



11281  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO 31

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

**ENTENDIENDO LA SUSCEPTIBILIDAD A  
LOS EFECTOS GENOTÓXICOS DEL  
METRONIDAZOL.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:**

**LIBB. Daniel Menéndez Rendón**

**MÉXICO, D.F., 2002**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**

**Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Patricia Ostrosky Wegman.**

**DMR recibió becas del CONACYT, DGEP , así como apoyo de PAEP para la realización de este proyecto.**





## **INDICE.**

Abreviaturas	6
Índice de cuadros	7
Índice de tablas	7
Índice de figuras	8
Resumen	10
Abstract	11
I. CICLO CELULAR	12
El control del ciclo celular	12
Eventos bioquímicos asociados con la proliferación celular	20
II. P53, EL GUARDIAN DEL GENOMA	23
Estructura del gen y la proteína p53	23
Funciones de P53	26
III. EL METRONIDAZOL	32
IV. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	36
Hipótesis y objetivos	37
V. MATERIAL Y METODOS	38
VI. RESULTADOS	49
Estudios ex vivo en linfocitos de personas tratadas con MTZ	49
Estudios in vitro con cultivos de linfocitos humanos	52
Estudios in vitro en líneas celulares	54
VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES	86
VIII. NUEVAS PERSPECTIVAS	95
IX. REFERENCIAS	96
X. ANEXOS	107

ANEXO1: Bendesky A., Menéndez D. Metronidazol: una visión integral. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 44: 255-259 (2001).

ANEXO 2: Bendesky A., Menéndez D., Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? *Enviado a revisión a Mutation Research.*

ANEXO 3: Menéndez D., Rojas E., Herrera L.A., López M.C., Sordo M., Elizondo G., Ostrosky-Wegman P. DNA breakage due to metronidazole treatment. *Mutation Res.* 478: 153-158 (2001).

ANEXO 4: Menéndez D., Bendesky A., Rojas E., Salamanca F., Ostrosky-Wegman P. Role of P53 functionality in the genotoxicity of metronidazole and its hydroxy metabolite. *Aceptado para su publicación en Mutation Research (2002).*

## Abreviaturas.

cols	colaboradores
DNA	ácido desoxirribonucleico
IM	índice mitótico
IR	índice de replicación
$\mu$ Fd	micro Faradays
$\mu$ m	micrómetros
$\mu$ M	micromolar
MA	metabolito acetilado del metronidazol
MH	metabolito hidroxilado del metronidazol
MN	micronúcleo
MTZ	metronidazol
p53	gen p53
P53	proteína P53
PHA	fitohemaglutinina
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto

## **Índice de cuadros.**

Cuadro 1. Criterios de inclusión y exclusión.....39.

Cuadro 2. Carta consentimiento.....40.

## **Índice de tablas.**

Tabla 1. Genes transcripcionalmente activados por P53.....29.

Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en el estudio.....48.

Tabla 3. Viabilidad celular en las muestras de linfocitos antes del tratamiento así como 1 día y 15 días después de finalizado el tratamiento con MTZ.....60.

Tabla 4. Cantidad de daño al DNA evaluado como la longitud de la cola del "cometa" en linfocitos de individuos tratados con MTZ.....61.

Tabla 5. Evaluación del índice mitótico y del índice de replicación en cultivos de linfocitos de sangre periférica tratados con MTZ.....62.

Tabla 6. Evaluación de la inducción de micronúcleos en cultivos de linfocitos de sangre periférica tratados con MTZ.....63.

Tabla 7. 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.....64.

## Índice de figuras.

- Figura 1. Diagrama del ciclo celular en organismos eucariontes.....14.
- Figura 2. Cascada de señalización y proteínas involucradas en los sistemas de vigilancia.....24.
- Figura 3. Dominios funcionales de la proteína P53.....25.
- Figura 4. Cascada de activación y señalización de P53.....31.
- Figura 5. Estructuras del metronidazol (MTZ) y de sus dos principales formas metabólicas en el humano.....33.
- Figura 6. Vías de la biotransformación del MTZ en humanos.....34.
- Figura 7. Cantidad de daño al DNA. Rompimientos de cadena sencilla, en linfocitos de individuos tratados con MTZ.....65.
- Figura 8. Correlación entre el daño al DNA en linfocitos y la concentración de MTZ en plasma ( $\mu\text{g/ml}$ ) 1 día después de finalizado el tratamiento con MTZ.....66.
- Figura 9. Inmunodetección de la proteína P53 en linfocitos de individuos tratados con MTZ. A) Antes del tratamiento con MTZ.....67.
- Figura 10. Análisis densitométrico de los niveles de P53 en linfocitos de individuos tratados con MTZ antes y 1 día después de acabado el tratamiento.....68.
- Figura 11. Correlación entre el daño al DNA y la inducción de P53 en linfocitos de individuos tratados con MTZ 1 día después de finalizado el tratamiento.....69.
- Figura 12. Cinética de inducción de las proteínas P53 y P21-Waf1 en linfocitos de individuos tratados con MTZ 1 día después de finalizado el tratamiento.....70.
- Figura 13. Análisis densitométrico de las proteínas P53 y P21 Waf-1 en linfocitos de individuos tratados con MTZ 1 día después de finalizado el tratamiento y estimulados a proliferar 24, 48 y 72 horas....71.
- Figura 14. Patrón de respuestas de la proteína P53 en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con MTZ.....72.
- Figura 15. Densitometría de la respuesta *in vitro* de P53 en cultivos de linfocitos humanos después el tratamiento con MTZ y sus metabolitos hidroxilado y acetilado.....73.

Figura 16. Viabilidad celular en líneas celulares humanas con diferente estado funcional de P53 después del tratamiento con MTZ y sus metabolitos hidroxilado (MH) y acetilado (MA).....74.

Figura 17. Efectos del MTZ y sus metabolitos sobre la proliferación celular y la inducción de micronúcleos en líneas celulares con diferente estado funcional de la proteína P53.....75.

Figura 18. Inmunodetección de la proteína P53 en líneas celulares después del tratamiento con MTZ.....76.

Figura 19. Inmunodetección de la proteína P53 en líneas celulares después del tratamiento con los metabolitos hidroxilado (MH) y acetilado (MA) del MTZ.....77.

Figura 20. Densitometría de los niveles de la proteína P53 después del tratamiento con MTZ, MH y MA en las líneas celulares HeLa, RKO y C33-A.....78.

Figura 21. Efecto del MTZ y sus metabolitos en la cinética de inducción de P53 en la línea celular RKO.....79.

Figura 22. Evaluación del efecto de la transfección de la versión normal o mutada de p53 en la línea celular Jurkat, sobre el efecto del MTZ en la proliferación celular.....80.

Figura 23. Evaluación del efecto de la transfección de la versión normal o mutada de p53 en linfocitos humanos, sobre el efecto del MTZ en la proliferación celular.....81.

Figura 24. Efecto inductor de la proteína P53 en células RKO del MTZ, MH, imidazol (IMZ) y levamisol (LVZ) .....82.

Figura 25. Efecto del MTZ en la viabilidad celular en líneas linfoblastoides normales; heterócigas y homócigas para el gen ATM.....83.

Figura 26. Efecto del MTZ sobre la proteína P53 en líneas linfoblastoides con diferentes condiciones alélicas para el gen ATM.....84.

Figura 27. Densitometría de la respuesta de P53 después de 24 horas de tratamiento con MTZ en líneas linfoblastoides con diferente condición alélica para el gen ATM.....85.

Figura 28. Modelo para explicar la susceptibilidad individual a los efectos genotóxicos del MTZ en humanos.....93.

## 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 MTZ al mismo tiempo de incrementar la proliferación celular produce daño al DNA en linfocitos de individuos tratados con el medicamento, además de ser evidente una respuesta individual a dichos efectos. Dado el papel que tiene la proteína supresora de tumores P53 como "guardián del genoma" se propuso que MTZ pudiera estar alterando las funciones de P53. Con el fin de entender estos efectos así como la respuesta individual, evaluamos si el MTZ y sus metabolitos producía daño clastogénico, si activan a P53 así como la relación de estas respuestas con la capacidad proliferativa y la susceptibilidad individual, para lo cual se realizó un estudio *ex vivo* con linfocitos de individuos tratados con MTZ así como también cultivos de linfocitos humanos y de líneas celulares con diferente estado funcional de P53 que fueron tratados a diferentes concentraciones de MTZ y de sus metabolitos hidroxilado y acetilado. Nuestros resultados indican que el MTZ y sus metabolitos son capaces de producir diferentes tipos de daño clastogénico en células humanas, como rompimientos de cadena sencilla de DNA y micronúcleos. Este daño al DNA resulta en el incremento en los niveles de la proteína supresora de tumores P53. Así mismo si bien el MTZ no afecta de manera directa las funciones de P53, la ausencia de funcionalidad de esta proteína permite que las células proliferen con daño cuando son tratadas con el MTZ o sus metabolitos. En los linfocitos humanos, se encontró una respuesta individual en la inducción de la proteína P53 ante el tratamiento con MTZ y sus metabolitos tanto en el estudio *ex vivo* como en el *in vitro*. De acuerdo con nuestros resultados, al menos *in vivo*, estas variaciones están ligadas a la magnitud del daño inducido. Sin embargo, otros factores como las diferencias a nivel del metabolismo, reparación del daño al DNA e incluso genes relacionados con la regulación del ciclo celular y los puntos de vigilancia, deben de estar involucrados en la susceptibilidad individual a los efectos genotóxicos del MTZ y sus metabolitos.



## **Abstract.**

Metronidazole (MTZ) is one of the most used antiparasitic and antibiotics drug in the world. However its genotoxic and carcinogenic potential for humans is under controversy. In a previous study done by our group, we observed that in lymphocytes from individuals treated with MTZ, there was an increase in both cell proliferation and the amount of DNA damage. Additionally an individual response was observed in these individuals. Since one of the roles of the tumor suppressor protein P53 is to be our "genome guardian" we proposed that MTZ could be altering the functions of P53. In order to understand this effects as well as the individual response, we studied if MTZ and its hydroxy and acetic metabolites could be producing clastogenic damage, if this damage could be activating the P53 protein and the relation of these effects with the cell proliferation capacity and the individual susceptibility. We realized an *ex vivo* study with lymphocytes from individuals treated with MTZ as well as cultures of human lymphocytes and of cell lines with different P53 functionality, treated with different doses of MTZ and its metabolites. Our results indicated that MTZ and its hydroxy and acetic metabolites produce different types of DNA damage in human cells, as DNA single strand breaks and micronuclei. This damage resulted in the increase of P53 protein levels. Although MTZ did not altered directly the activity of P53, our results showed that the non-functionality of P53 protein was a key factor to support the cell proliferation-damage scenario when the cells were treated with MTZ or its metabolites. In addition, in the studies in human lymphocytes we found a clear individual response in the P53 activation. Accordingly with our results, at least in *vivo*, these differences were linked to the magnitude of damage produced, although other factors as differences in metabolism of MTZ, DNA repair as well as in genes that participate in cell cycle and checkpoint regulation must be involved in the individual susceptibility in the genotoxic effects of MTZ and its metabolites.

## **I. CICLO CELULAR.**

El proceso de la proliferación celular es la culminación de una serie de eventos que permiten que una célula se divida, como resultado de la citocinesis, en dos células progenitoras que tendrán la misma información genética que la original (Nasmyth, 1996). En conjunto, estos eventos estrictamente regulados son lo que conocemos como ciclo celular. La pérdida del control del ciclo celular puede desencadenar ya sea la muerte de la célula o bien, la proliferación desregulada de las células lo cual es propio del estado canceroso. Hoy 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 hacerlo, siendo el resultado de su proliferación desorganizada la formación de un tumor (Evan y Voudsen, 2001).

### ***EL CONTROL DEL CICLO CELULAR.***

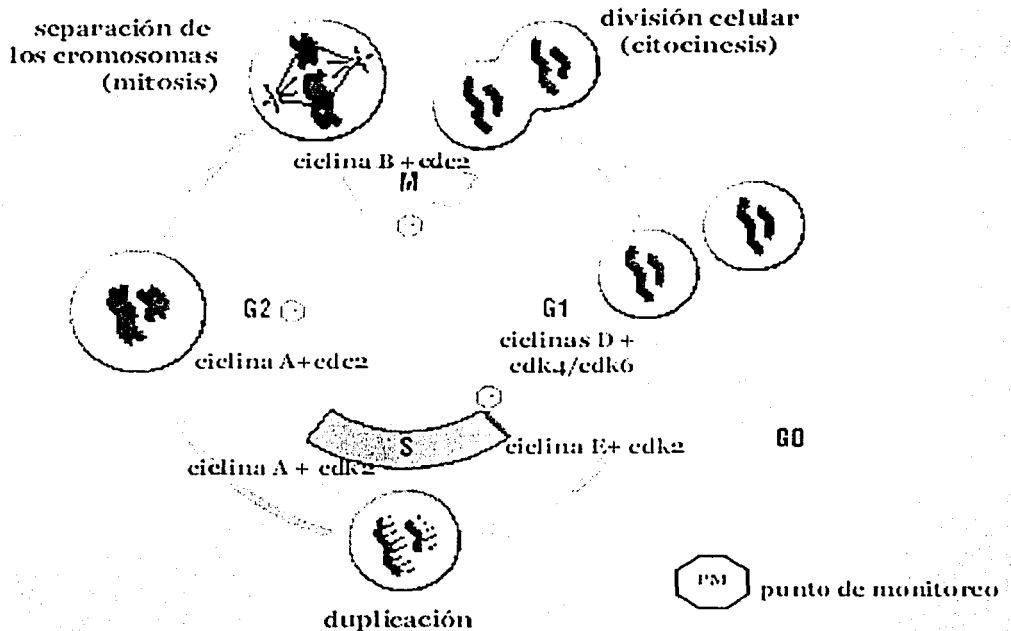
Para su entendimiento, el ciclo de las células eucariontas es dividido en cuatro fases: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M (Figura 1). La fase S es el período de síntesis del DNA, durante el cual a partir de una cadena se origina una segunda copia del genoma. En la fase M o de mitosis las dos copias de DNA ya como cromosomas condensados se segregan y la célula se divide en dos células hijas genéticamente iguales. El tiempo que transcurre entre una mitosis y otra se denomina período de interfase. Los períodos G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> son espacios temporales de preparación previos a la duplicación del DNA y a la división celular respectivamente (Salazar, 1998).

Existe además, un estado de "reposo" (o latente) de las células que no se encuentran en proliferación denominado G<sub>0</sub>, en el cual el metabolismo principal de la célula se encuentra disminuido, incluyendo muchos de los procesos usualmente activos como el de la transcripción y de la síntesis de proteínas. "In vivo", la mayoría de las células de los mamíferos están en G<sub>0</sub> (Ford y Pardee, 1999). La falta de factores de crecimiento puede causar la salida de las células del ciclo y su

entrada a  $G_0$ , la estimulación con factores de crecimiento a su vez, puede inducir nuevamente la entrada al estado de proliferación (Weinstein y Zhou, 1997).

La maquinaria que controla el ciclo celular en los eucariontes está compuesta de complejos multi-proteicos formados por una subunidad catalítica cdk (por cinasa dependiente de ciclina o cdk) y una subunidad reguladora denominada ciclina que son activados siguiendo un orden específico y desencadenando eventos tales como la replicación del DNA, la formación del huso mitótico y la segregación de los cromosomas (Morgan, 1997). A la fecha se han identificado 9 unidades cdk y 11 ciclinas, que potencialmente conforman 13 complejos cinasas activos (Johnson y Walker, 1999; Webster, 2000). En células normales la mayoría de estas enzimas están específicamente relacionadas con las distintas fases del ciclo celular; hay complejos enzimáticos para la fase  $G_1$ , S y  $G_2/M$ , donde cada uno de éstos realiza diferentes funciones durante la progresión del ciclo celular (Morgan, 1997; Johnson y Walker, 1999).

En una panorámica general, la activación de las cdk, permite que estas enzimas fosforilen y modulen la actividad de una gran variedad de proteínas celulares que incluyen proteínas supresoras de tumores (por ejemplo RB y P53), factores de transcripción (por ejemplo E2F-DP1 y la RNA pol III), factores de replicación (por ejemplo DNA pol  $\alpha$  y RPA) y factores de organización de estructuras celulares y de la cromatina (por ejemplo histona HI, lámina A, MAP4). La actividad cinasa de las cdk está regulada a través de la coordinación de diferentes mecanismos, entre los cuales destacan: la transcripción y traducción dependiente del ciclo celular, la proteólisis dependiente del ciclo celular, la localización celular, las modificaciones post-traduccionales y la interacción de los complejos cdk-ciclinas con proteínas inhibitoras de las cdk conocidas como CKI por sus siglas en inglés (Webster, 2000).



**Figura 1. Diagrama del ciclo celular en los organismos eucariotes.** Se muestran las cuatro fases del ciclo: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M, además de la fase de reposo G<sub>0</sub>. La progresión de una fase a otra está regulada por la interacción de los complejos ciclinas-Cdk; las ciclinas D están implicadas en G<sub>1</sub>, las ciclinas E en la transición de G<sub>1</sub> a S, las ciclinas A con la fase S y en el paso de G<sub>2</sub> a M, finalmente las ciclinas B están involucradas en la transición de G<sub>2</sub> a M. Se indican los puntos de control del ciclo (Tomado y Modificado de Graña y Reddy, 1995).

Para asegurar la integridad de la célula y de su material genético, los eventos que ocurren durante el ciclo celular deben de seguir una secuencia definida, donde el término de ciertos eventos debe preceder al comienzo de otros. Por ejemplo, la replicación del DNA debe completarse antes de que la mitosis inicie para asegurar que ambas células reciban una copia completa del genoma. Dentro del ciclo celular existen una serie de fases de vigilancia o control (conocidos en inglés también como checkpoints) para asegurar que el orden y el tiempo de los eventos sea el correcto

(Jonhson y Walker, 1999; Lowndes y Murguia, 2000). Estos puntos de vigilancia están representados por cascadas de señales que involucran sensores, transmisores y efectores que se activan al presentarse en las células situaciones anormales dentro de la progresión del ciclo, como serían errores en los procesos de la replicación, la falta de nutrientes o el daño al material genético entre otros. Así entonces dentro del ciclo celular encontramos diversos puntos de control como los que se están en la transición de G<sub>1</sub> a S, durante la fase de síntesis, en la fase G<sub>2</sub> o monitorizando la segregación de los cromosomas durante la mitosis (Stewart y Pietenpol, 2001, Zhou y Elledge, 2001) (Figura 1).

La activación de estas fases de control tiene como resultado la inhibición o el retraso de la progresión del ciclo celular para permitir la elección entre distintas señales que llevan a la citocinesis, diferenciación, entrada a la fase de reposo o latencia, o hasta que las anomalías generadas sean reparadas correctamente o bien a la eliminación de las células dañadas a través de la activación de mecanismos de muerte celular (Hung et al, 1996; Lowndes y Murguia, 2000).

### ***La transición de G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub>.***

El control de la proliferación celular en los eucariontes se realiza primero, en la transición de la fase G<sub>0</sub> al estado en división activa por los mecanismos de transducción de señales a través de los factores de crecimiento y segundo, en dos etapas de control dentro del ciclo celular de las células en división: uno en la fase G<sub>1</sub> tardía que dirige la entrada a la fase S y otro en G<sub>2</sub> tardía que regula el inicio de la mitosis (Pardee, 1989).

La interacción de los factores de crecimiento con sus receptores produce el estímulo de crecimiento celular. Estas señales desde la superficie de la célula al núcleo son mediadas por la activación de la proteína cinasa C y pasan hacia la cinasa MAP-2 (proteína activada por mitógenos) que fosforila a varias proteínas, entre las que están la proteína 2 asociada a microtúbulos, la caseína cinasa II y la proteína cinasa S6 ribosómica. Estas cinasas son activadas primero por mitógenos, ésteres de forbol o péptidos de factores de crecimiento (Boulikas, 1995). Sin

embargo, aún no son dilucidados en su totalidad los detalles acerca las vías de activación de cinasas mediadas por los factores de crecimiento.

En este sentido, se conoce que las células (fibroblastos BALB/C 3T3) cuando son cultivadas sin suero entran en un estado llamado  $G_0$  en cual el crecimiento y la división celular son detenidos y la adición de factores de crecimiento inicia una compleja serie de eventos que causan la entrada de las células a la fase  $G_1$  y que culminan en la síntesis de DNA durante el estado S y en la división de la célula durante la fase M (Rollins y Stiles, 1989; Norbury y Nurse, 1992).

Han sido identificados diversos genes cuya expresión se estimula por los factores de crecimiento en la transición  $G_0/G_1$  (Sukhatme et al, 1988). Estos genes denominados "inmediatos-tempranos" se caracterizan por su inducibilidad en presencia de inhibidores de la síntesis proteica y así, preexisten en las células en estado en reposo; por ejemplo, *c-fos* y *c-jun* modulan la expresión de los genes involucrados en la progresión del ciclo celular (Gutman y Wasylyk, 1991). Los esfuerzos por estudiar los eventos tempranos de la respuesta proliferativa han llevado a la identificación del factor de respuesta del suero (FRS) como un participante importante en el proceso de la activación (Treisman, 1987).

### ***La fase $G_0$ y su relación con la inhibición del crecimiento.***

Poco después de concluida la mitosis, las células tienen la opción de entrar en el siguiente ciclo celular o de alcanzar el estado  $G_0$  (Zetterberg y Larson, 1985). Las células en el estado  $G_0$  parecen tener un subconjunto de factores que inhiben la entrada a S, lo cual es mejor reflejado por las diferencias en las especies de RNA entre las células en crecimiento y las células en reposo (Williams y Penman, 1975). Cuando se eliminan los factores de crecimiento del cultivo celular, como la eliminación de suero fetal, las células entran al estado  $G_0$ . Los genes que específicamente se expresan en estas células en  $G_0$  son de interés especial debido a su uso potencial en la supresión del crecimiento de las células tumorales, como por ejemplo los genes *gas1* y *gas2* que codifican para proteínas localizadas en matriz

nuclear, citoesqueleto, membrana celular y la red secretoria (Schneider et al, 1988; Manfioletti et al, 1990).

### ***La transición de la fase G<sub>1</sub> a la fase S.***

Los elementos responsables de permitir que la célula pase de una fase a otra son una serie de proteínas cinasas que se activan y desactivan unas con otras. Las cinasas dependientes de ciclinas o cdk's son las responsables de fosforilar una serie de sustratos necesarios para la progresión del ciclo celular. Los niveles de estas proteínas no varían durante el ciclo, sin embargo, sus actividades se regulan por sus interacciones con otro grupo de proteínas denominadas ciclinas; la característica principal de las ciclinas, es su degradación proteolítica casi completa en la transición de la metafase/telofase y su resíntesis a través de las fases S y M temprana (Morgan, 1997).

En los estudios iniciales del ciclo celular, fue propuesto que la progresión de células en fase S era determinada por la acumulación de una proteína lábil llamada proteína de punto de restricción R (Pardee, 1974; Campisi et al, 1982). Los avances genéticos y bioquímicos mostraron que los complejos de Cdc2 (de cell division cycle genes) y de Cdk-2 (clase especial de cinasa-2 dependiente de ciclinas) con las ciclinas, regulan el punto de control G<sub>1</sub>/S y son consistentes con el modelo de que esta proteína R corresponde a la ciclinas E y A, que son las ciclinas de la fase G<sub>1</sub>, encontradas en las levaduras y las células de mamífero respectivamente ( Pines, 1997; Arellano y Moreno, 1997).

