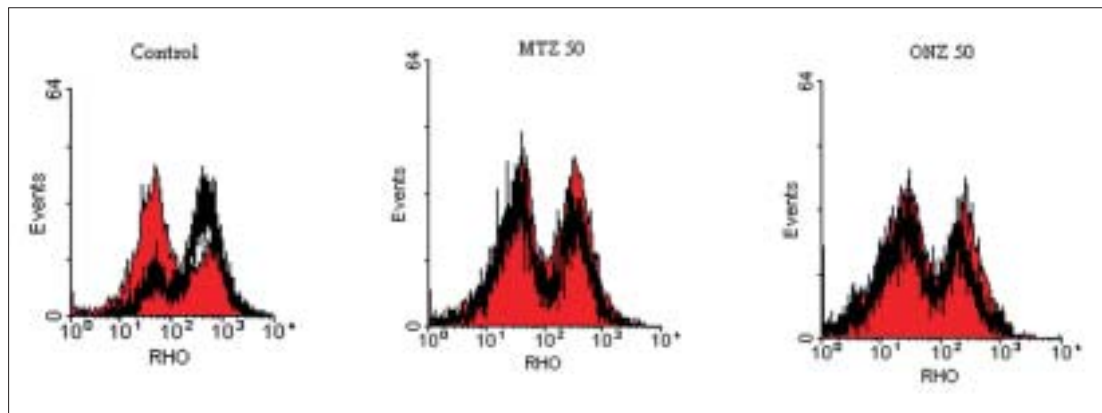
Tratamiento	Individuo				X ± DS
	1	2	3	4	
Control	2,4	1,8	3,0	2,3	2,4 ± 0,5
MTZ 10	0,87	0,81	0,97	0,78	0,86 ± 0,08
MTZ 50	0,77	0,77	0,89	0,79	0,81 ± 0,06
ONZ 10	0,79	0,79	0,89	0,78	0,82 ± 0,05
ONZ 50	0,86	0,81	0,95	0,79	0,86 ± 0,07

igual a 1 indicaría que la droga no produce efecto sobre el transporte de rodamina mientras que cuando el resultado es mayor a 1, la droga tendría efecto inhibitorio. Al exponer las células aisladas a las diferentes drogas se

observa un valor menor a 1 en el cociente de fluorescencia, poniendo en evidencia que el transporte de rodamina es mayor al realizarse el ensayo en presencia de MTZ y ONZ ($p < 0,03$) (Fig. 3).

Figura 3. Distribución de la población linfoidea en función del contenido de rodamina 123.

Linfocitos humanos incubados a 37°C, previa exposición a rodamina 123, sujetos a los distintos tratamientos: Control: sin droga (rojo) y con verapamilo (negro); MTZ 50: sin droga (rojo) y con 50 mg/ml de MTZ (negro); ONZ 50: sin droga (rojo) y con 50 mg/ml de ONZ (negro).



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el tratamiento con los dos agentes nitroimidazólicos, al realizar la tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio (Fig. 2), se observa claramente la presencia de núcleos y cuerpos apoptóticos, migración de diversas porciones de la cromatina hacia la membrana nuclear y gemaciones citoplasmáticas (blebbing), todas imágenes asociadas a mecanismos de apoptosis (Darzynkiewicz *et al.*, 1997). La presencia en el cultivo de estos rasgos morfológicos coincide con la progresión en el tiempo y el incremento de la dosis de exposición de los derivados ensayados.

Comparativamente MTZ mostró un mayor efecto apoptótico que ONZ, hecho que podría ser atribuido a su estructura química. Los compuestos nitroimidazólicos son agentes terapéuticos cuya actividad citotóxica y mutagénica está vinculada a la reducción enzimática del grupo nitro presente en su estructura originando intermediarios reactivos (Edwards, 1993). Sin embargo, en

condiciones aeróbicas, se ha sugerido que su toxicidad estaría vinculada a la generación de especies activas del oxígeno tales como el radical superóxido (O_2^-) (Hrelia *et al.*, 1990; Ré *et al.*, 1997). Esta molécula, así como su producto de dismutación el H_2O_2 , están asociados a procesos de muerte celular vía apoptosis (Gregus y Klaassen, 2001).

Se ha obtenido evidencia experimental por métodos bioquímicos, fisiológicos, moleculares y toxicológicos, que sostienen la hipótesis de que P-gp funciona como una línea de defensa contra productos naturales y compuestos sintéticos (Colombo *et al.*, 2003). A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que el tratamiento de los linfocitos con los derivados nitroimidazólicos provocó un aumento estadísticamente significativo en el eflujo de rodamina 123.