Existe evidencia de que las ciclinas A, D1 y E en asociación con Cdk's regulan la transición de la fase G<sub>1</sub> a la S (Pines, 1997). La ciclina A es esencial para la replicación del DNA, ya que promueve la progresión de las células a través de la fase de S, al asociarse con la proteína Cdk2 (Girard et al, 1991; Arellano y Moreno, 1997; Morgan, 1997). Además, la ciclina A está relacionada con la proteína del retinoblastoma (Rb) (ver adelante). Por su parte la ciclina D1 se asocia con varias proteínas tipo cinasas, incluyendo las cdk2, cdk4 y cdk5 para controlar el punto de la transición G<sub>1</sub>/S (Lew et al, 1992). La interacción entre la ciclina D1 y cdk4 por

ejemplo, permite controlar para controlar el paso a través de la fase G<sub>1</sub>, y Cdk4 es regulado en las células humanas a través de p16, en donde p16 secuestra a Cdk4 y de esta forma inhibe la actividad catalizadora de los complejos ciclina D/Cdk4 (Serrano et al, 1993). La ciclina D también se asocia con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) el cual está involucrado en la replicación y la reparación del DNA (Lania et al., 1999). En el caso de la ciclina E, se ha descrito que el complejo ciclina E/cdk2 en las células de mamífero también puede controlar la transición de la fase G<sub>1</sub>/S (Arellano y Moreno, 1997; Jonson y Walker, 1999; Lania et al., 1999).

Varios genes responden a las señales de proliferación y su expresión es esencial para la progresión de células a través de la fase de S. La expresión del gen de la histona por ejemplo, se activa en la fase S temprana y su expresión permanece a lo largo de ésta hasta que concluye la formación del nucleosoma nuevo (Stein et al, 1992). Varios factores de transcripción que están involucrados en síntesis de las histonas durante la fase S o en el empaquetamiento del DNA son regulados por fosforilación, entre los cuales esta incluido el factor Oct-1, importante en la regulación de la transcripción del gen de la histona H2B y en la activación de la duplicación del DNA (Fletcher et al, 1987). Otros genes requeridos para la síntesis del DNA y específicamente inducidos durante la fase de S son el gen dehidrofolato reductasa (*dhfr*) (Farnham y Schimke, 1985) y el gen timidilato sintetasa (Nagarajan y Johnson, 1989), así como el gen de la timidina cinasa regulado en G<sub>1</sub>/S por una cinasa *cdc2* y por una proteína parecida a Rb (Dou et al, 1992) y los genes de ciclinas ya mencionados.

Otros de los genes responsables de la progresión a través de la fase S del ciclo son los genes de la familia *myc* (*c -*, *N -*, *L-myc*) que codifican para proteínas relacionadas que parecen activar los orígenes de replicación (Iguchi-Arigo et al, 1988).

La proteína Rb, es una de las piezas centrales en la progresión de la fase G<sub>1</sub> a la fase S; en la fase G<sub>1</sub> temprana, esta proteína se encuentra hipofosforilada y forma



complejos con el factor de transcripción E2F, este factor media la transcripción de algunos genes celulares que contribuyen con las actividades enzimáticas involucradas en la replicación del DNA (Boulikas, 1995; Weinberg, 1995b); se ha reportado que la transcripción del factor E2F tiene un papel muy importante en el mando de genes involucrados en la activación de la replicación del DNA como por ejemplo los genes *myc* y *dhfr* (Mudryj et al, 1991) así como su participación en la activación de genes que transcriben enzimas necesarias para la síntesis de precursores de los nucleósidos y enzimas que parecen ser requeridas para la replicación del DNA (Weinberg, 1995a). De esta forma Rb, actúa durante  $G_0$  o  $G_1$ , secuestrando el factor E2F e inhibiendo así la transcripción de un grupo de genes requeridos para entrar a la fase S del ciclo celular. La proteína Rb al final de la fase  $G_1$  es fosforilada por las cinasas Cdk, lo cual hace que cambie la conformación y los complejos Rb-E2F sean liberados, de esta manera, conduce a la transcripción de genes y a un aumento en la actividad metabólica concerniente a la replicación del DNA (Weinberg, 1995b). Parece que Rb también regula la actividad de transcripción de las RNA polimerasas I y III, que transcriben RNA ribosomal y de transferencia, respectivamente (White, 1997).

### ***El punto de control de la fase $G_2/M$ .***

La transición de  $G_2/M$  se caracteriza por alteraciones estructurales muy evidentes en la célula. Estos cambios incluyen el desmontaje de la membrana nuclear por la despolimerización de la capa laminar, el empaquetamiento de la cromatina interfásica en los cromosomas mitóticos, el ensamble de la red de filamentos de actina; y otros cambios como el desmantelamiento de los microtúbulos citoplásmicos y su reensamble en el huso mitótico, así como el apilamiento del aparato de Golgi y la vesicularización del retículo endoplásmico (Alberts et al, 1989).

En este punto de control, la proteína p34<sup>cdc2</sup> tiene un papel crucial (Nurse, 1990). La defosforilación de un solo residuo tirosina en p34<sup>cdc2</sup> facilita la entrada de células en la mitosis (Goul y Nurse, 1989). Otros estudios en este campo indican que el ciclo de la célula es principalmente regulado a través de cdc2 en asociación

con las ciclinas B en la fase G<sub>2</sub>/M (Slingerland et al, 1994). Otro evento importante es la fosforilación de la histona H1 y las láminas por la proteína Cdc2, dicho evento dispara el ensamble de los cromosomas y la ruptura de la lámina nuclear, respectivamente, como un prelude a la mitosis. También el factor promotor de maduración (FPM) compuesto por p34<sup>cdc2</sup> (o Cdc2Hs en células humanas) y por las ciclinas de tipo B es responsable de activar todos estos eventos de la mitosis regulando el punto de transición G<sub>2</sub> a M (Morgan, 1997 ; Pines, 1997; Lania et al., 1999).

## **EVENTOS BIOQUIMICOS ASOCIADOS CON LA PROLIFERACION CELULAR.**

La regulación de proliferación celular ocurre a través de la activación de las rutas bioquímicas mediante la interacción de los factores del crecimiento (o mitógenos) con sus receptores en la membrana plasmática. Hay diferentes factores de crecimiento, por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor de crecimiento parecido a insulina (IGF) entre otros. Una sola célula tiene a menudo una variedad de tipos de receptores, sin embargo, sólo son conocidos cuatro mecanismos básicos de señalización que pueden ser activados por trans-receptores de la membrana:

1) *Activación de adenilato ciclasas.* La función de las adenilato ciclasas (enzimas unidas a la membrana) es generar AMP cíclico a partir de ATP, en respuesta a una variedad de receptores agonistas (por ejemplo, hormonas y neurotransmisores). La actividad de la adenilato ciclasa es regulada positiva o negativamente por proteínas G heterotriméricas específicas (G<sub>s</sub> y G<sub>i</sub>). El proceso ocurre cuando cambia la conformación del receptor por unión con su factor de crecimiento (ligando), dejando accesible el sitio del receptor con el que se une a la proteína G; la unión del complejo ligando/receptor con la proteína G activa el desplazamiento de GTP a GDP causando la disociación de la subunidad  $\alpha$  y de esta forma expone el sitio para la unión y activación de la adenilato ciclasa para generar

muchas moléculas de AMP cíclico (Gilman, 1984). En los últimos años al menos ocho isoformas de adenilato ciclasas han sido clonadas y expresadas.

Las mutaciones en las proteínas G ocurren en algunos cánceres humanos, por ejemplo, mutaciones en la proteína GSP/ $G\alpha_s$  conducen a una elevación sostenida de AMP cíclico en algunos carcinomas de tiroides y en tumores ováricos y mutaciones en la proteína GIP2/ $G\alpha_{i2}$  en tumores de la corteza suprarrenal y en tumores ováricos endocrinos ((Michiels et al, 1994; Muca y Vallar, 1994). Esta vía de señalización que involucra a las proteínas cinasas dependientes de AMP cíclico es importante porque regulan muchos procesos celulares.

2) *Activación de adenilato ciclasas para generar GMP cíclico.* Se sabe que el GMP cíclico activa a una proteína cinasa específica (cinasa G) que fosforila proteínas blanco en la célula. Si bien, el papel en la señalización por receptores de membrana, con muy pocas excepciones, es poco claro, su acción es especialmente bien conocida en las células de la retina, donde el GMP cíclico actúa directamente en los canales de  $Na^+$  manteniéndolos abiertos. Además de que las concentraciones de GMP cíclico son moduladas en las células fotorreceptoras en respuesta a la luz, también media otros procesos que incluyen, la relajación de músculo liso (Schnapf y Baylor 1987).

3) *Activación de enzimas fosfolipasas (principalmente PtdIns-PLC $\beta_1$ ).* Las enzimas fosfolipasas se activan por la interacción de agonistas con receptores transmembranales de siete segmentos que son acoplados a proteínas G heterotriméricas específicas. Los sistemas de señalización que utilizan proteínas G son muy diversos, como se menciona arriba algunas de las proteínas G ( $G_s$  y  $G_i$ ) acoplan receptores para la adenilato ciclasa, mientras que otras ( $G_p$ ) acoplan receptores para la fosfolipasa C. La interacción factor de crecimiento/receptor es asociada con la activación de la fosfolipasa C unida a la membrana, la cual cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP $_2$ ) a diacilglicerol (DG) e inositol 1,2,5-trifosfato (IP $_3$ ). La acción de IP $_3$  incrementa la concentración

intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  libre, llevando a la activación de varias proteínas y enzimas, entre ellas una proteína receptora de calcio, la calmodulina. Se sabe que la progresión de las células de  $G_1$  a S es dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  (Reddy, 1994). Por otra parte, el DG activa la proteína cinasa C, la cual fosforila proteínas blanco en residuos de serina y/o treonina. Tanto la proteína cinasa C, como los nucleótidos cíclicos (AMP y GMP) son ampliamente implicados en la proliferación celular (Persons et al, 1988).

Algunas células cancerosas sobreexpresan además de algunas oncoproteínas, los receptores transmembranales o las proteínas G mutadas, por ejemplo,  $\text{GIP2/G}_{\alpha 2}$ ,  $\text{G}_{\alpha 13}$ ,  $\text{GSP/G}_{\alpha s}$ ,  $\text{G}_{\alpha q}$  (Michaels et al, 1994; Muca y Vallar et al, 1994).

4) *Activación de las cinasas.* Las cinasas de tirosina, representan el grupo más importante, y a menudo son componentes intrínsecos de la molécula del receptor. Este grupo incluye a los receptores para muchos factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, PDGF, NGF). Otra vía de transducción de señales activada por la interacción factor/receptor involucra a las cinasas MAP y algunas de las proteínas reguladoras fosforiladas por estas cinasas son también conocidas por fosforilar a las cinasas dependientes de ciclinas (Izume y Maller, 1991). Además, una cascada de reacciones de cinasas y fosfatasas tras las interacciones factor/receptor, también resulta en la expresión de algunos de los oncogenes, como *c-fos*, *c-myc* y *c-ras*, cuyos productos son críticos en la progresión de las células de  $G_1$  a S.

## II. P53, EL GUARDIAN DEL GENOMA.

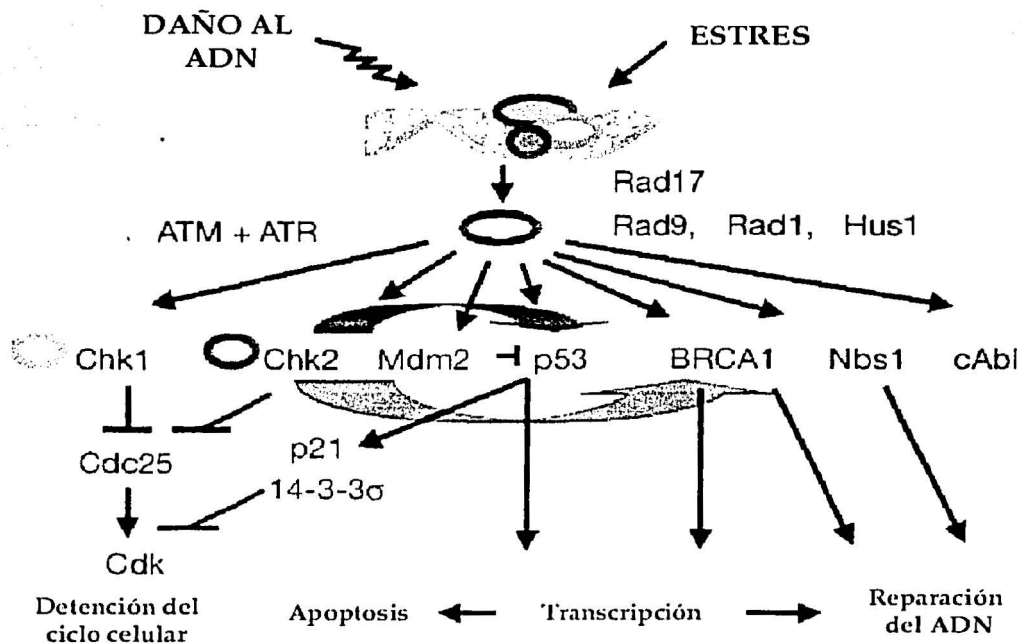
### *ESTRUCTURA DEL GEN Y LA PROTEINA P53.*

Si bien los sistemas de vigilancia en células de mamífero están conformados a diferentes niveles por un gran número de proteínas reguladoras (Figura 2), uno de los elementos más importantes en el control de estos sistemas y de la regulación de las señales que ahí se transducen es la proteína supresora de tumores P53, nuestro "guardián del genoma".

En humanos el gen p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17, específicamente en la región p13. El gen comprende cerca de 20 kb de DNA y se compone de 11 exones, de los cuales el primero no participa en la secuencia codificante de la proteína. (Oren et al., 1985; Resiman y Loging, 1998). Durante la evolución este gen ha sido conservado, en particular en 5 regiones conocidas como los dominios del I al V (Soussi et al, 1990). Con el avance en los estudios sobre este gen, estos dominios resultaron ser primordiales para las funciones de p53 (Soussi y May, 1996).

En el genoma humano se han identificado dos promotores para p53 hacia el extremo 5' del gen. El primero de ellos, p1 se localiza secuencia arriba del primer exón y es el responsable de la transcripción de las principales especies de RNAm (Reisman y Rotter, 1989). Mientras que el segundo promotor o p2 localizado justo dentro del primer intrón de p53 y se le ha relacionado con la diferenciación celular (Reisman y Rotter, 1989; Reisman et al., 1996).

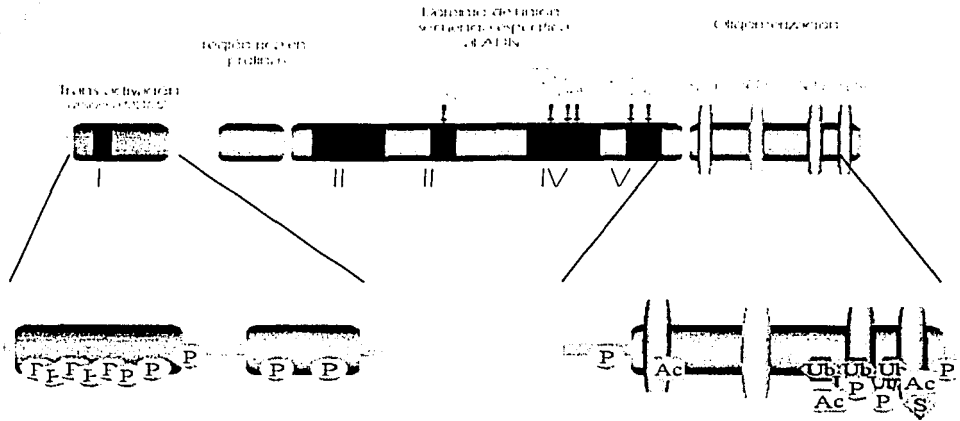
El gen p53 humano codifica para una proteína de 393 amino ácidos. La proteína se ha dividido funcionalmente y estructuralmente en cuatro diferentes



**Figura 2. Cascada de señalización y proteínas involucradas en los sistemas de vigilancia.** Tomada y modificada de Zhou y Elledge, 2001.

regiones o dominios (Unger et al. , 1993; Wang et al. , 1994) (Figura 3). Hacia el extremo amino terminal (amino ácidos 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 está regulada negativamente por la proteína E1B del adenovirus y la proteína hMDM2 a través de la interacción con los aminoácidos L22 y W23 de P53 (Stewart y Pietenpol, 20001). El extremo amino terminal también presenta entre los aminoácidos 64 al 92 una región rica en prolina, 5 en total con la secuencia PXXP. Este dominio 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

van a ser activados transcripcionalmente por P53, por ejemplo esta región no es necesaria para la activación de los genes  $p21^{Waf1/Cip1}$  y  $bax$ , pero si se requiere para la activación de  $pig3$  (Venot et al., 1998). El extremo amino terminal de la proteína P53 presenta numerosos residuos de serinas y treoninas; aminoácidos que se ha demostrado son sujetos a fosforilación como parte de la regulación de la funcionalidad de P53 (Meek, 1999), de la cual se hablará más adelante.



**Figura 3. Dominios funcionales de la proteína P53.** En la figura se muestran los principales dominios y modificaciones en la proteína. P= fosforilación; Ac= acetilación; Ub= ubiquitinación; S=sumolización. En números romanos se indican las regiones conservadas así como con las fechas los principales puntos calientes o hot spots de las mutaciones. SLN= señal de localización nuclear; SEN= señal de exportación nuclear.

El dominio de unión específica al DNA de P53 ocupa casi 2/4 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 que más del 90% de las mutaciones que inhabilitan la funcionalidad de P53 se encuentran dentro de dominio (Nigro et al., 1989; Kern et al., 1991 a).

El extremo carboxilo básico terminal (amino ácidos 294-393) presenta un dominio subdividido funcionalmente en 3 diferentes motivos, uno de localización nuclear (residuos 315-386), un dominio de oligomerización (residuos 337-355) y uno de exportación nuclear (residuos 340-351). Tanto los motivos de localización y exportación nuclear regulan la localización celular de P53 entre el núcleo y el citoplasma (Shaulsky et al., 1991). El dominio de oligomerización conformado por una hélice anfipática juega un papel muy importante en la actividad biológica de P53. Modificaciones covalentes como fosforilaciones y acetilaciones sobre esta región permiten que P53 pase de una conformación inactiva a una conformación activa formando homodímeros u homotetrámeros y pueda funcionar como factor de transcripción (Waterman et al., 1995; Sturzbecher et al., 1992). Esta región participa también en el efecto negativo dominante de las proteínas mutantes de P53 sobre las proteínas P53 silvestres, impidiendo que éstas últimas puedan interactuar con el DNA (Kern et al., 1991b). Finalmente la tetramerización de P53 enmascara la señal de exportación nuclear, lo que se traduce a que P53 sea retenido en el núcleo y previene que sea exportado hacia el citoplasma donde sería degradado (Stommel, et al., 1999)

### ***FUNCIONES DE LA PROTEINA P53.***

La proteína supresora de tumores P53 es una fosfoproteína nuclear polifuncional. En células normales y bajo condiciones sin estrés, el gen p53 continuamente se está transcribiendo y traduciendo, sin embargo el producto proteico final está sujeto a una rápida degradación vía ubiquitinación por proteasomas (Chowdary et al., 1994; Maki et al., 1996), razón por la cual los niveles de P53 en las células de la mayoría de los tejidos son muy bajos o casi al límite de la detección. La activación de P53 en respuesta a varios tipos de estrés y daño se establece principalmente a través de modificaciones post-traduccionales lo que permite disminuir su grado de degradación y cambiar su conformación para incrementar su actividad funcional. Diversas funciones se le han atribuido a P53. Esta proteína puede actuar como represor transcripcional y como factor inhibidor



de la traducción de ciertos RNA mensajeros (Chumakov, 1999). Hay reportes que indican que P53 participa "per se" en el proceso y reconocimiento del daño al DNA dado que presenta actividad exonucleasa 3'-5', la capacidad de unirse a moléculas de cadena sencilla de DNA, y a bases del DNA no pareadas (Reed et al., 1995). Pero sin lugar a dudas, la principal función de P53 es su acción como factor de transcripción (Raycroft et al., 1990; Kern, et al., 1991).

P53 en potencia, tiene la característica de unirse al DNA tanto de manera no específica como específica. Se ha propuesto que la interacción no específica se presenta cuando la proteína P53 lleva a cabo el reconocimiento del daño al DNA (El-Deiry, 1998), dado que P53 presenta actividad exonucleasa 3'-5' y puede unirse directamente al DNA de cadena sencilla y/o a bases sin aparear. En cuanto a la interacción específica, P53 trabaja como factor de transcripción al unirse DNA a través de secuencias específicas con el dominio de unión al DNA de la proteína, 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 0-13 pb. Resulta interesante mencionar que dicha secuencia está degenerada en 8 de las 10 bases, lo cual pudiera influir en la activación selectiva de los genes transcripcionalmente blanco para P53 después de diferentes estímulos (El-Deiry, et al., 1992). Pese a que P53 también puede reprimir la expresión de genes, esta función parece no estar directamente relacionada con la unión de secuencia-específica al DNA.

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). Con el avance tecnológico y la aparición de los microarreglos de DNA, la cascada transcripcional regulada por P53 ha sido estudiado más a fondo. Zhao y colaboradores (2000) utilizando línea celular de cáncer de colon humana EB-1, que acarrea una versión silvestre del gene p53 bajo el control de un promotor inducible, observaron que de 6000 genes estudiados, 107 fueron inducidos mientras que 54 fueron reprimidos en su expresión. Además de los genes

involucrados en la regulación de los procesos de apoptosis, ciclo celular e inhibición de la angiogénesis, se encontraron otros genes relacionados con otros aspectos de la función celular: genes que participan en funciones del citoesqueleto, factores de crecimiento y sus inhibidores, genes de matriz extracelular y de adhesión, así como genes de reparación del DNA y señalización. En la tabla 1 se muestran los principales genes que son activados por P53 agrupados de acuerdo a sus efectos en la célula.

Tres mecanismos principales han sido descritos para regular la actividad de unión al DNA de P53. El primer mecanismo se refiere a la estabilización de la proteína en su extremo amino terminal debido a modificaciones post-transcripcionales principalmente por fosforilación que llevan a la separación del regulador negativo hMDM2. Los cambios conformacionales en el extremo carboxilo terminal, a través de acetilaciones y fosforilaciones, en específico sobre los dominios de localización y exportación nuclear así como de tetramerización, representan un segundo mecanismo. Finalmente un tercer mecanismo involucra la defosforilación en el carboxilo terminal. Adicionalmente las modificaciones post-traduccionales sobre la conformación de P53 o la interacción proteína-proteína pudieran afectar o selectivamente alterar la afinidad de P53 por sitios de unión al DNA particulares. Lo cual sugiere la posibilidad de que en respuesta a cierto tipo de señales, diferentes programas de activación-represión pudieran estar dirigiendo las respuestas biológicas de las células.

A la proteína P53 se le han atribuido funciones adicionales e independientes de su actividad como factor de transcripción, aunque aun no han sido bien entendidas. Dentro de estas podemos incluir la regulación en la localización de receptores involucrados en apoptosis como Fas en organelos citoplasmáticos como el aparato de Golgi y del mismo rol de P53 en mitocondria (Ryan et al 2001).

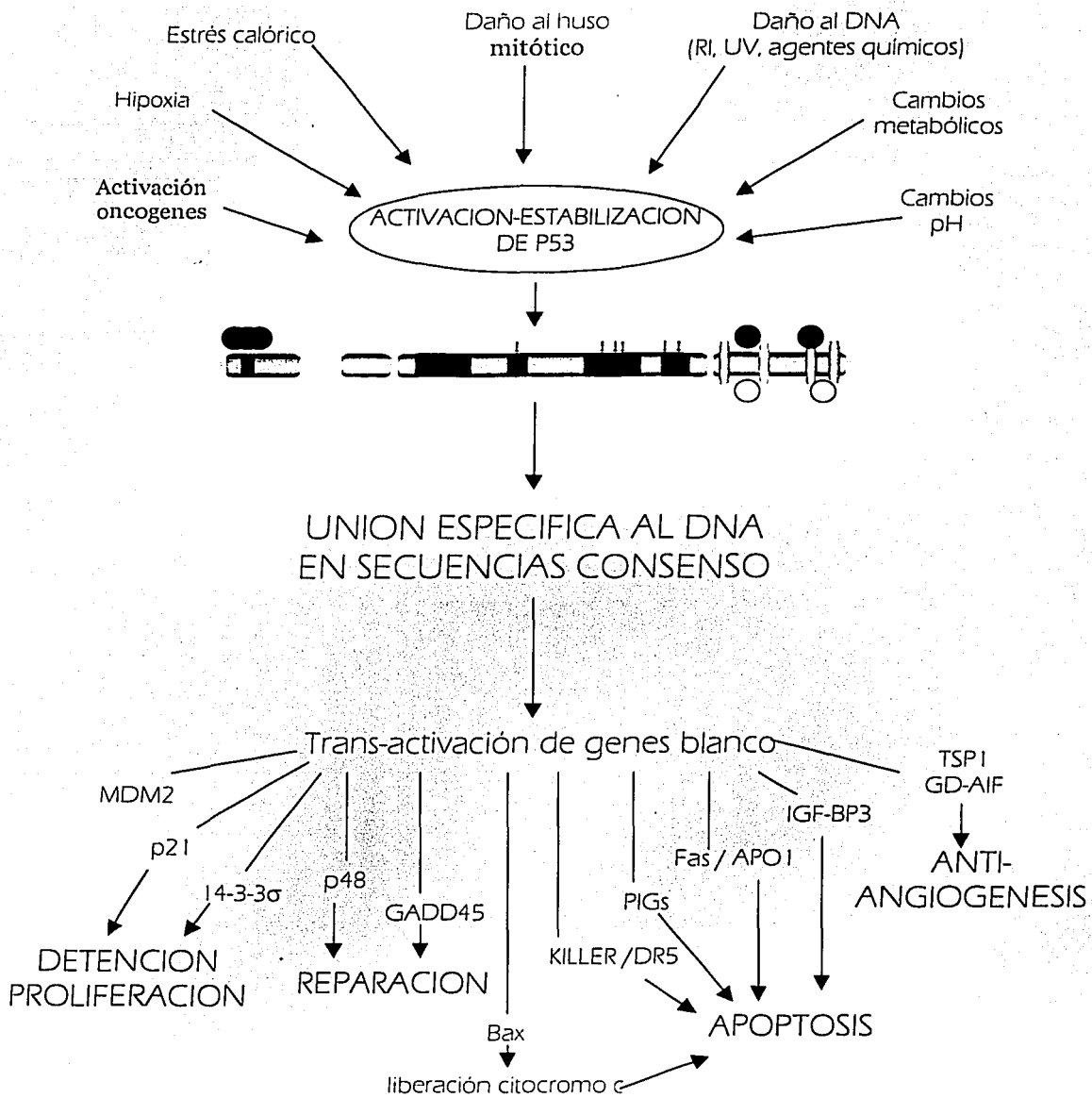
En la figura 4 se muestra de manera complementaria y generalizada los eventos que media P53 ante la presencia de daño o estrés celular en las células eucariotas. Los rompimientos al DNA provocados por agentes físicos (radiación

**Tabla 1. Genes transcripcionalmente activados por P53.**

<b><i>Genes mediadores de la detención del ciclo celular y reparación</i></b>
p21 (WAF1) 14-33-σ GADD45 B99 p48
<b><i>Genes mediadores de apoptosis</i></b>
Bax Fas/APO1 Killer/DR5 PIGs (p53 -induced genes) p85 PAG6o8 IGF-Bp3
<b><i>Genes mediadores de la inhibición de la angiogénesis</i></b>
Tsp1 BAI1 GD-AiF
<b><i>Genes mediadores de para la autorregulación de p53</i></b>
MDM2
<b><i>Genes cuyas funciones no están bien determinadas</i></b>
Ciclina G GML Wip1 EI24 EI-1α HIC-1 RTP/rit42 TP53TG1 Catepsina D Wig-1

ionizante, radiación UV) 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). La relación que guarda la activación de P53 con el detenimiento de la proliferación celular y la activación de la apoptosis a través de los sistemas de monitoreo son dependientes del tipo de daño o estrés inducido y sobre todo del tipo celular, no obstante el rol molecular específico que juegan las modificaciones post-traduccionales así como los blancos celulares no están claramente elucidados.



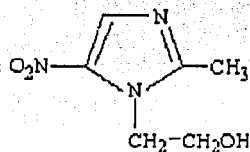
**Figura 4. Cascada de activación y señalización de P53.** La proteína P53 es estabilizada y activada después de la exposición de diferentes tipos de estrés incluidos el daño al DNA. La activación de P53 permite que esta proteína actúe como factor de transcripción de diferentes genes, lo cual dependerá del tipo de estrés inducido así, las modificaciones a las cuales esté sujeta la proteína (fosforilaciones, acetilaciones) así como del tipo celular. El significado biológico de esta cascada será la detención de la proliferación celular, la reparación del daño, la inducción de muerte celular o bien un efecto anti-angiogénico.

### III. EL METRONIDAZOL.

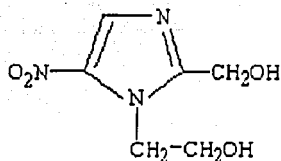
El metronidazol (MTZ) es un agente sintético con propiedades bacterianas y antiparasitarias que se encuentra clasificado dentro de la clase de los nitroimidazoles y cuyo empleo en la práctica clínica ya tiene más de 35 años y que en nuestro país es de uso muy común. Hoy en día el MTZ o (1-( $\beta$ -hidroxietil (-2-metil-5-nitroimidazol) (Figura 5) está considerado dentro de la lista de los medicamento esenciales de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999).

El MTZ se desarrolló con el propósito de combatir infecciones por *Trichomonas vaginalis*. Con el tiempo, el espectro de uso del metronidazol se fue ampliando y comenzó a ser empleado para combatir las infecciones provocadas por otros protozoarios como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. Hoy en día el metronidazol también es considerado uno de los medicamentos más eficaces para combatir las infecciones por bacterias anaerobias tanto gram-negativas como positivas destacando la infección por *Helicobacter pylori* (ver anexo 1).

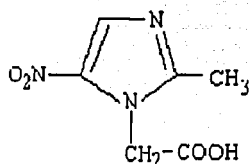
Se propone que el mecanismo de acción del MTZ es a través de la eliminación del potencial reductor de microorganismos anaerobios y microaerofilicos (Samuelson, 1999). El MTZ es relativamente inactivo hasta que es metabolizado dentro de los organismos susceptibles; es activado cuando se reduce gracias a la acción de proteínas transportadoras de electrones como la piruvato:ferrodoxina oxidoreductasa o la flavodoxina localizadas en el interior del parásito/bacteria, las cuales realizan la reducción del grupo nitro del MTZ que resulta en la formación de N-(2-hidroxietil) del ácido oxámico y de acetamida, compuestos altamente tóxicos. Además se ha sugerido que la forma nitroreducida del MTZ daña a las células al formar aductos con proteínas y ácidos nucleicos. (Samuelson, 1999).



**METRONIDAZOL**



**METABOLITO HIDROXILADO**



**METABOLIDO ACETILADO**

Figura 5. Estructuras del metronidazol (MTZ) y de sus dos principales formas metabólicas en el humano.

A nivel de farmacocinética, el MTZ es uno de los agentes antibacterianos y antiparasitarios más estudiados. En el ser humano, el MTZ se distribuye a todo el organismo y tiene una vida media en plasma promedio de 8 horas. La principal vía de biotransformación del MTZ es el metabolismo oxidativo llevado a cabo en su mayoría por enzimas del complejo citocromo P 450, que dan origen a 4 formas metabólicas (Figura 6) de las cuales las más importantes clínicamente son las formas metabólicas metil-hidroxilada y carboxi-acetilada, las cuales son excretadas por la vía urinaria. (Ver anexos 1 y 2).

Aunque considerado como un agente mutagénico en bacterias (Dale, 1989; De Meo et al., 1992) y carcinógeno en animales (IARC, 1987), existe mucha controversia en cuanto a los efectos genotóxicos y carcinógenos del MTZ y de sus metabolitos en humanos (ver anexos 1 y 2), incluso la Agencia Internacional en la Investigación del Cáncer IARC por sus siglas en inglés considera insuficientes los datos para considerar al MTZ como un carcinógeno humano (IARC, 1987).

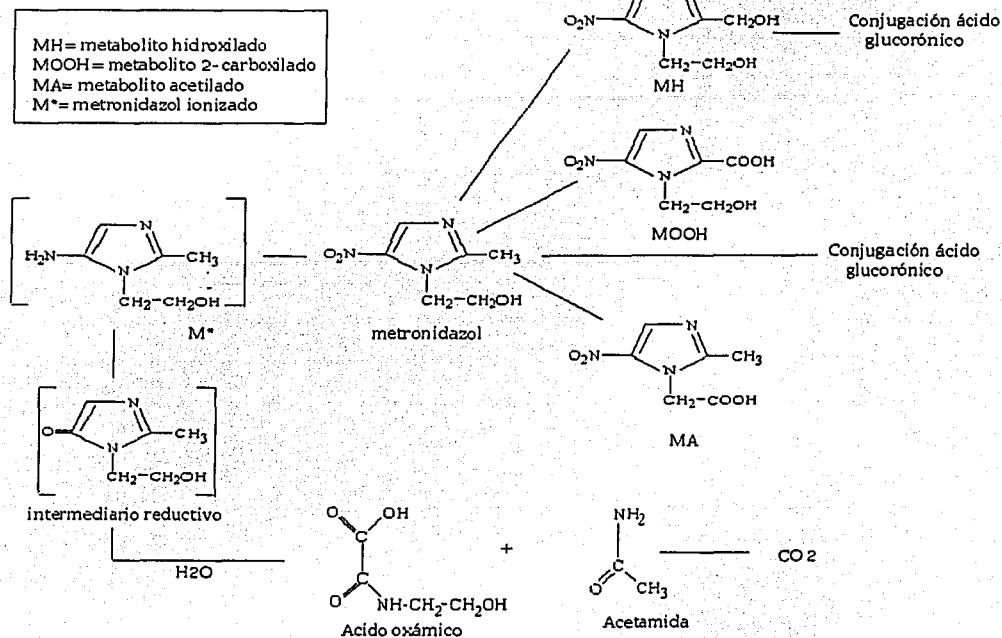


Figura 6. Vías de la biotransformación del MTZ en humanos. Se muestran los productos del metabolismo oxidativo MH, MA y MOOH, así como también los metabolitos del metabolismo reductor ácido oxámico y acetamida.

Uno de los principales problemas en cuanto a la carcinogenicidad del MTZ en humanos es que el tiempo de seguimiento de los estudios realizados ha sido dentro de un rango de 10 a 12 años, cuando se ha reportado que el mínimo de tiempo para evaluar la carcinogenicidad de un compuesto en humanos es de 20 años (ver anexo 2).

A nivel celular, estudios realizados en nuestro grupo han mostrado que en linfocitos humanos de pacientes tratados con MTZ se encontró que este medicamento incrementa la proliferación celular (Elizondo et al., 1996). Estos datos han sido corroborados en estudios *in vitro* tanto en linfocitos humanos como



linfocitos de ratón (Miller et al., 1980, Bahr y Ulman, 1983; Elizondo y Ostrosky, 1994, Shubert et al., 1996). En el caso particular de los estudios con linfocitos humanos, tanto *in vitro* como *in vivo* se ha reportado la existencia de respuestas individuales a los efectos del MTZ ( Elizondo y Ostrosky, 1994; Elizondo et al., 1996).

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.

Elizondo y colaboradores (1996) encontraron un incremento en la proliferación de linfocitos de individuos tratados con MTZ además de un aumento en el número de aberraciones cromosómicas. Las células que presentaron mayor daño al DNA fueron las que más proliferaron. En ambos parámetros se encontró una respuesta diferente entre los donadores. Esta relación proliferación-daño provocada por el MTZ es un suceso paradójico, ya que por lo general al existir un daño en el DNA, los puntos de control del ciclo celular, que representan un sistema de vigilancia en el mantenimiento de la fidelidad e integridad de la replicación y reparación del genoma, interrumpen la progresión del ciclo para permitir la reparación del daño o la eliminación de la célula (Hartwell y Kastan, 1994; Paulovich et al., 1997). Es decir que se esperaría que la proliferación de las células tratadas con MTZ fuera más lenta debido al daño al DNA inducido por este compuesto. Sin embargo, los datos de Elizondo y cols (1996) sugieren lo contrario.

Si bien los sistemas de vigilancia en células de mamífero están conformados por un gran número de proteínas reguladoras a diferentes niveles (Figura 2), uno de los elementos más importantes en el control de estos sistemas y de la regulación de las señales que ahí se transducen es la proteína supresora de tumores P53, nuestro "guardián del genoma". Por lo que por el hecho de que las células con daño al DNA sigan proliferando podría deberse a que el MTZ inactiva a P53. Por otro lado las diferencias individuales reportadas serían el resultado de diferentes efectos del MTZ y de sus metabolitos en la respuesta de P53. Para contestar estas preguntas, usamos linfocitos humanos para evaluar tanto *ex vivo* como *in vitro*, así como líneas celulares con diferente funcionalidad de P53, si el MTZ y/o sus metabolitos producen diferentes tipos de daño al DNA, si el daño generado puede ser reparado, así como el papel que juega P53 tanto a nivel biológico como funcional en estos efectos y en la respuesta individual.

## HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

Hipótesis: El daño al DNA y el incremento en la proliferación celular inducidos por el MTZ y sus metabolitos interfieren con la expresión y función de la proteína supresora de tumores P53. Las diferencias en la magnitud, tiempo y funcionalidad de la proteína P53 darán como resultado una sensibilidad individual a los efectos genotóxicos y la alteración de la proliferación celular por el tratamiento con MTZ o sus metabolitos.

Como objetivo general de este trabajo se determinó si el MTZ y sus metabolitos producen daño al DNA, y si alteran la expresión de P53 y la progresión del ciclo celular. También se investigó si hay diferencias individuales en los efectos del MTZ y si estos se encuentran relacionados con la expresión de la proteína P53.

Los objetivos particulares fueron:

- Establecer qué tipo de daño al DNA induce el tratamiento con MTZ y sus metabolitos.
- Determinar si el MTZ y/o sus metabolitos inducen un incremento en los niveles de la proteína P53.
- Establecer los efectos que tiene el MTZ y sus metabolitos sobre la proliferación celular.
- Determinar el significado de la respuesta de P53 en relación con el daño al DNA y con la capacidad proliferativa de las células.
- Establecer que relación guarda la respuesta individual a los efectos del tratamiento con MTZ con la activación y la funcionalidad de la proteína P53.

## V. MATERIAL Y METODOS.

### *Estudio ex vivo.*

#### *Selección de voluntarios.*

La selección de individuos sanos para la realización del estudio *ex vivo* se llevó a cabo en base a criterios de exclusión e inclusión, exámenes físicos y médicos, así como el consentimiento informado de los voluntarios para su participación en el estudio, el cual estuvo avalado por el Comité de Ética del Hospital General Miguel Silva y las autoridades del Estado de Michoacán.

#### *a) Criterios de inclusión y de exclusión.*

Mediante la aplicación de cuestionarios (Cuadro 1) a los voluntarios, se determinaron los criterios de inclusión y exclusión, con la finalidad de evitar, dentro de lo posible, variaciones y factores que pudieran confundir la interpretación de los resultados.

#### *b) Exámenes físicos- médicos.*

Para la evaluación del estado de salud de los voluntarios se realizaron los siguientes estudios: biometría hemática, química sanguínea, examen general de orina, determinación de antígenos virales (HVB y HIV) y examen físico, el cual consistió en la determinación de la frecuencia cardíaca, presión arterial, electrocardiograma, revisión de los sistemas respiratorio y gastrointestinal. También se determinó la edad, estatura y peso corporal.

#### *c) Carta de consentimiento.*

Una vez seleccionados los voluntarios, se les dio una explicación detallada del estudio, y se les invitó a firmar una carta de consentimiento (Cuadro 2).

## Cuadro 1. Criterios de inclusión y exclusión

<u>Clave del sujeto</u>	<u>Número del sujeto</u>	<u>Iniciales</u>
<b>CRITERIOS DE SELECCIÓN</b>		
<b>Criterios de inclusión.</b>		
<i>No se incluye al sujeto si alguna de las respuestas es no.</i>		
1.- ¿Es el sujeto de sexo masculino?	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
2.- Edad entre 18 y 25 años.	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
3.- Forma de consentimiento por escrito	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
4.- ¿Está el sujeto en condiciones saludables?	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
5.- Peso entre 55 y 65 kg.	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
<b>Criterios de exclusión.</b>		
<i>No se incluye al sujeto si alguna de las respuestas es sí.</i>		
1.- Antecedentes a exposición reciente y directa a plaguicidas, agentes químicos u hormonas.	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
2.- Antecedentes de abuso de alcohol y drogas.	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
3.- ¿Se encuentra bajo tratamiento médico?	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
4.- Fuma.	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
5.- Incidencia de cáncer familiar	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
6.- ¿Ha participado en algún estudio de investigación 30 días previos al inicio de este estudio?	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
7.- Exposición a rayos X en el último mes.	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
8.- ¿Ha donado o le han donado sangre en los últimos 60 días?	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Firma del investigador _____		

**Cuadro 2. Carta consentimiento.**

**CONSENTIMIENTO**

El que suscribe \_\_\_\_\_ con domicilio en \_\_\_\_\_ certifica que tiene \_\_\_\_\_ años de edad, que ha leído este formato y que todas las preguntas al respecto le han sido contestadas en forma satisfactoria. Conozco los objetivos, maniobras y riesgos que se derivan de mi participación en el estudio "Evaluación de daño genético en individuos sanos tratados con metronidazol", que se realiza bajo la responsabilidad del Dr. \_\_\_\_\_.

He revisado la autorización del proyecto por parte del Comité de Investigación y del Comité de Ética del Hospital General Miguel Silva y certifico que he sido informado de mi libertad para suspender este consentimiento de colaboración.

En plenitud de facultades físicas y mentales y sin ninguna acción coercitiva, accedo a participar en este estudio y firmo este consentimiento en la ciudad de Morelia el día \_\_\_\_\_ del mes \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.

**ATENTAMENTE**

Vo.Bo. Presidente del Comité de Ética:

### *Tratamiento de los individuos y toma de muestras.*

Se trabajó con 10 individuos sanos, los cuales siguieron una terapia recomendada para el tratamiento de amibiasis, que consistió en la administración oral de 500 mg de metronidazol (Flagyl) cada 8 h durante 10 días. Las muestras de sangre se tomaron en ayunas un día antes de la primera toma, un día y 15 días después de finalizada la terapia. Estas fueron recolectadas por venopunción con Vacutainers de 125 x 16 mm, revestidos con heparina. Las muestras se enviaron de Morelia vía aérea a temperatura ambiente al laboratorio en México D.F., donde fueron codificadas y procesadas para la obtención de células mononucleadas y su criopreservación en nitrógeno líquido.

### *Obtención de células mononucleadas de sangre periférica y criopreservación.*

Para la obtención de las células mononucleadas de sangre periférica, se centrifugaron 15 ml de sangre a 1,600 rpm durante 30 min en un gradiente de Fycoll-Hypaque (Sigma). El anillo de células blancas se recuperó y fue lavado dos veces en medio RPMI a través de centrifugación a 1,200 rpm durante 10 min (Peper et al., 1968). El botón celular se resuspendió en 2 ml de medio RPMI 1640 y el número de células así como su viabilidad se determinaron mediante la exclusión del colorante vital azul de tripano. Aproximadamente  $10 \times 10^6$  células por ml fueron puestas en una solución de criopreservación y congeladas lentamente en nitrógeno líquido de acuerdo a lo descrito por Visvardis y colaboradores (1997).

### *Ensayo de viabilidad por fluorocromos.*

El principio de este ensayo radica en la evaluación del estado del metabolismo lisosomal y la integridad de la envoltura nuclear (Strauss, 1991). Esta metodología se realizó de acuerdo a lo descrito por Hartman y Speit (1995), con algunas modificaciones. Las células se mezclaron en proporción 1 a 1 con una solución de fluorocromos [0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de bromuro de etidio (Et-Br) y 0.015  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de 5,6-carboxiacetato de fluoresceína (FDA)] para posteriormente ser analizadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BMX-60 empleando un filtro UM61002. La fluorescencia dual permite detectar y clasificar a las células visualizadas de color

rojo como muertas y las células verdes como vivas. Se evaluaron 100 células por condición por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje.

#### *Cultivo de linfocitos humanos.*

Una vez obtenidos y calculado el número de células mononucleadas de sangre entera, estas se llevaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por ml en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 15% de suero fetal bovino (Hyclone) inactivado por calor a  $56^\circ\text{C}$ , aminoácidos no esenciales (10 mM, Gibco), L-glutamina (2 mM, Sigma) y solución de antibióticos y antimicóticos (penicilina 10 000 unidades/ml, sulfato de estreptomycin 10,000 unidades/ml y fungizona 25  $\mu\text{g/ml}$ , (Gibco). Se sembraron 3 ml por tubo y se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de fitohemaglutinina (PHA, Gibco) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante diferentes tiempos.

#### *Ensayo de electroforesis unicelular alcalina.*

Para evaluar rompimientos de cadena sencilla en el DNA se utilizó el ensayo de electroforesis unicelular o ensayo del cometa en su modalidad de pH 13 (Rojas et al, 1999) con algunas modificaciones. Las laminillas fueron preparadas de la siguiente manera, 50  $\mu\text{l}$  de las muestras de linfocitos obtenidos de la sangre periférica de los individuos tratados con MTZ o 150  $\mu\text{l}$  de los cultivos de linfocitos fueron mezclados con 75  $\mu\text{l}$  de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (Sigma) y colocados en un laminilla previamente revestida con una capa de agarosa regular al 0.5% (Sigma) y cubiertas con un portaobjetos. Las laminillas fueron puestas a  $4^\circ\text{C}$  para acelerar el proceso de gelificación. Se removió el cubreobjetos y se le adicionó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión. Una vez gelificada se removió el cubreobjetos y se prosiguió con la lisis alcalina.