Se ha comprobado que la P-gp puede aumentar su expresión en presencia de una droga, compuesto o mezcla compleja. Es factible que el estrés celular y la expresión de P-gp estén ligadas, ya que este transpor-

tador juega un rol crucial en la protección de la célula frente a productos tóxicos liberados al entorno celular durante situaciones de estrés (Sukhai y Piquette-Miller, 2000). Estudios en ratones demostraron que un amplio espectro de inductores de P-gp no relacionados estructuralmente gatillan la producción de ROS, sugiriendo esto que el estrés oxidativo juega un rol importante en la inducción del *mdr1b* (Ledoux *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta los datos reportados en la literatura y aquellos obtenidos en este estudio, es posible sugerir que MTZ y ONZ, los cuales inducirían un efecto citotóxico mediado por radicales libres del oxígeno productos de su metabolización intracelular, podrían gatillar una respuesta de estrés en la cual se induzca la expresión de P-gp y lleve a la muerte celular por un mecanismo de apoptosis.

Esta evaluación preliminar requeriría del aporte de otras metodologías como el estudio por métodos moleculares de la expresión de P-gp y la utilización de Anexina V e ioduro de propidio con citometría de flujo para la determinación de marcadores tempranos del proceso de apoptosis, entre otras.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el marco del UBACyT B034.

Agradecemos a la Lic. Patricia Kistenschmayer por los aportes en el mejoramiento del manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BØYUMA (1964) Separation of white blood cells. *Nature* 204: 793-794.
- CARBALLO MA, PALERMO AM, LÓPEZ NIGRO M.M. (2001) Mutagenicidad química y evaluación de daño potencial mediante ensayos de corto plazo (ETC). *Acta Toxicológica Argentina* 9:4-8.
- CARBALLO MA, PALERMO AM, MUDRY MD (2004) Toxicogenetic evaluation of metronidazole in the treatment of women infected with *Trichomonas vaginalis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 98 (2): 139-147.
- CHAUDHARY PM, MECHETNER EB, RONINSON IB (1991) Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80(11): 2735-2739.
- COLOMBO A, BONFATI P, ORSI F, CAMATINI M (2003) Differential modulation of cytochrome P-450 1A and P-glycoprotein expression by aryl hydrocarbon receptor agonists and thyroid hormone in *Xenopus laevis* liver and intestine. *Aquatic Toxicology* 63: 173-186.
- DARZYNKIEWICZ Z, JUAN G, LI X, GORCZCA W, MURAKAMI T, TRAGANOS F (1997) Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27:1-20.
- DOBÍA L, CERNÁ M, RÖSNER P, RÁM R (1994) Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutation Research* 317: 177-194.
- DONNENBERG VS, BUCKART GJ, GRIFFITH BP, JAIN AJ, ZEEVI A, DONNENBERG AD (2001) P-glycoprotein is upregulated in peripheral T-cell subsets from solid organ transplant recipients. *Journal of Clinical Pharmacology* 41: 1271-1279.
- DUNNE RL, DUNNE LA, UPCROFT P, O'DONOGHUE P, UPCROFT JA (2003) Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research* 13(4): 239-249.
- EDWARDS DI (1993) Nitroimidazoles drugs. Action and resistance mechanisms. I. Mechanism of action. *Journal of Antibiotics and Chemotherapy* 31:9-20.
- GREGUS Z, KLAASSEN C (2001) Mechanisms of Toxicity. In Goodman, Gilman's (consult eds.), Hardman, J.G. and Limbird, L. E. (Eds.). *The pharmacological basis of therapeutics*, 10th Int. Ed. McGraw-Hill, New York, U.S.A. pp: 35-81.
- HRELIA P, SCOTTI M, MOROTTI M, VIGAGNI F, PAOLINI M, SPIGNI E, CANTELLI-FORTI G (1990) DMSO as a modifier of the organospecific mutagenicity of MTZ in mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. 10:263-271.
- LEDOUX S, YANG R, FRIEDLANDER G,

- LAOUARI D (2003) Glucose depletion enhances P-glycoprotein expression in hepatoma cells: role of endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Research* 63: 7284-7290.
- LÓPEZ NIGRO MM, PALERMO AM, MUDRY MD, CARBALLO MA (2003) Cytogenetic evaluation of two nitroimidazoles derivatives. *Toxicology In Vitro* 17:35-40.
- MACHADO CG, CALADO RT, GARCÍA A B, FALCAO RP (2003) Age-related changes of the multidrug resistance P-glycoprotein function in normal human peripheral blood T lymphocytes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36(12):1653-1657.
- RAETHER W, HÄNEL H (2003) Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitological 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.
- RODRIGUEZ FERREIRO G, CANCINO BADÍAS L, LÓPEZ NIGRO MM, PALERMO AM, MUDRY MD, PRIETO GONZÁLEZ E, CARBALLO MA (2002) DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazoles derivatives. *Toxicology Letters* 132:109-115.
- SCHINKEL AH, JONKER JW (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:3-29.
- SUKHAI M, PIQUETTE-MILLER M (2000) Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Science*
- VOOGD CE, VAN DER STEL JJ, JACOBS JJJAA (1977) The mutagenic action of nitroimidazole: III. Tinidazole, Ipronidazole, Panidazole and Ornidazole. *Mutation Research* 48:155-162.
- WHO (1999) World Health Organization, Essential Drugs, WHO Drug Information 13:249-262.
- ZIEMANN C, BÜRKLE A, KAHL GF, HIRSCH-ERNST KI (1999) Reactive oxygen species participate in *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis* 20(3):407-414.