Bajo condiciones con luz amarilla, después de una hora de incubación a  $4^\circ\text{C}$  en una solución de lisis alcalina (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10 y 10% de DMSO fresco y 1% Tritón x-100, Sigma), las laminillas fueron puestas en una cámara de electroforesis horizontal, con una solución amortiguadora alcalina (300 mM NaOH y 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 13) permitiendo que las hebras del DNA se pudieran desenrollar durante 20 min. Posteriormente se llevó a cabo la



electroforesis durante 10 min a 25 V y 300 mA. Al finalizar, las laminillas fueron lavadas en una solución amortiguadora de neutralización (0.4 M Tris pH7.5, Sigma) durante 15 min y deshidratadas con etanol (100%) y secadas al aire. A cada laminilla se le adicionaron 20  $\mu$ l de Br-Et (75  $\mu$ g/ml, Sigma) y se les cubrió con un cubreobjetos. Se observaron células individuales a un aumento de 20X con un ocular graduado en un microscopio de fluorescencia Olympus BMX-60, con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm. Se midió la migración del DNA como longitud de las colas de los cometas, es decir donde termina el último punto fluorescente de la cabeza hasta el último punto fluorescente de la cola. Se evaluaron 50 células por individuo o condición.

### ***Estudios in vitro.***

Linfocitos humanos.

#### *Determinación del Índice Mitótico (IM) y el Índice de Replicación (IR).*

Se realizaron cultivos de sangre entera a 37°C en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 2mM de L-glutamina (Sigma), 10mM de aminoácidos no esenciales (Sigma). Al inicio de los cultivos se adicionaron 32  $\mu$ M de 5-bromodeoxiuridina (Sigma) y 0.2 ml de PHA (Gibco). Las células fueron tratadas al inicio del cultivo con concentraciones de 100 y 200  $\mu$ M de MTZ y cosechadas después de 72 h. Dos horas antes de la cosecha se agregaron a los cultivos 2  $\mu$ g de colcemid (Gibco) (Elizondo et al., 1994, 1996).

Las células fueron goteadas sobre portaobjetos y secadas rápidamente con fuego. Las laminillas fueron teñidas en una solución de Hoeschst 33258 (0.5  $\mu$ g/ml) durante 30 min, para luego exponerlas a luz negra (1.5 a 2 h). Las laminillas se tiñeron con 2% de Giemsa (Merck) en una solución amortiguadora de fosfatos pH6.8 durante 5 min (Perry y Wolf, 1974). El IM fue evaluado como el número de metafases en 2000 células. La cinética de proliferación celular fue evaluada en las primeras 100 metafases, determinando la proporción de primeras (M1), segundas

(M<sub>2</sub>) y terceras (M<sub>3</sub>) divisiones mitóticas. El IR fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:  $IR = [M_1(1) + M_2(2) + M_3(3)] / 100$

Linfocitos humanos y líneas celulares.

#### *Cultivos de líneas celulares.*

Las características de las líneas celulares utilizadas en este estudio están descritas en la tabla 2. Las líneas celulares de origen epitelial, HeLa (ATCC), C33-A (donadas por el Dr. García Carrancá, IBB), RKO y RKO-E6 (donadas por los Drs. K. Voudsen y A. Dipple, NIEH) fueron cultivadas en medio DMEM alto en glucosa (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone) y 1% de penicilina-estreptomicina-fungizona (Gibco). Las células Jurkat (ATCC), ATM+/, ATM +/-, ATM -/- (donadas por el Dr. R. Gatti, UCLA), todas ellas de origen linfoide, fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone), 10 mM aminoácidos no esenciales (Sigma), 2 mM L-glutamina (Sigma) y 1% de penicilina-estreptomicina-fungizona (Gibco). Todos los cultivos fueron incubados a 37° C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar el 90% de confluencia en el caso de las líneas celulares epiteliales, o en la fase exponencial de su crecimiento en las líneas de origen linfoide.

#### *Tratamiento de los cultivos celulares con metronidazol y sus metabolitos hidroxilado y acetilado.*

Se prepararon soluciones acuosas estériles a una concentración 10 mM de metronidazol (MTZ, Sigma), de metabolito hidroxilado (MH) 1-(hidroxietil)-2-hidroxi-metil-5-nitroimidazol) y de metabolito acetilado (MA) 2-metil-5-nitroimidazol, y por diluciones se obtuvieron las concentraciones finales deseadas. Los metabolitos fueron sintetizados y donados por los laboratorios Rhone Poulenc en París, Francia.

Para los cultivos de líneas celulares, se sembraron 1.5 X10<sup>6</sup> células en un volumen final de 5 ml, mientras que para los linfocitos humanos, los cultivos se hicieron con 1x10<sup>6</sup> células /ml como se ha mencionado anteriormente. Los cultivos

se incubaron a las condiciones ya descritas durante 24 h, para posteriormente dar los tratamientos por 24 h más a diferentes concentraciones de MTZ y sus metabolitos (25, 50, 100 y 200  $\mu$ M). Como control positivo se usó actinomicina-D (AMD, Sigma) a una concentración de 3 ng/ml.

#### *Inmunodetección de las proteínas P53, p21 Waf-1 y $\beta$ -actina por Western blot.*

Las células fueron cosechadas por centrifugación y preparadas para su lisis como lo describe Salazar y colaboradores (1997). Las células fueron lisadas en hielo en una solución salina amortiguadora de fosfatos que contenía Nonidet-40 (1%, Biorad), deoxicolato de sodio (0.5%, Sigma), SDS (0.1%, Biorad), PMSF (phenyl methylsulfonyl fluoride) (3 mM, Sigma), azida de sodio (0.5 M, Sigma), aprotinina (20  $\mu$ g/ml, Sigma) y ortovanadato de sodio (100 mM, Sigma). La concentración total de proteína de los extractos celulares se determinó por el ensayo de Bradford.

Para linfocitos humanos se usaron 80  $\mu$ g del lisado total mientras que para líneas celulares la concentración utilizada fue de 50  $\mu$ g. Los lisados proteícos fueron calentados durante 5 min a 90°C en una solución amortiguadora de muestra para corrimiento (2% SDS, 80 mM Tris pH 6.8, 10 % glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol). Las proteínas fueron separadas en geles al 4-12% de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) a 100 V a 4°C y posteriormente transferidas (Trans-Blot Semi-Dry, Biorad) a una membrana de nitrocelulosa (Amersham). La membrana fue bloqueada con leche en polvo baja en grasas (5%) disuelta en TBS a pH 7.6 durante dos horas a temperatura ambiente. Los niveles de las proteínas P53, p21 Waf-1 y  $\beta$ -actina fueron detectados usando los anticuerpos monoclonales anti-p53 Do-1 [1  $\mu$ g/ml] (Santa Cruz Biotechnology), p21 [1  $\mu$ g/ml] (SX118, Pharmigen) y anti-actina I-19 (1  $\mu$ g/ml) (Santa Cruz Biotechnology) respectivamente. Las bandas inmunorreactivas fueron visualizadas en placas de autoradiografía utilizando el sistema de peroxidasa-ECL-quimioluminiscencia (Amersham). La intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría óptica usando el programa Quantity One (BioRad).

### *Evaluación de la proliferación celular e inducción de MN (MN) en líneas celulares.*

Con el fin de evaluar en líneas celulares los efectos del MTZ y sus metabolitos en la proliferación celular y la inducción de daño genotóxico, determinado mediante la frecuencia de células con MN, se usó la técnica de bloqueo de la citocinesis inducida por la adición de citocalasina B (Cyt-B) descrita por Fenech y Morley (1985) con algunas modificaciones. Brevemente, se sembraron  $1 \times 10^6$  células en 3 ml de medio y se incubaron durante 24 h en las condiciones ya descritas, después de las cuales se trataron 24 h adicionales con MTZ, MH y MA a las concentraciones ya señaladas. Dieciocho horas antes de la cosecha,  $3 \mu\text{g/ml}$  de Cyt-B fueron agregados a los cultivos. Los cultivos fueron cosechados por centrifugación a 1200 rpm, 10 min, se desechó el sobrenadante y el botón celular fue fijado en una solución de metanol y ácido acético (3:1). Se prosiguió con una fase adicional de centrifugación en las mismas condiciones para obtener un botón celular limpio. Las células se resuspendieron en 0.3 ml de la solución fijadora, posteriormente, se gotearon cuidadosamente en laminillas frías bañadas en agua y se dejaron secar al aire. Las laminillas fueron teñidas con colorante de Wright y se evaluaron al microscopio. Para evaluar la proliferación celular, se analizó el número de células mono-, bi- y polinucleadas en 200 células. En el caso de la determinación de células con MN, un total de 1000 células binucleadas con el citoplasma preservado y bien definido fueron analizadas de acuerdo a los criterios recomendados (Kirsch-Volders, et. al., 2000).

### *Transfección de p53.*

La transfección de las versiones normal ( $p53^{\text{wt}}$ ) y mutada ( $p53^{273}$ ) del gen p53 fue realizada por electroporación (Menéndez, 1997; Salazar et.al., 1997), para lo cual se usó una cámara Gene Pulser (Biorad). Linfocitos humanos y células Jurkat en crecimiento exponencial fueron centrifugados a 1200 rpm durante 10 min. El botón celular fue resuspendido y lavado en PBS 1X libre de iones de calcio y magnesio a  $4^\circ \text{C}$ , posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm, 5 min. Las células fueron llevadas a una concentración final de  $1.5 \times 10^7$  células /ml e incubadas en hielo durante 10 min, antes de que se les añadiera  $10 \mu\text{g}$  de DNA a una

concentración de  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  concerniente a las versiones de p53, previamente purificadas (QIAGEN) a partir de los plásmidos pcDNA-p53 (wt) y pcDNA-273 (mutado), donados por el Dr. C. Millar (UCLA). Ambos plásmidos fueron linearizados con la enzima de restricción Nhe-I para facilitar su incorporación al DNA genómico de las células.

Los linfocitos humanos y las células Jurkat se electroporaron con la versión normal y la mutada de p53. Alícuotas de  $800\ \mu\text{l}$  fueron transferidas a una cámara de electroporación. Se aplicó un sólo pulso de  $1250\ \text{V}$  ( $25\ \mu\text{Fd}$ ) para los linfocitos humanos y de  $600\ \text{V}$  ( $25\ \mu\text{Fd}$ ) para las células Jurkat. Aplicado el pulso, las células se incubaron  $10\ \text{min}$  en hielo para acelerar la recuperación de las membranas celulares. Finalmente las células fueron sembradas a las condiciones ya descritas durante  $24\ \text{h}$  para su recuperación antes de que se usaran para realizar experimentos.

*Determinación de la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada, [ $^3\text{H}$ ]-timidina.*

Para determinar la respuesta proliferativa al MTZ en las células electroporadas con las versiones normal y mutada del gen p53,  $2 \times 10^5$  células por pozo fueron incubadas (por duplicado) en cajas de cultivo de 96 pozos en un volumen final de  $200\ \mu\text{l}$  de medio de cultivo durante  $48\ \text{h}$  totales y tratadas durante las últimas  $24\ \text{h}$  con MTZ a las concentraciones mencionadas. En el caso de los linfocitos humanos estos fueron estimulados con PHA. Los cultivos se mantuvieron en una cámara húmeda a  $37^\circ\ \text{C}$  y  $5\%$  de  $\text{CO}_2$ . Durante las últimas  $18\ \text{h}$  se les aplicó a las células un pulso con  $1\ \mu\text{Ci}$  de timidina tritiada ( $6.7\ \text{Ci}/\text{mmol}$ , Du Pont). Las células fueron cosechadas en filtros de fibra de vidrio con un cosechador automático (Betaplate). La incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina fue determinada en lector de radiación beta (Betaplate). Los valores en cuentas por minuto (cpm) obtenidos en los cultivos no tratados se consideraron como el  $100\%$  de proliferación.

**Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en el estudio.**

Línea celular	Tipo celular	Estado del gen p53	Función de la proteína P53	Referencia
HeLa*	Carcinoma epidermoide (cérvix)	WT	+	Kessis et al., 1993; Scheffner et al., 1991
C33-A	Carcinoma indiferenciado (cérvix)	Mutado 273	-	Kessis et al., 1993; Scheffner et al., 1991
RKO	Carcinoma (colon)	WT	+	Kessis et al., 1993
RKO-E6 <sup>Δ</sup>	Carcinoma (colon)	WT	-	Kessis et al., 1993, De Frank et al., 1996
JURKAT	Leucemia aguda células T	Heterocigoto 196,256,259,260	-	Cheng et al., 1990; Hassapoglidou et al, 1993
ATM +/+	Linfocitos transformados EBV	WT	+	Khanna et al., 1998.
ATM +/-	Linfocitos transformados EBV	WT	+	Khanna et al., 1998.
ATM -/-	Linfocitos transformados EBV	WT	+	Khanna et al., 1998.

\* Infecectada con HPV-18.

& Transfectada con el gene E6 de HPV-16

## VI. RESULTADOS.

### Estudio *ex vivo* en linfocitos de personas tratadas con MTZ.

La capacidad del MTZ para inducir daño genotóxico en células humanas es un tema controversial (ver anexos 1 y 2). En un estudio realizado en nuestro grupo, observamos que el tratamiento *in vivo* con MTZ incrementó el número de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos al finalizar el tratamiento. En linfocitos criopreservados del estudio mencionado se evaluó la generación de rompimientos de cadena sencilla en el DNA mediante el ensayo de electroforesis unicelular o prueba del cometa, que es una técnica muy sensible que permite la rápida evaluación de rompimientos en el DNA para detectar daño al DNA por actividad clastogénica (ver anexo 3).

Antes de realizar el ensayo cometa se descartó la posibilidad de que tanto el proceso de congelación como descongelación de las células tuvieran un efecto citotóxico en las muestras y que representara un factor contundente en la evaluación del daño. La viabilidad celular evaluada con el ensayo de fluorocromos fue en todas las muestras superior del 97% (Tabla 3).

En la tabla 4 se muestran los valores promedio de la magnitud de daño al DNA, antes, 1 y 15 días después de finalizado el tratamiento. El análisis de los datos como grupo un día después del tratamiento con MTZ mostró un incremento significativo en la inducción de rompimientos en el DNA, no así 15 días después, donde los valores tendieron a regresar a los valores basales. También fue evidente la existencia de diferencias en la respuesta de los donadores estudiados como se observa en la figura 7. Un día después de acabado el tratamiento, en 9 de las 10 muestras, se observó que el MTZ tuvo un efecto clastogénico estadísticamente significativo (Tabla 4). En las muestras tomadas 15 días después de finalizado el

tratamiento se observó que el daño al DNA regresó a los niveles encontrados antes del tratamiento en la mayoría de los individuos, excepto en dos sujetos en los cuales se incrementó en la magnitud del daño.

Se determinó si la magnitud del daño DNA se relacionaba con la concentración de MTZ en el plasma, la cual había sido determinada previamente en un estudio realizado por Elizondo y cols (1994). Como se observa en la figura 8 se encontró una correlación inversa entre estos parámetros, es decir los individuos que presentaron concentraciones bajas del medicamento en el plasma tuvieron mayores niveles de daño en el DNA ( $r=-0.6$   $P<0.03$ ). Si se considera que los metabolitos producidos por la oxidación del MTZ en seres humanos, en particular el metabolito hidroxilado, dañan el material genético, una posible interpretación de estos resultados es que el daño al DNA puede producirse por los metabolitos del MTZ (ver anexo 3)

El siguiente objetivo fue determinar si el daño inducido por el MTZ era suficiente para activar la proteína P53. Se evaluaron los niveles de la proteína P53 en linfocitos de individuos antes y 1 día después de haber finalizado el tratamiento con MTZ, aunque sólo contamos con suficiente muestra para realizar el estudio con 7 individuos. En esta parte del estudio, se incluyeron muestras frescas y congeladas de linfocitos de sangre periférica de un individuo sano que no recibió el tratamiento con MTZ, con el fin de descartar un efecto del proceso de congelación y descongelación de las células en los niveles de P53. En condiciones normales, sin daño y/o estrés, los niveles celulares de la proteína P53 son casi imperceptibles (Kubbatat y Voudsen, 1998; Prives y Hall, 1999; Appella y Anderson, 2000). La detección de P53 se llevó a cabo mediante la inmunodetección con el anticuerpo monoclonal DO-1 que reconoce tanto la versión normal como mutada de esta proteína. No se detectó la proteína P53 en los linfocitos de 6 donadores antes de la administración del MTZ. Únicamente en uno de los donadores (D3) se detectó la presencia de P53 aunque en niveles muy bajos (Figura 9, panel A). La inmunodetección de la proteína  $\beta$ -actina se usó como control de cargado de las muestras en los geles. Por el contrario, como se observa en el panel B de la figura 9,



se encontró que 1 día después de haber concluido el tratamiento con el MTZ se incrementaron los niveles de la proteína P53 en 6 de los 7 individuos estudiados. El incremento en P53 fue de diferente magnitud entre los individuos. Sólo en el donador 5 no se detectó inducción de P53 tanto antes como después del tratamiento. En la figura 10 se muestra el análisis densitométrico de la inducción de P53 antes y 1 día después de acabado el tratamiento con MTZ. Como se esperaba, en los linfocitos frescos y congelados provenientes del individuo que no recibió MTZ, no se detectó la proteína P53 (Figura 9). La activación y el incremento observados en la proteína P53 están relacionados con la inducción de los rompimientos de cadena sencilla en el DNA inducidos por el tratamiento con MTZ ( $r=0.76$   $p=0.047$ ; figura 11). Es decir, que los individuos en los que se detectó un mayor número de rompimientos de DNA son los que presentan un mayor incremento en los niveles de P53.

Los estudios antes mencionados se realizaron en linfocitos en estado de quiescencia o G<sub>0</sub>, en el que se encuentran entre el 90 y 95% de los linfocitos circulantes en un individuo sano (Alberts et. al, 1989). Se tiene el concepto que una célula en G<sub>0</sub> tiene activos únicamente los procesos indispensables para su mantenimiento. Se ha sugerido que cuando se daña el material genético de una célula en G<sub>0</sub>, al momento de recibir señales para proliferar, este daño se amplifica. Por lo que estudiamos la respuesta de P53 en linfocitos de los individuos tratados con MTZ cuando se les indujo a proliferar mediante la estimulación mitogénica con PHA durante 24, 48 y 72 h (Figura 12). Las diferencias individuales en los niveles de P53 observadas en G<sub>0</sub> después de 1 día de finalizado el tratamiento con MTZ se hicieron más evidentes cuando se estimuló la proliferación celular. En comparación con los linfocitos de un donador sano que no estuvo sujeto al tratamiento con MTZ y que no mostró niveles detectables de la proteína P53, en los linfocitos estimulados de los donadores tratados con MTZ se detectaron individuos cuyos niveles de P53 no cambian significativamente con respecto al tiempo, mientras que otros tuvieron un incremento estadísticamente significativo a medida que transcurrió el tiempo de estimulación. Los donadores 4 y 5 mostraron resultados interesantes (Figura 13). El donador 4 presentó la mayor inducción de P53 en G<sub>0</sub>,

mientras que a medida que sus células proliferaban sus niveles de P53 disminuyeron. Por otro lado, el donador 5 no tuvo niveles detectables de la proteína aún después del tratamiento, pero a las 48 h de estimulación mitogénica se incrementó considerablemente P53.

Para evaluar si la inducción de P53 tenía un significado biológico y funcional, se determinó la inducción de la proteína p21 WAF1. Este inhibidor del ciclo celular, es uno de los efectores de mayor importancia dentro de la cascada de activación de P53 por daño, al mediar la detención del ciclo celular. Como se aprecia en las figuras 12 y 13, hubo una relación entre la respuesta de inducción de P53 y la activación de p21 Waf-1 en casi todos los individuos.

### **Estudios *in vitro* en cultivo de linfocitos humanos.**

Con el fin de determinar si los efectos del MTZ observados en el estudio *ex vivo*, así como las diferencias individuales en la respuesta de P53 también eran observadas *in vitro*, se evaluó la inducción de esta proteína en cultivos de linfocitos de diferentes donadores sanos al ser tratados con diferentes dosis de MTZ, las cuales fueron ajustadas de acuerdo a las concentraciones en plasma reportadas en individuos tratados con MTZ (Bahr y Ulmann, 1983; Elizondo et.al. ,1996 y 1996 b). Después de 24 h de tratamiento con MTZ encontramos diferencias en el patrón de inducción de la proteína P53 (Figura 14). De acuerdo a la evaluación del análisis densitométrico, las muestras se pudieron agrupar en tres patrones diferentes: I.- Grupo de no-inducción; II.- Grupo de inducción dosis-respuesta; III.- Grupo de inducción atípica. En 3 de los 13 donadores no se detectó señal para P53 con ninguna de las dosis de MTZ, por lo cual fueron incluidos en el grupo I. Dentro del grupo II se abarcó la respuesta de los linfocitos de 7 donadores, aunque se detectaron diferencias en la magnitud de la inducción de P53 entre los individuos de este grupo. Los tres donadores restantes se incluyeron en el grupo III, caracterizado por la detección de P53 en los cultivos sin tratamiento y una inducción variable. La viabilidad celular en todas las muestras fue superior al 95% después del tratamiento, con lo que se descartó la posibilidad de efectos citotóxicos

del MTZ como los responsables de la activación de P53. Un dato interesante fue que las diferencias en la magnitud de la inducción de P53 también se observaron con el tratamiento con actinomicina-D (AMD) usada en este estudio como control positivo (Figura 14).

Para determinar si la inducción de P53 mostraba relación con la capacidad proliferativa de las células y la generación de daño, en 5 de los donadores se evaluó el efecto del MTZ a las dosis de 100 y 200  $\mu\text{M}$  sobre el IM y el IR como parámetros de la proliferación celular (Elizondo et al., 1994), así como en la inducción de MN en células binucleadas como marcador de daño después de 72 h de cultivo. Como se aprecia en la tabla 5, se encontraron diferentes respuestas entre los donadores en cuanto a la capacidad proliferativa. En los cultivos de 4 donadores (LH7, LH8, LH10 y LH11) se observó un incremento significativo en el IM a la dosis de 200  $\mu\text{M}$  de MTZ con respecto al control sin tratamiento, y de éstos sólo en 2 donadores (LH10 y LH11) el IR también se incrementó. Esto se puede interpretar como que las células de estos dos sujetos proliferaron con el MTZ, mientras que en los cultivos de los donadores LH7 y LH8 fue al contrario. En cuanto a la generación de daño al DNA, sólo en un donador (LH7) el MTZ provocó un aumento significativo en la frecuencia de MN a la dosis de 200  $\mu\text{M}$  (tabla 6).

La comparación entre el IM, el IR, la frecuencia de MN y la respuesta inductiva de la proteína P53 se muestra en la tabla 7. Las respuestas observadas en P53 entre los donadores mostraron relación con diferencias en la capacidad de proliferación; cuando no hubo inducción de P53 las células tuvieron una mayor capacidad de proliferar como ocurrió con las células del donador LH10. Un comportamiento similar se encontró en el donador LH11 aún cuando presentó una ligera inducción de P53 a las dosis de 100 y 200  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, no fueron estadísticamente diferentes al control sin tratamiento. En contraste, en los donadores donde el MTZ produjo un claro incremento en los niveles de P53, las células no proliferaron (LH7 y LH8). Finalmente en el donador LH9, clasificado

dentro del patrón de inducción atípica, el MTZ no indujo cambios significativos en ninguno de los parámetros evaluados.

Se ha propuesto que los productos de la biotransformación del MTZ en seres humanos, las formas hidroxilada y acetilada, pueden generar daño al DNA (Dobiás et al., 1994; Menéndez et al., 2001), por lo que entonces se esperaría que activaran a P53. Con el fin de evaluar si los metabolitos del MTZ pueden inducir a la proteína P53, se usaron los linfocitos de 3 de los 13 donadores incluidos en esta parte del estudio, y se hicieron cultivos los cuales fueron tratados durante 24 h con diferentes dosis de los metabolitos. Al igual que con el MTZ, se usaron concentraciones que han sido reportadas en otros estudios. Aunque ambos metabolitos fueron más citotóxicos que el MTZ, este efecto no fue estadísticamente significativo. La viabilidad celular observada fue superior al 85%. En la figura 15 se muestra el análisis densitométrico de la inducción de P53 después del tratamiento con MH y MA. En los tres donadores ambos metabolitos produjeron el incremento de la proteína P53, en dos de ellos (LH7 y LH12) de manera dosis respuesta aunque con diferente magnitud entre ellos. Aunque en el donador LH13 si se observó inducción, esta fue considerada atípica dado que se detectó P53 en el control sin tratamiento. De manera indirecta, estos datos apoyan la hipótesis de que los metabolitos del MTZ pueden producir daño genotóxico capaz de activar a la proteína P53.

### **Estudios *in vitro* con líneas celulares.**

Las respuestas diferentes observadas en el incremento de los niveles de P53, nos llevaron a considerar que variaciones en la funcionalidad de la proteína pudieran estar involucradas en los efectos observados sobre la proliferación celular y la inducción del daño. Por lo que se decidió utilizar líneas celulares humanas con diferente estado funcional de P53 para evaluar además de la respuesta inductiva de la proteína P53, la relación de ésta con el estado de proliferación y la generación de daño al DNA al ser tratadas con MTZ y sus metabolitos hidroxilado y acetilado (Anexo 5). Después de 24 h de tratamiento no se detectaron efectos citotóxicos

significativos del MTZ y sus metabolitos en ninguna de las líneas celulares utilizadas (Figura 16). Se evaluó la capacidad de división de las células así como también la generación de MN en células binucleadas. Aún cuando el número basal de MN en cada línea celular fue diferente, se encontró que en las células que no presentan funcional la proteína P53 (C33-A, RKO-E6 y Jurkat), tanto el MTZ como el MH incrementaron significativamente el número de MN de manera dosis respuesta (Figura 17). Mientras que el efecto del MA no fue tan evidente, únicamente en las células Jurkat este metabolito produjo un cambio estadísticamente significativo en la inducción de MN (Figura 17). Por el contrario, el MTZ no cambió la frecuencia de MN en las células con P53 funcional, HeLa y RKO, mientras que tanto el MH como el MA aumentaron significativamente el daño al DNA.

En cuanto a la proliferación celular, se tomó el porcentaje de células polinucleadas como parámetro para determinar si las células proliferaron o no. Independientemente del estado funcional de P53, el MTZ incrementó significativamente de manera dosis respuesta la proliferación en todas las líneas celulares evaluadas (Figura 17). Por su parte, los metabolitos del MTZ tienen efectos diferentes sobre la proliferación. El MH sólo incrementó significativamente el porcentaje de células polinucleadas en las líneas celulares con P53 no funcional, mientras que en las células que presentan P53 activa, no indujo cambios significativos. Por su parte el metabolito acetilado no tiene un efecto evidente en este parámetro en ninguna de las líneas evaluadas. Estos resultados indicaban que, la falta de funcionalidad de P53 permitía que las células proliferaran con daño producido por el MTZ y el MH.

Para entender si los efectos sobre la proliferación celular y la inducción de daño en las líneas celulares se relacionaban con la respuesta de la proteína P53, se evaluaron los niveles de P53 después de un tratamiento durante 24 h con MTZ o sus metabolitos. Como se observa en la figura 18, el tratamiento con MTZ no produjo cambios en los niveles basales de P53 en las líneas HeLa y RKO, ambas con la proteína P53 funcional, así como tampoco en las líneas celulares que tienen

alterada la función de esta proteína, RKO-E6 y C33-A. La figura 19 muestra las inmunodetecciones de P53 en los cultivos tratados con los metabolitos del MTZ. En las figuras 20 y 21 se muestra que tanto el MH como el MA produjeron un incremento dosis respuesta estadísticamente significativo en los niveles de P53 en las líneas funcionales para P53. Estos resultados sugieren que la activación de P53 por los metabolitos del MTZ se relaciona con los efectos sobre la proliferación celular y la inducción de daño al DNA por estas sustancias

Se utilizó la dosis de 100  $\mu$ M para determinar la cinética de inducción de P53 generada por los metabolitos en las células RKO (Figura 21). La inducción de la proteína P53 por el tratamiento con MH inició a la hora y alcanzó sus niveles máximos a las 12 h para luego mantenerlos hasta las 24 h. Con el metabolito acetilado, la inducción de P53 comenzó a las 3 h, el nivel máximo también fue a las 12 h para luego mantenerse hasta las 24 h. El tratamiento con MTZ no produjo cambios en los niveles de p53 a los tiempos evaluados.

Los resultados obtenidos sugerían que la funcionalidad de P53 representaba un elemento clave para permitir la proliferación celular después de la generación de daño al DNA por el MTZ. Con el objetivo de confirmar nuestros resultados, y aprovechando que las células Jurkat presentan mutaciones heterócigas dominantes de P53 que resultan en una proteína no funcional, se introdujo por transfección, una versión normal (pcDNA53) o una versión mutada del gen p53 (pcDNA273) la cual no puede unirse al DNA y por lo tanto no detiene el ciclo celular. Después de 24 h de tratamiento con MTZ se evaluó la proliferación celular mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Como se presenta en la figura 22, la introducción de la versión mutada de p53 provocó que las células Jurkat proliferaran más después del tratamiento con MTZ que las células no tranfectadas. Mientras que la sobreexpresión del gen p53 normal resultó en la detención de la proliferación, probablemente por la restauración de la función de P53 en esas células.

Con el fin de corroborar estos resultados se decidió evaluar si estos efectos se podían observar en linfocitos humanos transfectados con estas versiones de p53.

La figura 23 muestra que al igual que lo observado en la línea celular Jurkat, la sobreexpresión de la versión alterada de p53, permitió que los linfocitos proliferaran más que los linfocitos sin transfectar cuando son tratados con MTZ. En contraste, la electroporación de la versión normal del gen hizo que los linfocitos proliferaran más lento.

En base a estos resultados, nos preguntamos si los efectos sobre P53 eran únicamente característicos del MTZ y sus metabolitos, o si otras sustancias estructuralmente relacionadas al MTZ también eran capaces de activar a esta proteína. Se realizaron cultivos con la línea celular RKO los cuales fueron tratados durante 24 h con imidazol y levamizol a las mismas concentraciones que el MTZ y su metabolito hidroxilado. Como se muestra en el análisis densitométrico tanto el imidazol como el levamizol incrementaron P53 de manera dosis respuesta, inclusive con mayor magnitud que el metabolito hidroxilado (Figura 24). Estos resultados indican que la capacidad de inducir a P53 y, posiblemente daño al DNA, está directamente relacionada con la estructura del anillo de imidazol.

La cascada de señalización de daño en la células regulada por P53 implica la participación de diferentes proteínas (Figura 2), incluso se ha descrito que hay diferentes vías por las cuales se lleva a cabo la activación de P53. Una de las más estudiadas es la vía que involucra a la proteína ATM, codificada por el gen ataxia telangiectasia. Al producirse un daño en la célula, como la generación de rompimientos en el DNA inducidos por la exposición a radiación ionizante, ATM fosforila la región amino terminal de la proteína P53, lo que resulta en la activación de P53 para actuar como factor de transcripción y mediar la expresión de genes involucrados en la detención del ciclo celular (Khanna et al., 1998). En el síndrome de inestabilidad cromosómica de ataxia telangiectasia, enfermedad recesiva dominante para el gen ATM, la ausencia de esta proteína impide que P53 sea activada bajo el efecto de diferentes agentes xenobióticos (Khanna et al., 1998; Menéndez et al., 2001 b). Se evaluó entonces si la señal de daño inducida por el tratamiento con MTZ involucra a la proteína ATM para activar a P53. Para llevar a cabo lo anterior se realizaron cultivos con líneas linfoblastoides provenientes de

individuos normales, heterócigos y homócigos para el gen ATM, los cuales fueron tratados durante 24 h con MTZ para analizar la viabilidad celular y la respuesta de P53.

El tratamiento con MTZ no tuvo un efecto citotóxico mayor que en la condición normal tanto en las líneas heterócigas como homócigas para el gen ATM (Figura 25). No obstante de haber diferencias en cuanto a la respuesta inductiva de P53, tanto en las líneas ATM heterócigas como en la mayoría de las heterócigas, el MTZ incrementó los niveles de P53, mientras que en la línea normal, no hubo tal inducción (Figuras 26 y 27). De estos resultados preliminares podemos destacar dos aspectos: 1) Que la proteína ATM no está involucrada en la cascada de señalización de activación de P53 producida por el MTZ, ya que aún en células donde la proteína ATM no es funcional se logró observar la activación de P53; 2) Dada esta activación, se podría suponer que en estas células el MTZ fue capaz de producir daño al DNA, lo cual sugiere que la condición alélica de ATM, además de p53, puede conferir susceptibilidad a los efectos genotóxicos del MTZ.





**Tabla 3. Viabilidad celular en las muestras de los linfocitos antes del tratamiento así como 1 día y 15 días después de finalizado el tratamiento con MTZ.**

Donadores	ANTES		1 DIA DESPUES*		15 DIAS DESPUES*	
	X	±	X	±	X	±
1	99.00	0.577	99.75	0.500	99.50	0.577
2	97.50	2.380	98.75	2.500	98.50	2.380
3	98.50	1.000	98.75	0.957	98.25	0.500
4	97.00	3.000	100.0	0.000	98.50	1.000
5	97.00	0.816	98.25	2.061	97.25	1.892
6	98.25	1.258	99.50	1.000	99.00	1.154
7	96.25	1.258	97.25	2.217	N.D.	
8	99.00	1.414	99.75	0.500	N.D.	
9	98.75	0.957	98.25	1.500	N.D.	
10	97.25	2.217	98.50	1.290	98.00	0.957

X representa el promedio de tres lecturas. ±= desviación estándar

N.D.= No determinada

\* finalizado el tratamiento

**Tabla 4. Cantidad de daño al DNA evaluado como la longitud de la cola del “cometa” en linfocitos de individuos tratados con MTZ.**

Donadores	ANTES		1 DIA DESPUES*			15 DIAS DESPUES*		
	Cola $\mu\text{m}$	+/-	Cola $\mu\text{m}$	+/-	P	Cola $\mu\text{m}$	+/-	P
1	45.10	1.6097	40.70	2.9277	0.2756	47.90	1.2631	0.0741
2	37.20	1.4591	50.60	2.2555	<0.0001	42.40	1.8870	0.0009
3	42.40	1.8321	56.30	2.7980	<0.0001	41.90	1.5634	0.3526
4	40.40	1.8388	50.90	2.7446	<0.0001	34.90	1.8788	0.0094
5	44.10	1.5477	50.30	2.7467	0.0006	43.30	1.3644	0.9338
6	39.60	1.4961	44.70	2.9651	0.0027	35.30	1.9103	0.0710
7	27.50	2.1594	36.80	2.1642	<0.0001	ND		
8	32.20	1.7861	44.70	2.1132	<0.0001	ND		
9	37.70	1.8539	43.30	2.2732	0.0058	ND		
10	29.10	1.8260	44.10	2.1617	<0.0001	46.60	2.0921	<0.0001

Análisis no paramétrico U-Mann-Whitney dos colas

X	+/-	X	+/-	P	X	+/-	P
37.53	6.1185	45.07	6.6715	0.0098	41.18	4.6132	p 0.2831

Análisis paramétrico Wilcoxon dos colas

ND= no determinado    X= promedio     $\pm$ = desviación estándar.

\* finalizado el tratamiento

**Tabla 5. Evaluación del índice mitótico y del índice de replicación en cultivos de linfocitos de sangre periférica tratados con MTZ.**

Donadores	Índice mitótico (IM)					
	Control		100 $\mu$ M MTZ		200 $\mu$ M MTZ	
	<i>X</i>	$\pm$	<i>X</i>	$\pm$	<i>X</i>	$\pm$
LH7	0.026	0.003	0.029	0.003	0.056**	0.002
LH8	0.027	0.004	0.028	0.002	0.033*	0.0005
LH9	0.028	0.003	0.034	0.002	0.033	0.001
LH10	0.028	0.004	0.037	0.002	0.045**	0.003
LH11	0.024	0.001	0.031	0.003	0.045**	0.003

Donadores	Índice de replicación (IR)					
	Control		100 $\mu$ M MTZ		200 $\mu$ M MTZ	
	<i>X</i>	$\pm$	<i>X</i>	$\pm$	<i>X</i>	$\pm$
LH7	2.75	0.03	2.71	0.24	2.84	0.10
LH8	2.54	0.18	2.59	0.19	2.60	0.09
LH9	2.34	0.01	2.43	0.04	2.46	0.05
LH10	2.42	0.08	2.54	0.06	2.73**	0.07
LH11	2.52	0.03	2.59	0.01	2.76**	0.05

X=Promedio de tres experimentos independientes.

$\pm$ = desviación estándar.

ANOVA: \*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

**Tabla 6. Evaluación de la inducción de micronúcleos en cultivos de linfocitos de sangre periférica tratados con MTZ.**

Donadores	Número de micronúcleos en 1000 células binucleadas					
	Control		100 $\mu$ M MTZ		200 $\mu$ M MTZ	
	X	$\pm$	X	$\pm$	X	$\pm$
LH7	4.5	0.5	5	0.7	9*	1.5
LH8	6	0.9	7	1.0	8.5	0.9
LH9	7.5	0.7	8.8	1.8	10.8	2.5
LH10	7	3.6	6.7	2.9	8	3.6
LH11	6.5	1.3	4.3	0.8	5.3	1.5

X=Promedio de tres experimentos independientes.

$\pm$ = desviación estándar.

ANOVA: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

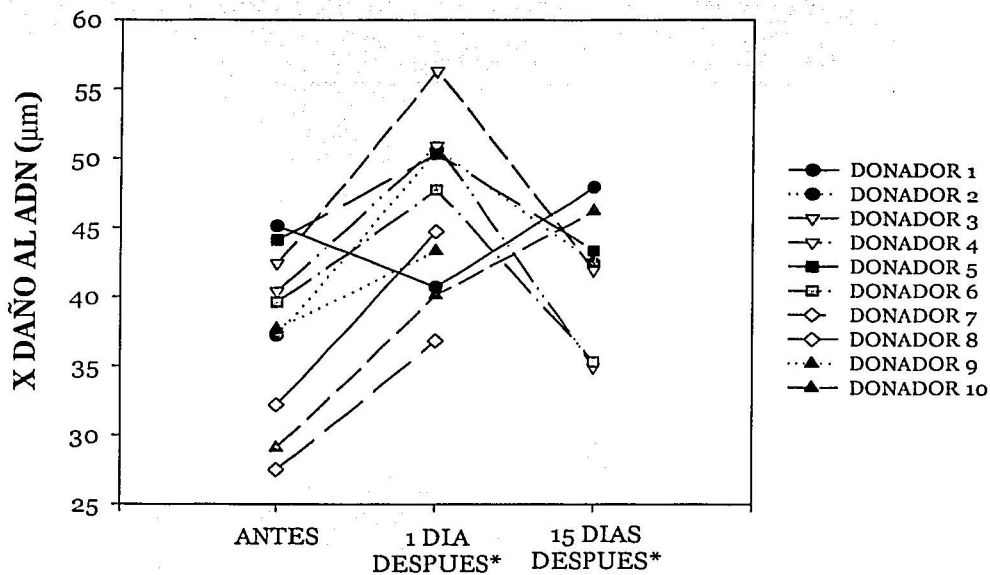
**Tabla 7. Comparación entre la inducción de daño y la capacidad proliferativa con el incremento de los niveles de la proteína P53 en cultivos de linfocitos humanos tratados con MTZ.**

Donador	IM	IR	MN	P53
LH7	↑**	NS	↑*	↑**
LH8	↑*	NS	NS	↑***
LH9	NS	NS	NS	NS
LH10	↑**	↑**	NS	NS
LH11	↑**	↑**	NS	NS

n= 3 experimentos independientes

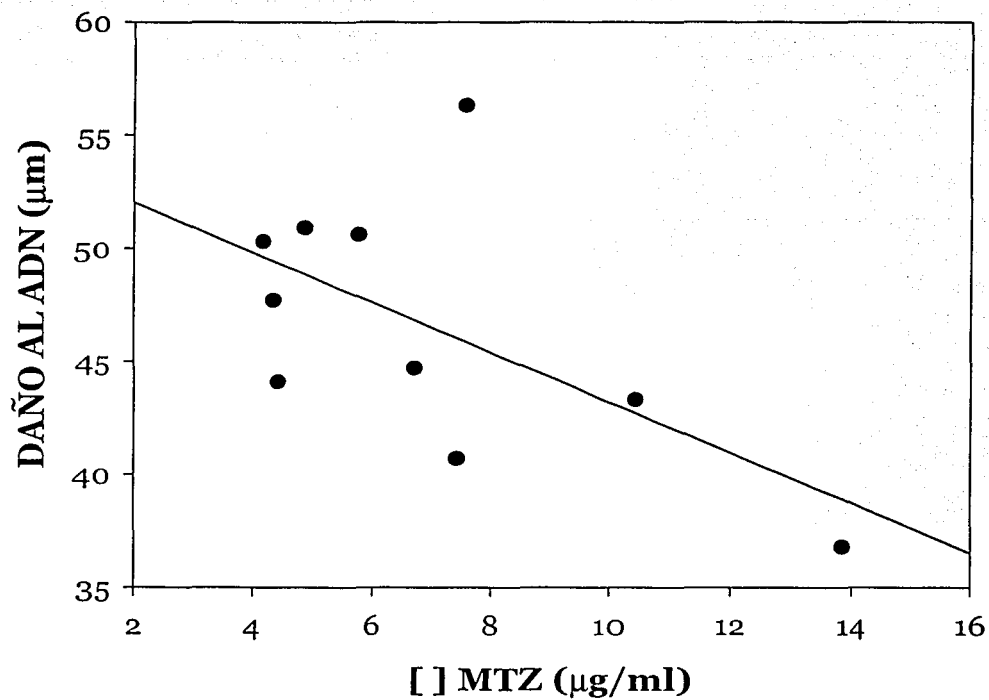
ANOVA: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

NS= no hay diferencias significativas.



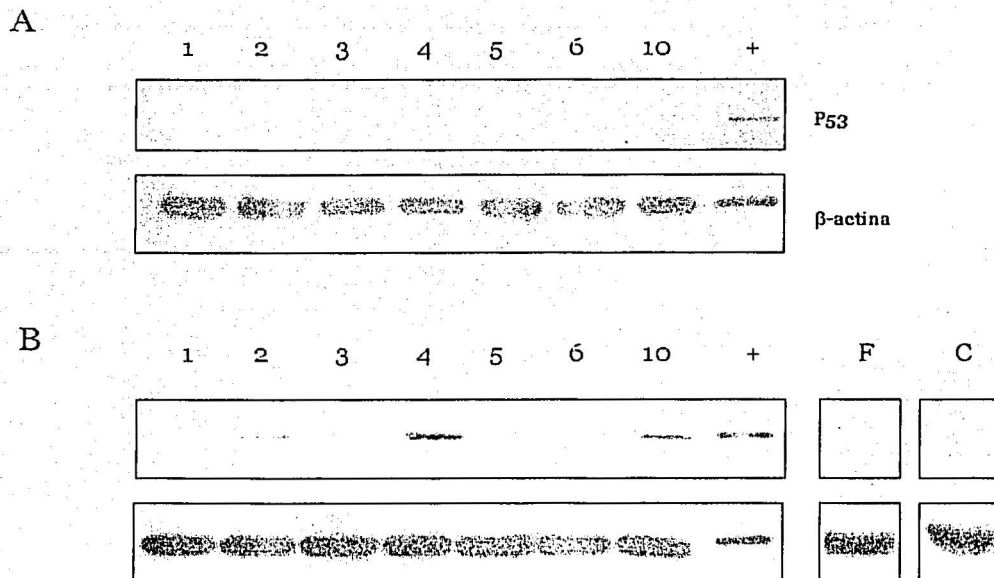
\* finalizado el tratamiento

**Figura 7. Cantidad de daño al DNA. Rompimientos de cadena sencilla, en linfocitos de individuos tratados con MTZ.** La evaluación del daño al DNA se llevó a cabo a través del ensayo cometa a pH13 en células obtenidas antes del tratamiento así como 1 y 15 días después de finalizado el mismo. Los valores que se muestran representan el promedio de 50 lecturas.

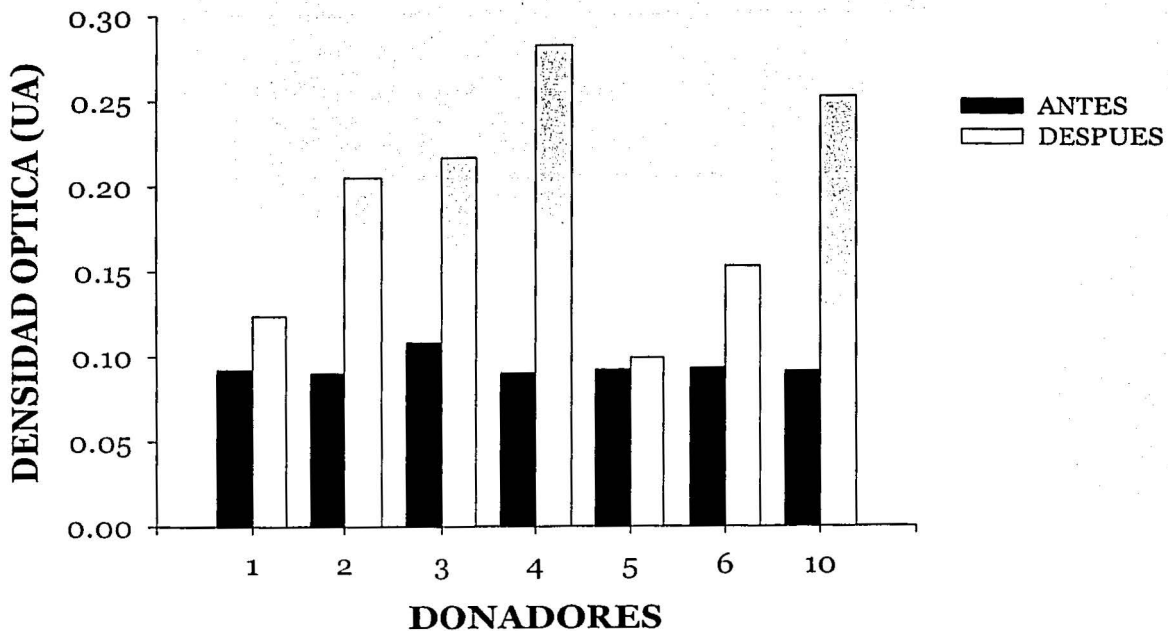


**Figura 8. Correlación entre el daño al DNA en linfocitos y la concentración de MTZ en plasma ( $\mu\text{g/ml}$ ) 1 día después de finalizado el tratamiento con MTZ.**

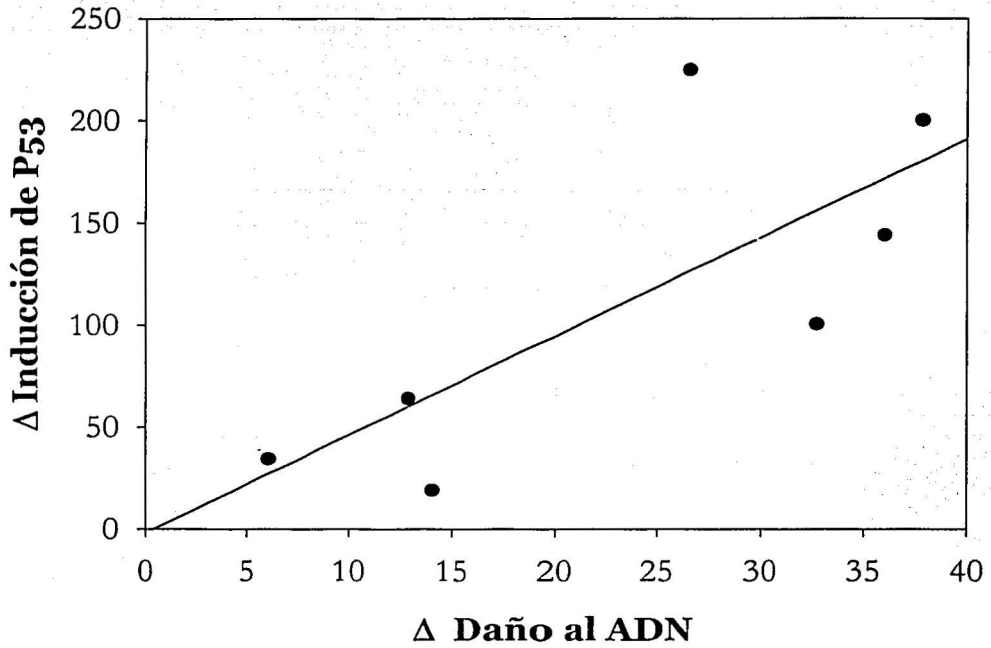




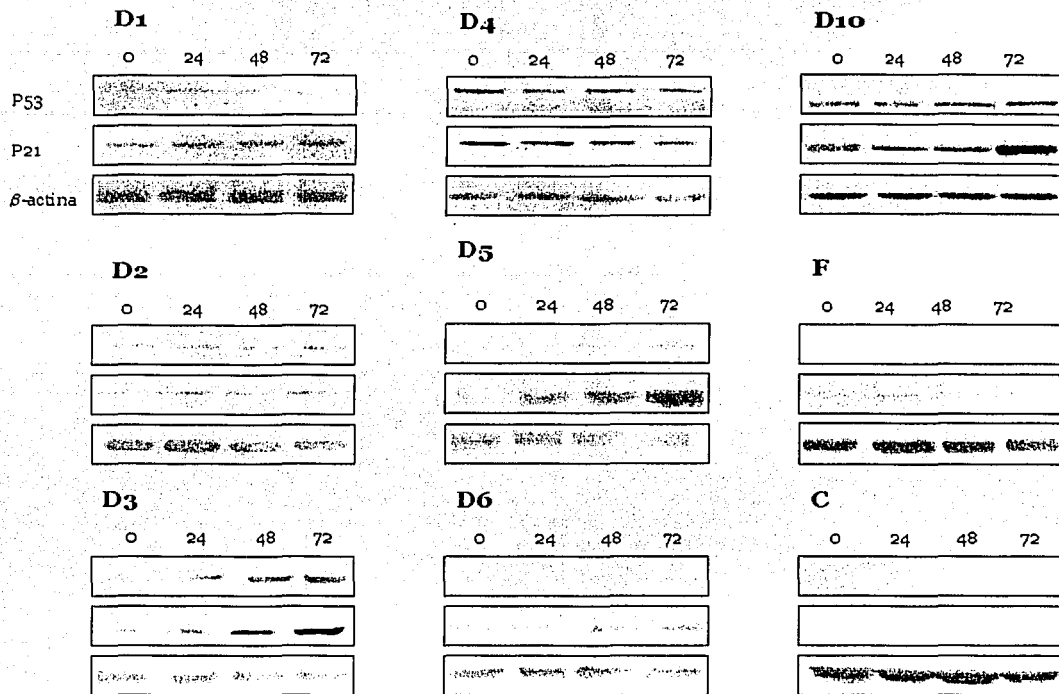
**Figura 9. Inmunodetección de la proteína P53 en linfocitos de individuos tratados con MTZ.** A) Antes del tratamiento con MTZ. B) 1 día después de finalizado el tratamiento. Los números corresponden a los donadores. Como control positivo de detección de P53 (+) fue usado un extracto proteico de la línea celular C33-A, la cual sobre expresa esta proteína. F y C se refieren a los linfocitos frescos y criopreservados de un individuo sano que no recibió el tratamiento con el MTZ. La inmunodetección de  $\beta$ -actina fue el control interno de cargado del gel.



**Figura 10. Análisis densitométrico de los niveles de P53 en linfocitos de individuos tratados con MTZ antes y 1 día después de acabado el tratamiento. Se muestra el promedio de la repetición de dos experimentos.**



**Figura 11. Correlación entre el daño al DNA y la inducción de P53 en linfocitos de individuos tratados con MTZ 1 día después de finalizado el tratamiento.**



**Figura 12. Cinética de inducción de las proteínas P53 y P21-Waf1 en linfocitos de individuos tratados con MTZ 1 día después de finalizado el tratamiento. Los linfocitos fueron estimulados a proliferar con PHA durante 24, 48 y 72 horas.**

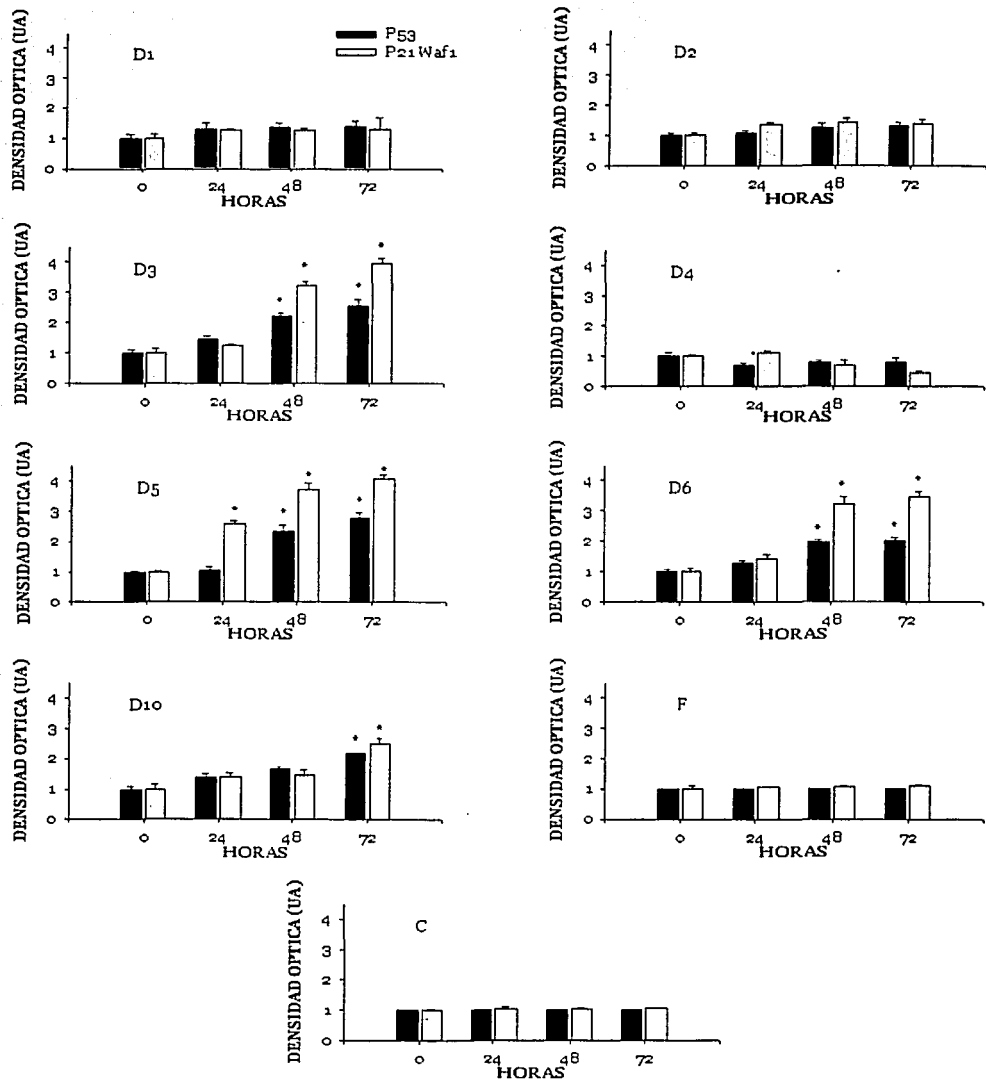
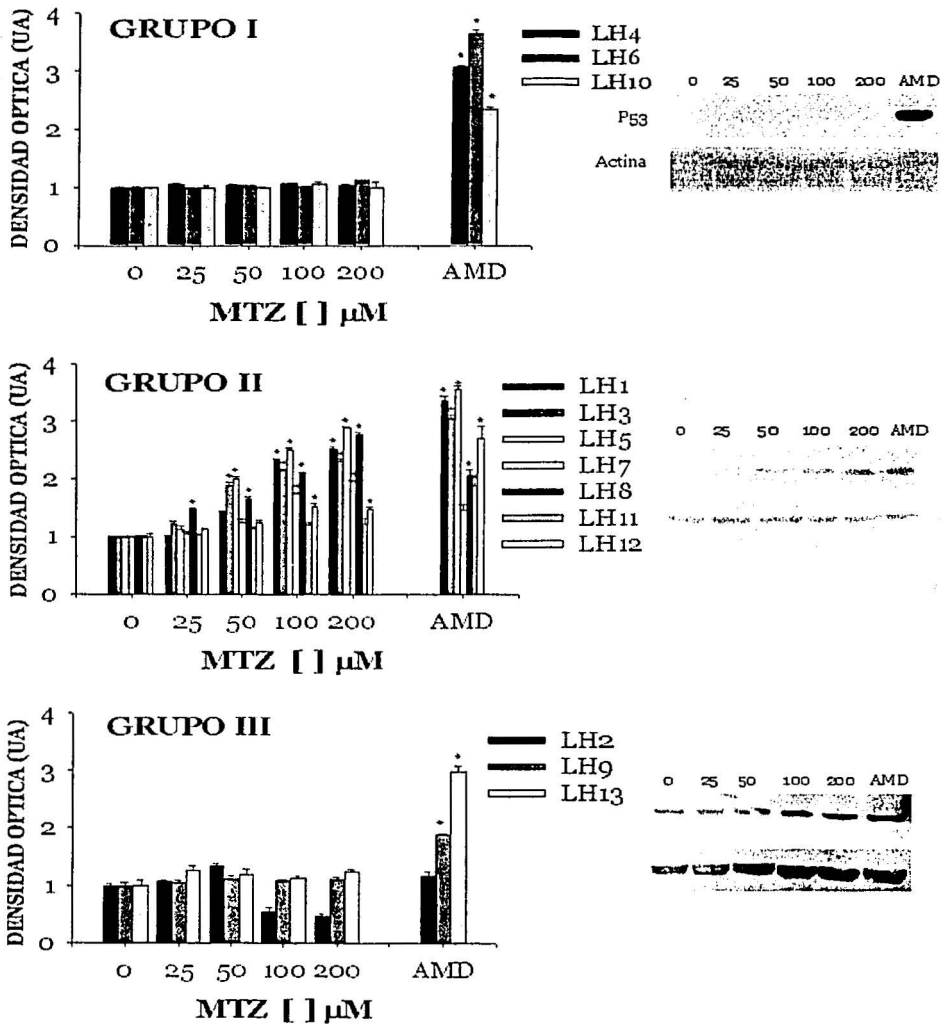
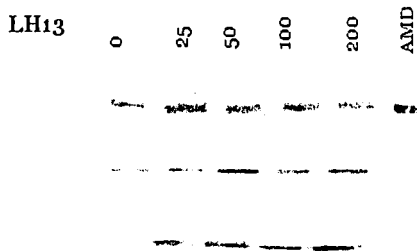
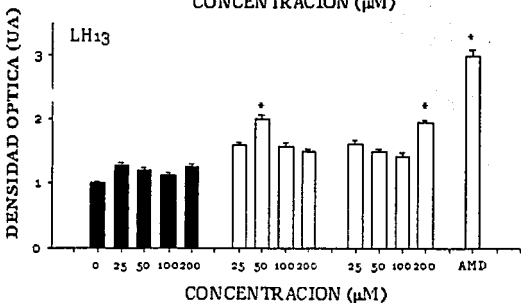
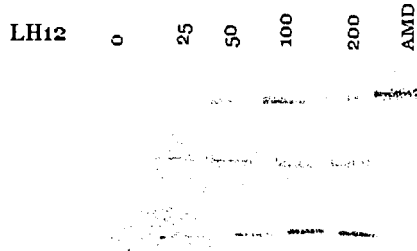
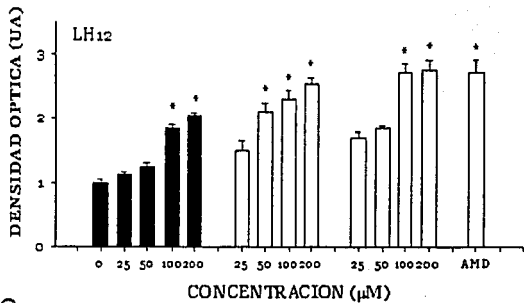
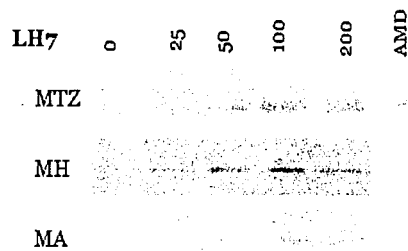
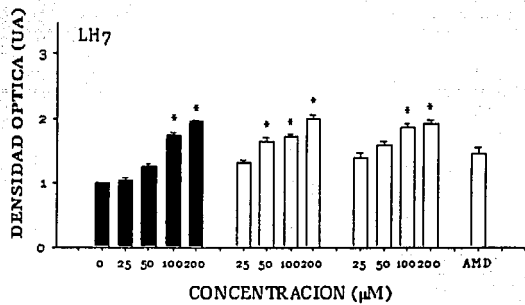


Figura 13. Análisis densitométrico de P53 y P21 Waf-1 en linfocitos de individuos tratados con MTZ 1 día después de finalizado el tratamiento y estimulados a proliferar 24, 48 y 72 horas. Cada barra representa el valor promedio de tres experimentos. \*  $p < 0.05$  ANOVA con respecto al tiempo o.



**Figura 14. Patrón de respuestas de la proteína P53 en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro* con MTZ.** A la izquierda de la figura se muestra el análisis densitométrico de la respuesta de P53 en los linfocitos de 13 individuos estudiados. Los cultivos fueron estimulados con PHA y tratados durante 24 horas con diferentes concentraciones de MTZ (25, 50 100 y 200 μM). A la derecha del panel se muestra las inmunodetecciones más representativas de cada grupo de respuesta. Como control positivo de inducción de P53 se usó actinomicina-D (AMD). n= 3 experimentos independientes \* p<0.05 con respecto al control sin tratamiento (ANOVA).



**Figura 15. Densitometría de la respuesta in vitro de P53 en cultivos de linfocitos humanos después el tratamiento con MTZ y sus metabolitos hidroxilado y acetilado.** Se realizaron cultivos de linfocitos en 3 donadores (LH7, LH12 y LH13) los cuales fueron estimulados a proliferar y tratados durante 24 horas a las concentraciones que se señalan. Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes. \* <math><0.05</math> con respecto al control sin tratamiento (ANOVA). A la derecha del panel se muestran las inmunodetección más representativas de cada donador.

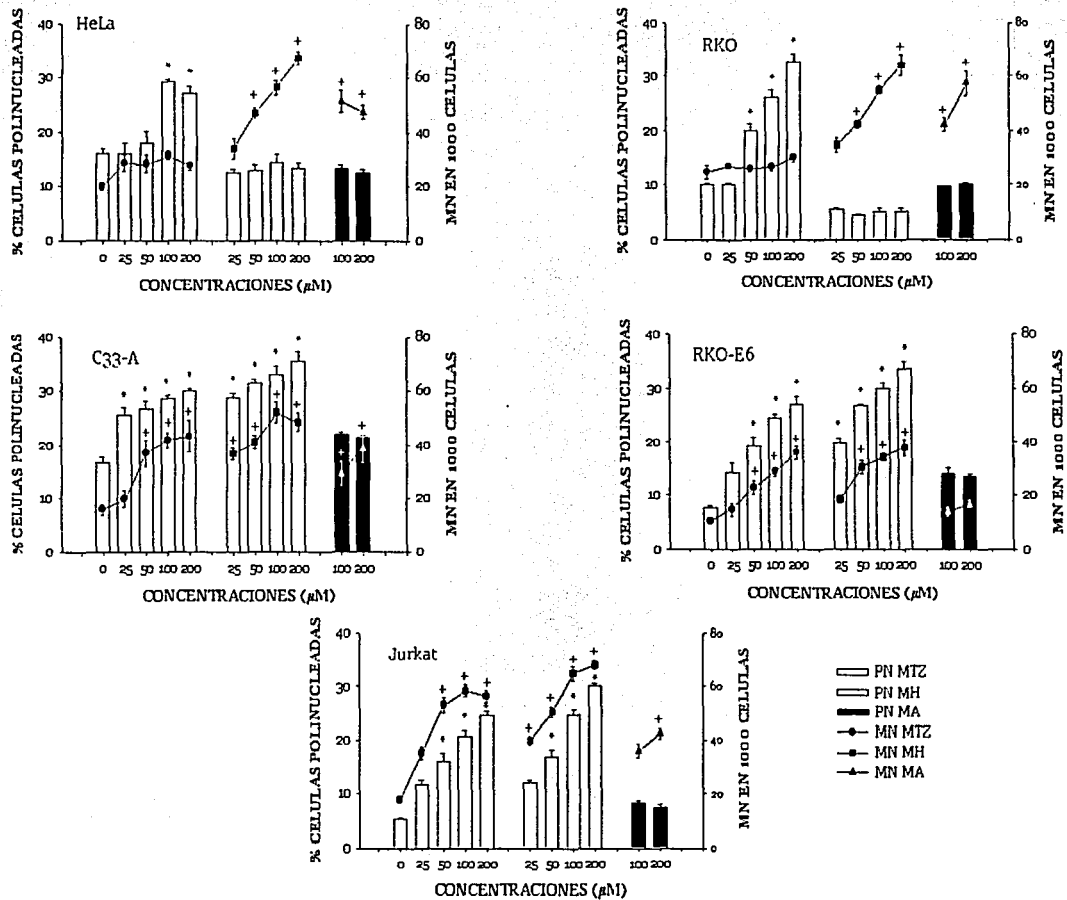
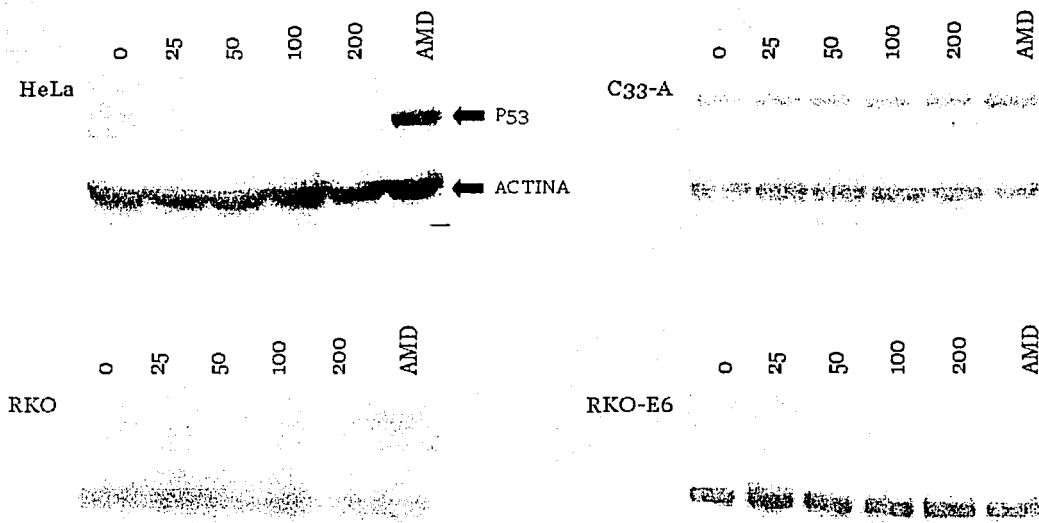
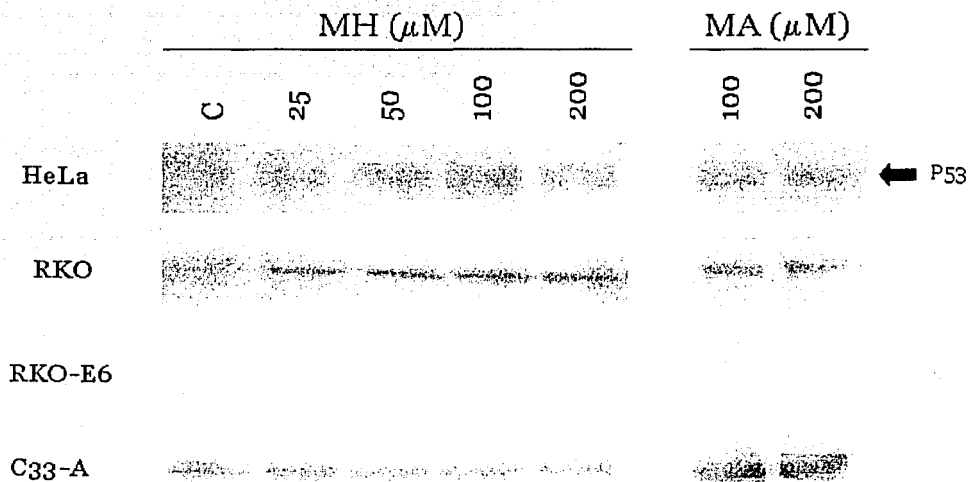


Figura 17. Efectos del MTZ y sus metabolitos sobre la proliferación celular y la inducción de micronúcleos en líneas celulares con diferente estado funcional de la proteína P53. El porcentaje de células polinucleadas, se muestra en forma de barras. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  Chi cuadrada. Las líneas con puntos representan el número de micronúcleos (MN) después de 24 horas de tratamiento. Los MN fueron evaluados en 200 células binucleadas por duplicado en tres experimentos independientes. +  $p < 0.05$  con respecto al control sin tratamiento (ANOVA).

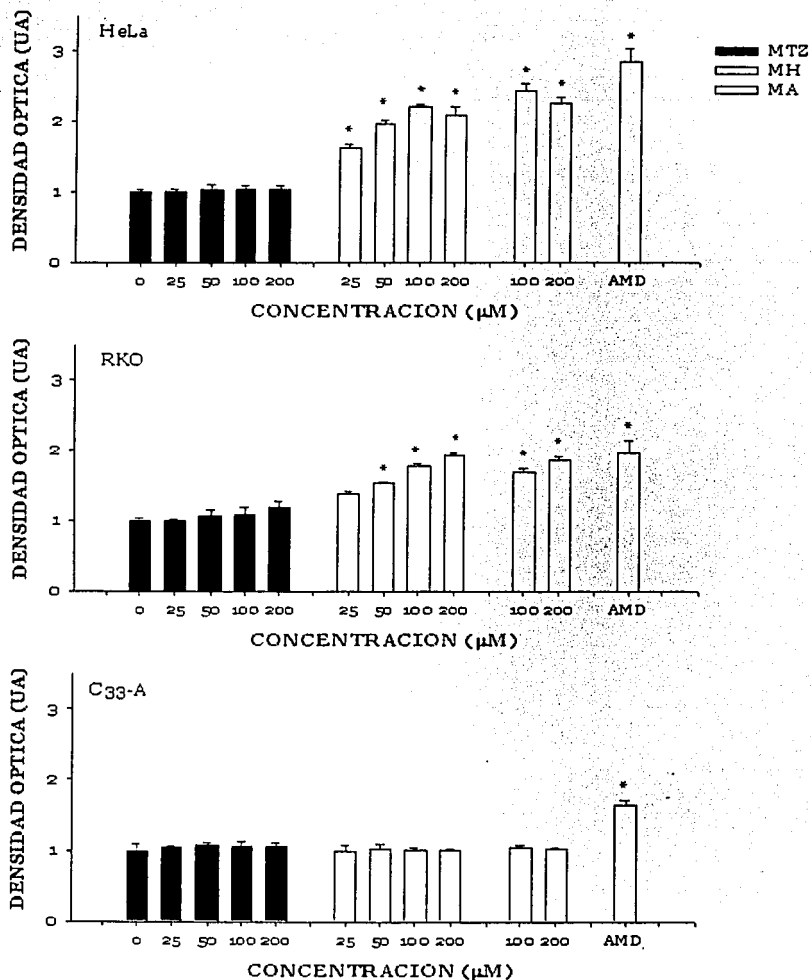




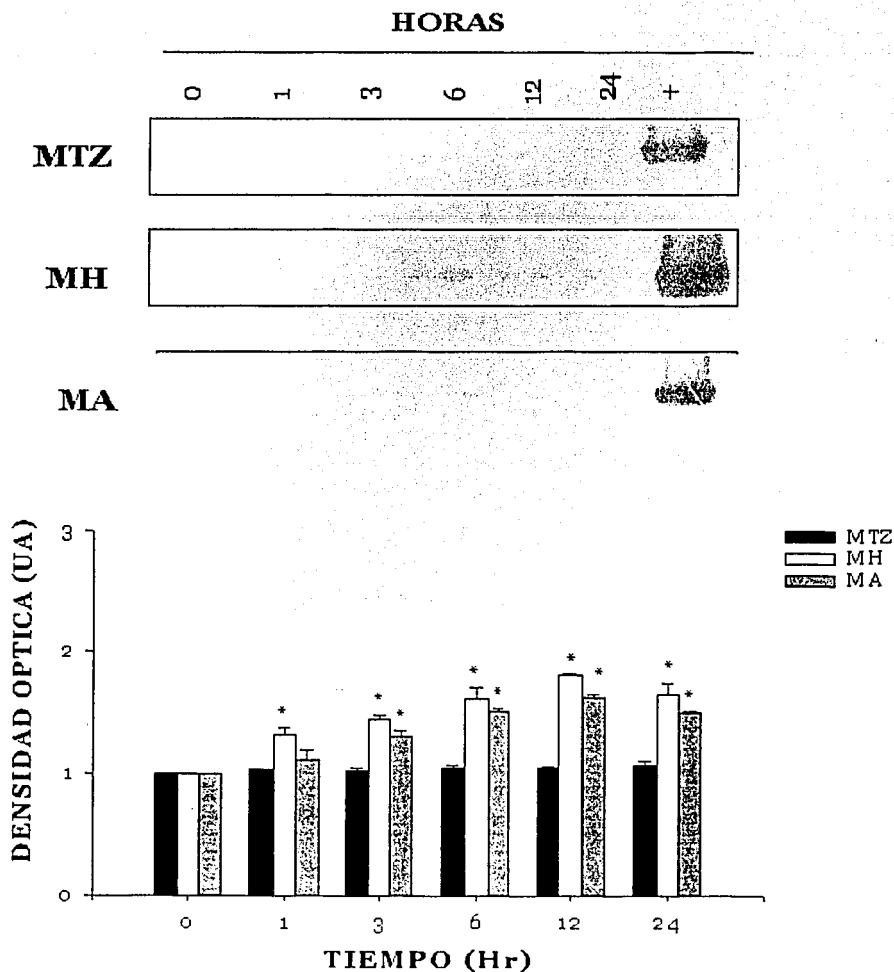
**Figura 18. Inmunodetección de la proteína P53 en líneas celulares después del tratamiento con MTZ.** Los cultivos de las líneas con P53 funcional (HeLa y RKO) y con P53 no funcional (C33-A y RKO-E6) fueron tratados durante 24 horas con diferentes concentraciones de MTZ (0, 25, 50, 100 y 200  $\mu$ M). Como control positivo de inducción se usó actinomycin D (AMD).



**Figura 19. Inmunodetección de la proteína P53 en líneas celulares después del tratamiento con los metabolitos hidroxilado (MH) y acetilado (MA) del MTZ**  
 Los cultivos fueron tratados durante 24 horas a las concentraciones señaladas.



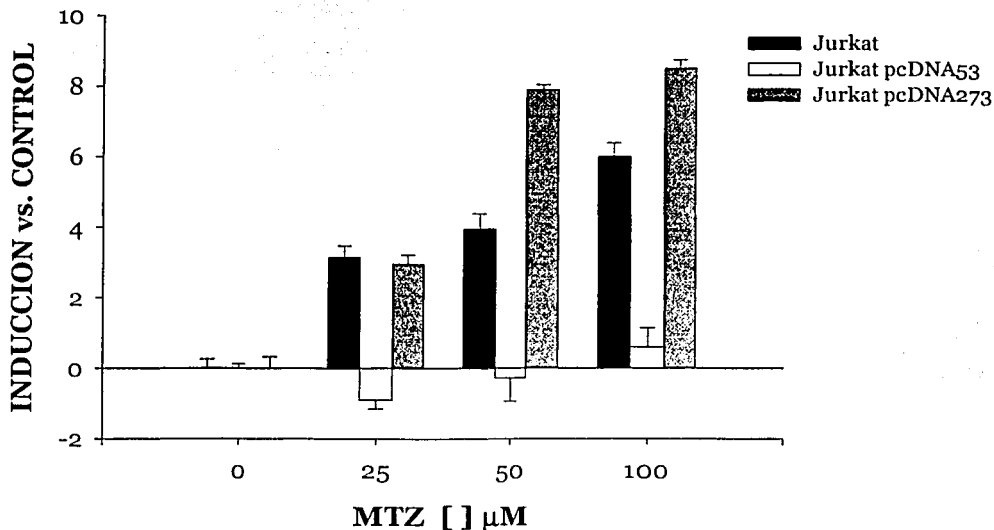
**Figura 20. Densitometría de los niveles de la proteína P53 después del tratamiento con MTZ, MH y MA en las líneas celulares HeLa, RKO y C33-A.** Cada barra representa el valor promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  con respecto al control sin tratamiento (ANOVA).



**Figura 21. Efecto del MTZ y sus metabolitos en la cinética de inducción de P53 en la línea celular RKO.** En el panel de arriba se muestran las inmunodetecciones de P53 después de 1,3, 6, 12 y 24 horas de haber dado el tratamiento con MTZ, MH y MA a la concentración de 100  $\mu$ M. Abajo se muestra la densitometría de la respuesta de inducción de P53. Cada barra representa el valor promedio y su desviación estándar de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  con respecto al tiempo 0 (ANOVA).

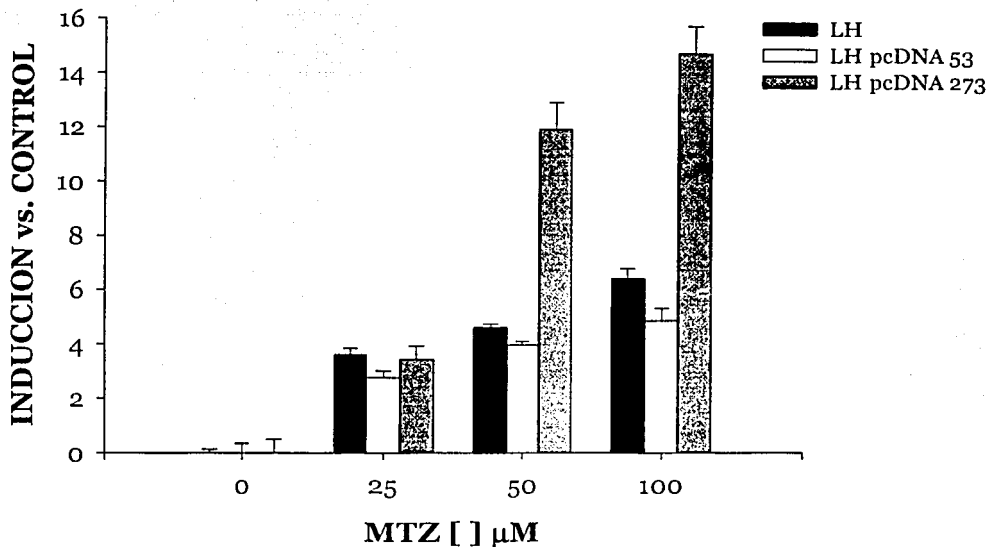
ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

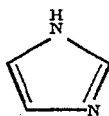
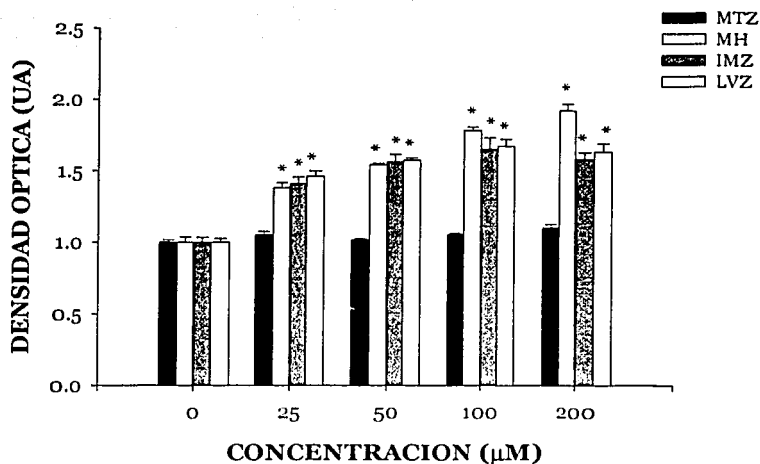


**Figura 22. Evaluación del efecto de la transfección de la versión normal o mutada de p53 en la línea celular Jurkat, sobre el efecto del MTZ en la proliferación celular.** Las células Jurkat fueron electroporadas con los plásmidos pcDNA53 (p53 silvestre) o pcDNA273 (p53 mutado). Se realizaron cultivos que fueron tratados durante 24 horas con las dosis de MTZ que se señalan. Se evaluó la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada. Se muestra la inducción con respecto al control del valor promedio y desviación estándar de dos experimentos independientes.

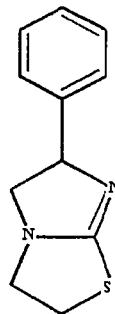
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 23. Evaluación del efecto de la transfección de la versión normal o mutada de p53 en linfocitos humanos, sobre el efecto del MTZ en la proliferación celular.** Las linfocitos fueron electroporadas con los plásmidos pcDNA53 (p53 silvestre) o pcDNA273 (p53 mutado). Se realizaron cultivos que fueron tratados durante 24 horas con las dosis de MTZ que se señalan. Se evaluó la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada. Se muestra la inducción con respecto al control del valor promedio y desviación estándar de dos experimentos independientes.

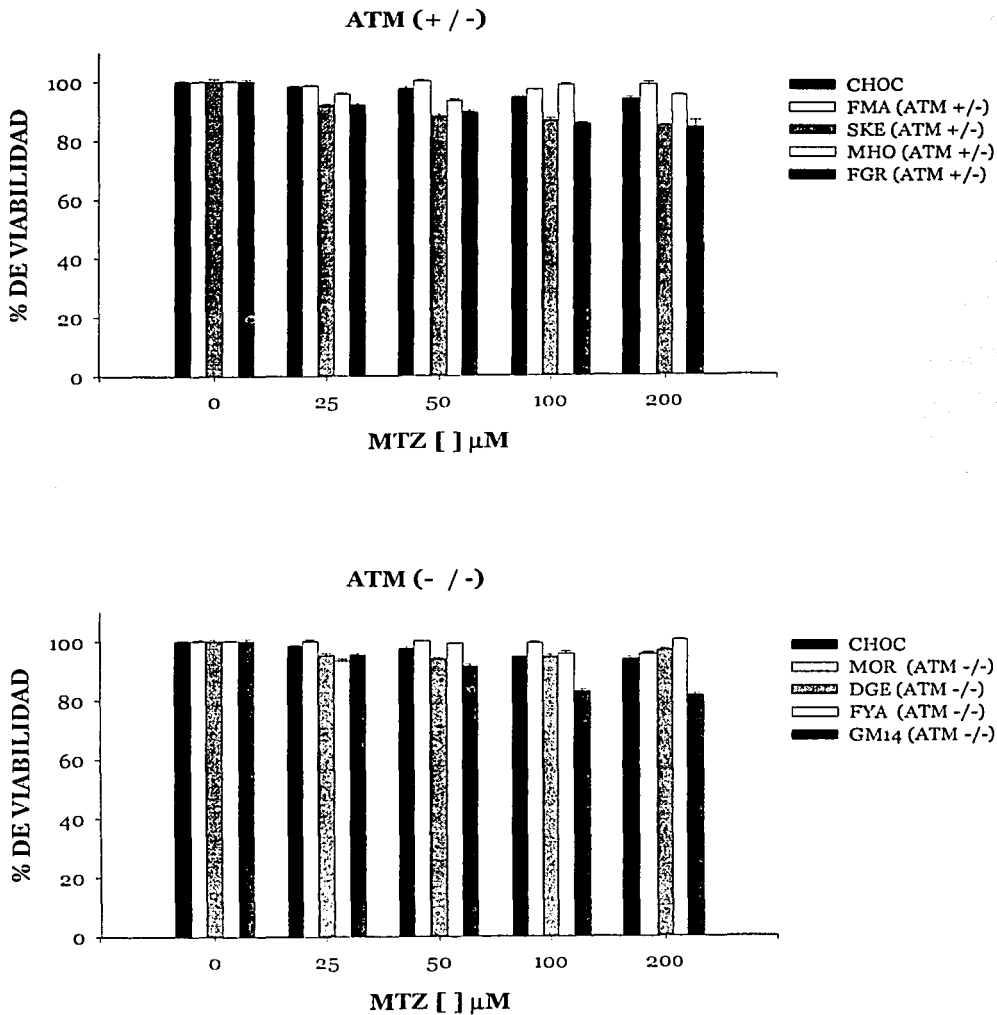


IMIDAZOL



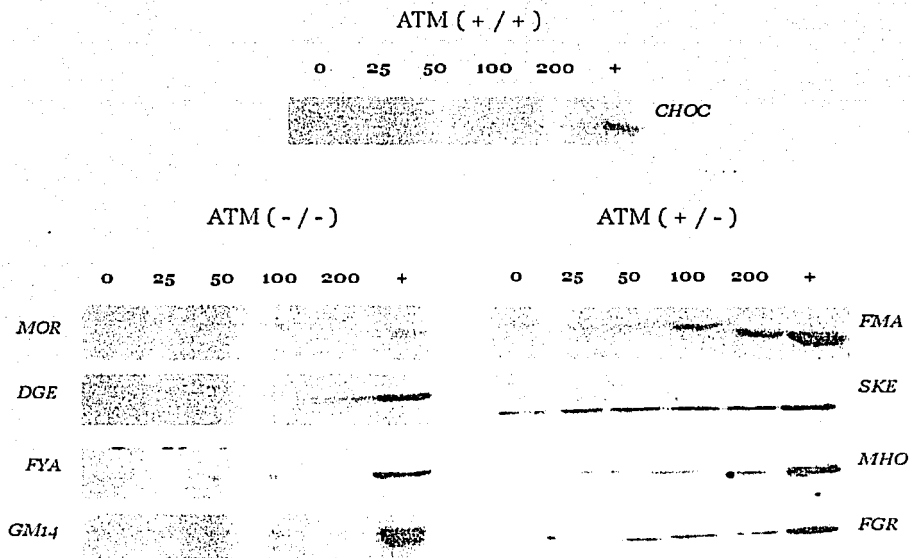
LEVAMIZOL

**Figura 24. Efecto inductor de la proteína P53 en células RKO del MTZ, MH imidazol (IMZ) y levamisol (LVZ).** Se muestra el análisis densitométrico de la respuesta de inducción de P53 de los cultivos tratados con IMZ, LVZ, MTZ y MH durante 24 horas a la dosis señaladas. Cada barra representa el valor promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$  respecto al control sin tratamiento (ANOVA). En el panel de abajo se muestran las estructuras moleculares de estos dos compuestos.



**Figura 25. Efecto del MTZ en la viabilidad celular en líneas linfoblásticas normales, heterocigas y homocigas para el gen ATM.** Se muestra el valor promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes. El panel de arriba muestra la comparación entre la línea ATM normal (CHOC) y las líneas ATM heterocigas. En el panel de abajo se observa la viabilidad celular de las líneas ATM homocigas con respecto a la línea normal.





**Figura 26. Efecto del MTZ sobre la proteína P53 en líneas linfoblásticas con diferentes condiciones alélicas para el gen ATM.** Como control positivo de inducción se usó actinomicina-D (+).

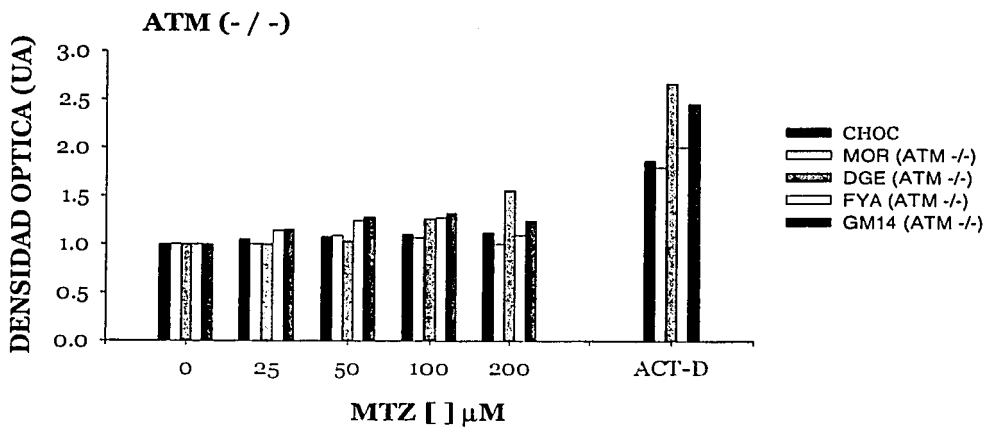
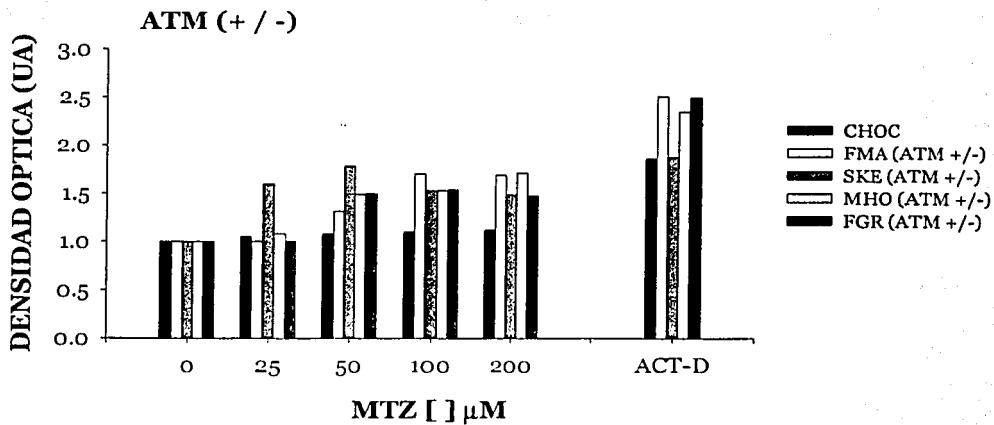


Figura 27. Densitometría de la respuesta de P53 después de 24 horas de tratamiento con MTZ en líneas linfoblastoides con diferente condición alélica para el gen ATM.

## VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

La evaluación de los efectos genotóxicos del MTZ se realizó en: a) Linfocitos de individuos tratados con este medicamento durante 10 días con la dosis recomendada contra la amibiasis ( Anexo 3); b) Linfocitos de individuos sanos, que no estuvieron expuestos a ningún tratamiento en los últimos 3 meses; y c) Líneas celulares humanas.

En linfocitos obtenidos de individuos un día después de terminado el tratamiento de 10 días con MTZ encontramos un incremento en rompimientos de cadena sencilla del DNA, visualizado con el ensayo cometa (anexo 3). Estos resultados concuerdan con otros reportes (Rieitz et al, 1991a, 1991b; Re et al, 1997), así como con datos previos obtenidos con las mismas muestras en las que el MTZ incrementó la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Elizondo et al, 1997).

Al evaluar los niveles de la proteína P53 en los linfocitos *ex vivo* se observó que, antes del tratamiento, sólo uno de los individuos exhibió una banda tenue de p53. Mientras que un día después de finalizado el tratamiento, a excepción de uno, todos los individuos mostraron una clara expresión de la proteína. Además se encontró una relación directa entre la cantidad de rompimientos de DNA y el incremento en los niveles de P53, indicando que el daño producido por el MTZ activa a esta proteína supresora de tumores. La relación entre la inducción de rompimientos de DNA y la activación de P53 se encuentra bien fundamentada en la literatura (Chumakov, 2000; Stewart y Pientepol, 2001). La magnitud del daño al DNA provocado por el tratamiento con MTZ se redujo en las muestras tomadas 15 días después de terminado el tratamiento hasta casi alcanzar los niveles basales observados antes del tratamiento, sugiriendo que este se reparó. Cabe señalar que no se encontró este efecto en dos individuos lo que puede interpretarse como que estos sujetos no fueron capaces de reparar el daño. Es necesario mencionar que consideramos que el daño al DNA se reparó ya que encontramos una frecuencia de

rompimientos en el DNA similar a la basal, sin embargo, habría que evaluar específicamente este proceso.

La activación de P53 nos llevó a preguntarnos acerca de su funcionalidad. La funcionalidad de p53 se mostró indirectamente por la activación del inhibidor del ciclo celular p21-WAF1, que es uno de los mediadores principales de las respuestas biológicas inducidas por la activación de P53. La proteína p21 WAF1 se encarga de detener la proliferación celular al inhibir las funciones de los complejos ciclinas-cdk y proteínas involucradas con la síntesis de DNA (El-Deiry et al., 1993; 1998). Los resultados sugieren que la inducción de la vía P53-P21 desencadenó la detención de la proliferación celular para posteriormente reparar el daño al DNA, y no que la activación de P53 encendió vías de apoptosis ya que el MTZ no mostró un efecto citotóxico significativo en nuestros estudios tanto *ex vivo* como *in vitro*. Por otro lado, la activación de p21 no correlacionó con los resultados previos donde se mostró que los linfocitos tratados con MTZ proliferan más rápido que los controles (Elizondo et al, 1997). Consideramos que esto podría deberse a: 1) poblaciones celulares distintas; 2) que p21 no es funcional o bien que alguno de los genes que continúan la cascada no se active; o 3) que estos procesos sean regulados por mecanismos distintos en los que predomina la señal de proliferación.

Si bien el MTZ puede interactuar directamente con el DNA e incluso producirle rompimientos (Brett et al., 1999; Tocher y Edwards, 1994; Kedderis et al., 1989; Chacko et al., 1986), nuestros datos mostraron una relación inversa entre la cantidad de MTZ en el plasma de los individuos tratados y la magnitud del daño al DNA. Una de las posibles interpretaciones es que el daño en los linfocitos de los individuos tratados con el medicamento es inducido por los metabolitos del MTZ, las formas hidroxilada y acetilada. De hecho una de las hipótesis más aceptadas para explicar la genotoxicidad del MTZ involucra al proceso de biotransformación aeróbica del medicamento (Anexo 2). Con esta idea en mente, se investigó si los metabolitos hidroxilado y acetilado inducen a la proteína P53 al generar daño al DNA. En líneas celulares, el metabolito hidroxilado incrementó los niveles de P53 como resultado del daño al DNA; mientras que en los cultivos de linfocitos, este

metabolito también incrementó a P53 de manera dosis respuesta en todos los donadores evaluados. Así también, tanto el MTZ como el metabolito acetilado generaron la activación de P53 en los cultivos de linfocitos humanos. Estos datos demuestran que tanto el MTZ como sus metabolitos pueden producir daño al DNA de las células.

En estos estudios también observamos que para el caso de los metabolitos, la inducción de P53 inició después de las primeras horas de tratamiento, lo cual es indicativo de que estos compuestos producen daño tempranamente. Existe la posibilidad de que los metabolitos del MTZ estén generando diferentes tipos de daño, adicionales a los MN que evaluamos en estos experimentos, como serían los rompimientos en las cadenas del DNA. Otra opción es que el MH y el MA pudieran afectar al citoesqueleto, lo que explicaría la activación inicial de P53 y que posteriormente estas alteraciones den lugar a la formación de MN (Kirsch-Volders et al., 1998). De cualquier manera son necesarios otros estudios diseñados en las mismas células y a diferentes tiempos para poder evaluar distintas formas de daño inducidos por el MTZ y sus dos metabolitos. Sería interesante determinar si el daño al DNA se produce directa o indirectamente por estos compuestos, como por ejemplo mediante la generación de radicales libres.

Las diferencias en los efectos producidos por el MTZ y sus dos metabolitos pudieran estar determinadas por las diferencias estructurales entre las moléculas. La presencia adicional de grupos hidroxilo y acetilo pudiera conferir a estas moléculas una mayor reactividad. El que compuestos relacionados como el levamisol y el imidazol también hayan incrementado P53 apoya la importancia de estas diferencias estructurales.

Curiosamente en las líneas celulares la funcionalidad de la proteína de P53 resultó ser uno de los factores involucrados en la generación del escenario de proliferación celular-daño al DNA. Nuestros datos apoyan el hecho de que la inducción de proliferación de células con daño en su DNA, generado por el MTZ y/o sus metabolitos, requiere de una proteína P53 no funcional. Las líneas celulares

empleadas nos permitieron observar que la inactividad de P53 hace que las células proliferen con daño en el DNA en presencia del MTZ y sus metabolitos. El modelo más idóneo para explicar lo anterior son las células RKO y RKO-E6. Estas células constituyen un sistema isogénico, en el cual la única diferencia es que la proteína P53 se degrada rápidamente en las células RKO-E6, aún cuando presentan la versión silvestre del gen p53, por lo que estas no tienen proteína P53 que lleve a cabo las funciones de guardián del genoma. Lo anterior se debe a que están transfectadas con el gen E6 de HPV16, cuyo producto media la degradación proteosómica de la proteína P53 vía ubiquitinización (Kessis et al.1993; Foster et al., 1994). La ausencia de P53 en la línea celular RKO-E6 hace que las células sean susceptibles a proliferar más rápido y a presentar también daño en el DNA después del tratamiento con MTZ o sus metabolitos. En contraparte, en las células RKO, con P53 funcional, el daño al DNA provocado por los metabolitos del MTZ aumentó los niveles de P53 deteniendo la proliferación celular, mientras que el MTZ que no dañó el DNA incrementó la proliferación. Es decir bajo condiciones normales la actividad de P53 detiene la proliferación celular ante la presencia de daño al DNA.

Los resultados obtenidos al transfectar versiones normales y mutadas de p53 a las células Jurkat y a los linfocitos humanos, también muestran claramente el papel de p53 en la alteración de la proliferación por el MTZ. En las células que reciben la versión mutada se incrementa aún más su proliferación, mientras que los linfocitos que recibieron la versión normal proliferaron pero disminuyó la potencia del efecto estimulador del MTZ. Al transfectar la versión normal de p53 en las células Jurkat, que poseen sólo un alelo mutado, se produjo una proteína funcional y las células fueron capaces de detectar el daño inducido por el tratamiento con MTZ frenándose su proliferación (Anexo 4).

Es difícil pensar que en los seres humanos haya una frecuencia alta de mutaciones en P53 que alteraran su función permitiendo a las células proliferar con daño cuando son tratados con MTZ. Es evidente que P53 no es el único factor en este escenario y que es necesario estudiar otros componentes involucrados en el

control de la proliferación celular. Un ejemplo, como nuestros resultados sugieren, sería el gen ATM, el cual dependiendo de su condición alélica heterociga u homociga, confiere a las células la susceptibilidad que hace que el MTZ produzca daño a diferencia de la condición normal. Sería relevante que los efectos del MTZ y sus metabolitos en los genes involucrados en el control de la proliferación se evaluaran no sólo en linfocitos sino en cualquier otra estirpe celular.

El entendimiento de los mecanismos mediante los cuales estos compuestos modulan la proliferación celular no está bien definido aún. Se han propuesto diferentes hipótesis, una de ellas plantea la modulación a nivel de segundos mensajeros, se sabe por ejemplo que el levamisol, compuesto que guarda una relación estructural muy estrecha con el MTZ, aumenta la proliferación linfoide mediante la inhibición de la AMPc-fosfodiesterasa, lo que resulta en un incremento en los niveles de AMPc (Hadden et al., 1975). Otra posibilidad es la existencia de receptores imidazólicos en las membranas celulares, los cuales mediarían la interacción con el MTZ y sus metabolitos y regularían los efectos en la proliferación celular. Se ha reportado la existencia de un receptor que reconoce la estructura del imidazol, el cual ha sido localizado en diferentes tejidos y órganos como el cerebro, pulmón corazón, médula adrenal, hígado y riñón (Farsang y Kapocsi, 1999; Busquet et al., 2000). Se ha sugerido que el tipo de señales acopladas a este tipo de receptores muestran cierta homología con las generadas por los receptores de interleucinas. Incluso se sabe que el levamisol puede potenciar la actividad de la interleucina 2 en linfocitos humanos (Merluzzi et al., 1975; Redondo et al., 1987). Otra alternativa sería analizar que el MTZ y/o sus metabolitos pudieran ejercer el mismo efecto en factores de crecimiento involucrados en la activación de la proliferación celular en las estirpes celulares evaluadas en este estudio.

Otro de los aspectos que fue evidente durante el desarrollo de esta investigación, es la alta variabilidad individual en la proliferación celular, daño al DNA, reparación del mismo e incluso en la magnitud de la inducción de las proteínas P53 y p21 WAF1. Los estudios *in vitro* con linfocitos de sangre periférica mostraron que el tratamiento con MTZ produce tres patrones distintos de

inducción de P53. En un grupo no encontramos expresión de P53; en un segundo se observó una dosis respuesta; y en un tercer grupo, en el cual las células estimuladas sin tratamiento presentaron una expresión de P53, al agregarse MTZ no se observó un efecto dosis respuesta claro. Estas diferencias en la respuesta de los individuos también se observaron con el tratamiento con actinomicina D, usado como control positivo de inducción de P53. No entendemos claramente por qué la estimulación de la división celular prende a P53, aunque otros estudios también han reportado que cuando se estimula con factores de crecimiento o mitógenos la proliferación de fibroblastos murinos (Dippold et al., 1981; Rotter et al., 1983; Reich y Levine, 1984), y humanos (Mercer et al., 1984), así como de linfocitos T (Calabretta et al., 1986) en quiescencia, los niveles de RNA mensajero y de la proteína P53 se incrementaron. Sin embargo, como muestran nuestros datos, esto no se observó en todos los individuos, por lo que una posible explicación sería que esta detección de P53 en linfocitos que inician la proliferación indicara la presencia de daño o estrés en esas células. Otra posibilidad es que en estos individuos el proceso de degradación de P53 vía MDM2 y ubiquitinación sea más lento que el normalmente descrito de aproximadamente 20 minutos (Nigro et al, 1989).

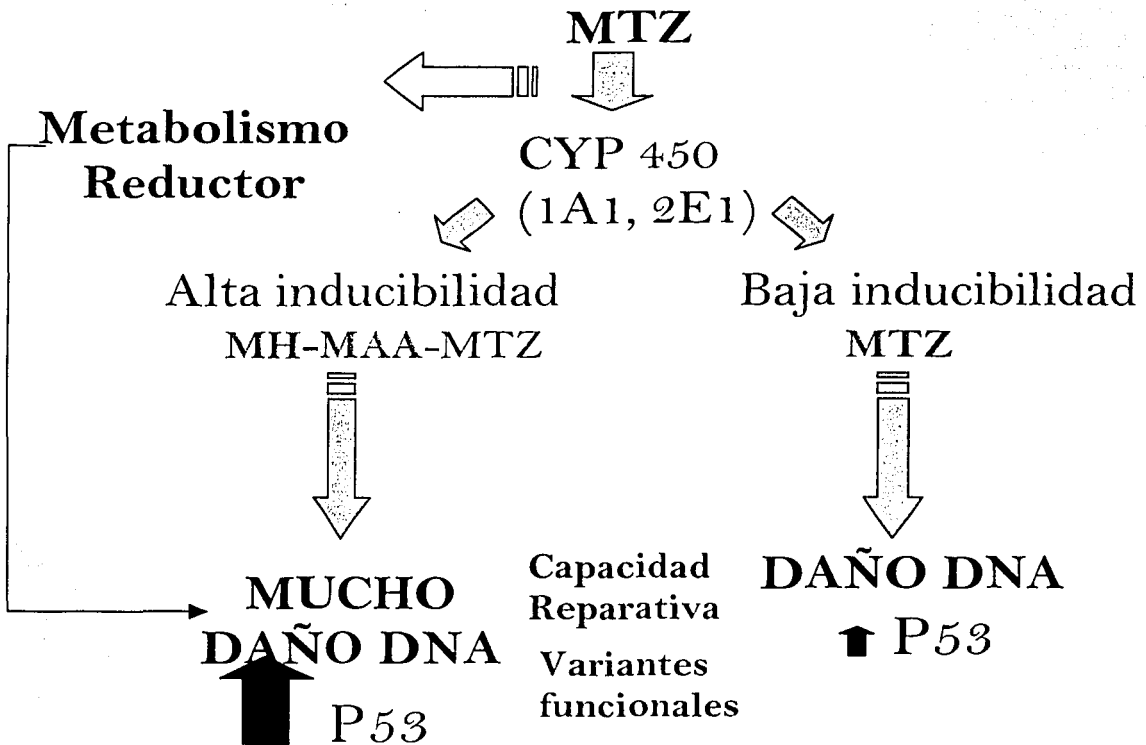
Las diversas respuestas que encontramos entre los donadores que fueron tratados con MTZ pueden deberse a distintos factores. Uno de estos son las diferencias individuales en el proceso de biotransformación del medicamento. Esto provocaría que hubiera distintas concentraciones del MTZ, y lo más importante, de sus metabolitos. De ser así, los individuos que biotransformen más el MTZ hacia su forma hidroxilada tendrían mayor daño que los que no metabolicen el medicamento, o lo hagan más hacia el metabolito acetilado. De hecho existe un reporte sobre la existencia de diferencias interindividuales en la cantidad de metabolitos que se forman después de la administración del MTZ (Loft, 1990). Además, aún cuando no se tiene el conocimiento exacto sobre las familias de citocromos P450 que median el metabolismo del MTZ (Anexos 1 y 2), se han identificado polimorfismos en los posibles candidatos, las familias 1A1 y 2E1 (Han y Zhou, 2000). Otro factor que debe considerarse para explicar las variaciones individuales es la capacidad de reparación de daño al DNA. Es probable que existan



personas que reparen más rápido y eficientemente el daño inducido por el MTZ, y otras que incluso no puedan repararlo. Al considerar ambas posibilidades como fuente de susceptibilidad individual a los efectos del MTZ nos permite plantear el modelo descrito en la figura 28, donde dependiendo de la carga genética del individuo, particularmente en los genes del metabolismo y de reparación, habrá sujetos que metabolicen más el MTZ hacia el metabolito hidroxilado y acetilado que presentarán más daño que aquellos que metabolicen pobremente el MTZ, lo que se traduciría en una activación e incremento diferencial de P53. La capacidad reparativa de los individuos influirá en la eficiencia de reparación del daño inducido. En este modelo no podemos dejar de lado que una fuente alterna de daño e incluso de variabilidad será la flora intestinal bacteriana, la cual se encargaría de la nitroreducción del MTZ hacia compuestos altamente genotóxicos.

Finalmente no podemos descartar que la variabilidad individual esté determinada por variantes funcionales alélicas en los genes y sus productos proteicos involucrados en la regulación de cascadas y transducción de señales de procesos como la proliferación celular y los sistemas de vigilancia. Por ejemplo, para el caso de P53, se ha propuesto que la proteína P53 activada pudiera presentar diferentes afinidades por los promotores de los genes que activa transcripcionalmente dependiendo de las modificaciones que sufra la proteína y del contexto celular de la activación (Inga y Resnick, 2001). Incluso está descrito que P53 presenta mayor afinidad por los promotores de los genes p21 WAF1 y MDM2 que por el gen bax (El-Deyri et al., 1992; Cho et al., 1994). De tal forma pudiera haber diferencias entre los individuos en cuanto a la afinidad que tenga P53 por sus blancos, lo que proveerá una variabilidad en las respuestas.

En conclusión, nuestros resultados muestran que el MTZ así como sus metabolitos hidroxilado y acetilado son capaces de producir diferentes tipos de daño clastogénico en células humanas, como rompimientos de cadena sencilla de DNA y micronúcleos. Este daño al DNA resulta en el incremento en los niveles de la



**Figura 28. Modelo para explicar la susceptibilidad individual a los efectos genotóxicos del MTZ en humanos.**

proteína supresora de tumores P53. La respuesta a nivel biológico de esta activación está ligada con la detención de la proliferación celular mediante la inducción de la expresión de la proteína p21 WAF-1 posiblemente para reparar el daño generado. De acuerdo a los datos obtenidos en las líneas celulares, la funcionalidad de P53 es un factor decisivo para que los procesos mencionados se lleven a cabo. La inactividad de la proteína P53 permite la proliferación celular a pesar del daño inducido por el MTZ. Contrario a lo que planteamos, nuestros resultados indican que el MTZ y sus metabolitos no interfieren con la activación de la proteína P53 en respuesta a la inducción de daño al DNA. En los linfocitos humanos, se encontró una respuesta individual en la inducción de la proteína P53

ante el tratamiento con MTZ y sus metabolitos tanto en el estudio *ex vivo* como en el *in vitro*. De acuerdo con nuestros resultados, al menos *in vivo*, estas variaciones están ligadas a la magnitud del daño inducido. Sin embargo, otros factores como las diferencias a nivel del metabolismo, reparación del daño al DNA e incluso genes relacionados con la regulación del ciclo celular y los puntos de vigilancia, deben de estar involucrados en la susceptibilidad individual al MTZ y a sus metabolitos.

Por último, es necesario decir 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 infecciones, e incluso es posible que su empleo se incremente por la aparición de infecciones emergentes y re-emergentes en el mundo. Si bien su efectividad no está en duda, salvo en excepciones de resistencia de los microorganismos, 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/o sus metabolitos en un número significativo de individuos que incluya pacientes que sufran de las diferentes parasitosis para las cuales el MTZ está indicado. Una de las consecuencias más graves del daño al DNA 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.

## VIII. NUEVOS PLANTEAMIENTOS.

Este estudio genera nuevas incógnitas:

- ¿Cuál es el mecanismo por cual el MTZ y sus metabolitos incrementan la proliferación de las células? ¿Podría ser el recambio del AMPc, propuesto ya para el levamisol o la existencia de receptores imidazólicos en las membranas de linfocitos?
- ¿Qué otros genes centinelas de la proliferación pueden ser alterados por el MTZ? ¿Podrían ser genes como ras, fos, jun, ciclinas y/o cdk?
- ¿Tiene el linfocito humano la capacidad de metabolizar el MTZ?
- ¿Las respuestas individuales en P53 se deberán a las diferencias en el metabolismo del MTZ o en la capacidad de reparación?
- ¿Qué otros genes confieren susceptibilidad a los efectos genotóxicos del MTZ?
- ¿Qué factores son los responsables de la susceptibilidad individual?

## IX. REFERENCIAS.

**Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.** Molecular Biology of the Cell. Second Edition. Ed Garland Publishing, Inc. (1989).

**Appella, E., Anderson, C.W.** Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol. Biol. (Paris)*, 48: 227-245 (2000).

**Arellano, M., Moreno, S.** Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 559-573 (1999).

**Bahr, V., Ulmann, U.** The influence of metronidazole and its two metabolites on murine *in vitro* lymphocyte transformation. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2: 568-570 (1983).

**Bargonetti, J., Manfredi, J.J., Chen, X., Marshak, D.R., 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).

**Boulikas, T.** Phosphorylation of transcription factors and control of the cell cycle. *Crit. Rev. Eukar. Gene Expression*, 5: 1-77 (1995).

**Brett, A.M., Serrano, S.H., La-Scalea, M.A., Gutz, I.G., Cruz, M.L.** Mechanism of interaction of *in situ* produced nitromidazole reduction derivatives with DNA using electrochemical DNA biosensor. *Methods Enzymol.*, 300: 314-321 (1999).

**Bousquet, P., Bruban, V., Schann, S., Feldman, J.** Imidazoline receptors: a challenge. *Pharm. Acta. Helv.*, 74: 205-209 (2000).

**Calabretta, B., Kaczmarek, L., Selleri, L., Torelli, G., Ming, P.M.L., Ming, S.C., Mercer, W.E.** Growth-dependent expression of human Mr 53,000 tumor antigen messenger RNA in normal and neoplastic cells *Cancer Res.* 46: 5738-5742 (1986).

**Campisi, J., Medrano, E.E., Morreo, G., Pardee, B.** Restriction point control of cell growth by a labile protein: evidence for increased stability in transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 436-440 (1982).

**Chacko, M., Maru, G.B., Bhide, S.V.** Preliminary observations on interaction of <sup>14</sup>C-metronidazole with macromolecules *in vivo* and *in vitro*. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 30:199-204 (1986).

**Cheng, J. and Haas, M.** Frequent mutations in the p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5502- 5509 (1990).

**Chowdary, D.R., Dermody, J.J., Jha, K.K., Ozer, J.L.** Accumulation of p53 in mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1997-2003 (1994).

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

**Dale, L.D., Dyson, T., Tocher, D., Edwards, D.** Studies on DNA damage and induction of SOS repair by novel multifunctional bioreducible compounds. *Anticancer Drug Design.* 4: 295-302 (1989).

**De Meo, P., Vanalle, E., Bernardini, M., Laget, J., Maldonado, O., Jentzer, M.P., Crozet, M., Dumenil, G.** Evaluation of mutagenic and genotoxic activities of 48 nitroimidazoles and related imidazol derivatives by the Ames test and SOS chromotest. *Environ. Mol. Mutagen.* 19: 167-170 (1992).

**DeFrank, J., Tang, W., Powell, S.N.** p53-null cells are more sensitive to ultraviolet light only in the presence of caffeine. *Cancer Res.*, 56: 5365-5368 (1996).

**Dippold, W.G., Jay, G., DeLeo, A.B., Khoury, G., Old, L.J.** p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 1695-1699 (1981).

**Dou, Q.P., Markell, P.J., Pardee, A.B.** Thymidine kinase transcription is regulated at G1/s phase by a complex that contains retinoblastoma-like protein and a cdc2 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89 :3256-3260 (1992).

**El-Deiry, W.S.** Regulation of p53 downstream genes. *Sem. Cancer Biol.* 8: 345-357 (1998).

**El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W, Vogelstein B.** Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genet.* 1: 45-49 (1992).

**Elizondo, G., Gonsebatt, M.E., Salazar A., Lares, I., Santiago, P., Herrera, J., Hong, E., Ostrosky-Wegman, P.** Genotoxic effects of metronidazole. *Mutation Res.* 370: 75-80 (1996).

**Elizondo, G., Montero, R., Herrera, L.A., Hong, E., Ostrosky-Wegman, P.** Lymphocyte proliferation kinetics and sister chromatid exchanges in individuals 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 Sci.* 59: 285-297 (1997).

- Ernsberger, P.** The I1-imidazoline receptor and its cellular signaling pathways. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 881: 35-53 (1999).
- Evan, G.I., Voudsen K.H.** Proliferation, cell cycle and apoptosis. *Nature*, 411: 342-348 (2001).
- Farnham, P.J., Schimke, R.T.** Transcriptional regulation of mouse dihydrofolate reductase in the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 260: 7675-7680 (1985).
- Farsang, C., Kapocsi, J.** Imidazoline receptors: from discovery to antihypertensive therapy: facts and doubts. *Brain Res. Bull.*, 49: 317-331 (1999).
- Fenech, M., Morley, A.A.** Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.* 147: 29-36 (1985).
- Fields, S., Jang, S.K.** Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*. 249:1046-1049 (1990).
- Fletcher, C., Heintz, N., Roeder, R.G.** Purification and characterization of OTF-1, a transcriptional factor regulating the cell cycle expression of a human histone H2b gene. *Cell*, 51: 773-781 (1987).
- Ford, H.L., Pardee, A.B.** Cancer and the cell cycle. *J. Cell. Biochem.*, S32/33: 166-172 (1992).
- Gilman, A.G.** G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*, 36: 577-579 (1984).
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., Lamb, N.J.C.** Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 67: 1169-1179 (1991).
- Goul, K.L., Nurse, P.** Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, 342:39-45 (1989).
- Graña, M., Reddy, P.** Cell cycle: regulatory events in G<sub>1</sub> - S transition of mammalian cells. *J. Cell. Biochem.*, 54: 379-386 (1994).
- Gutman, A., Wasyluk, B.** Nuclear targets for transcription regulation by oncogenes. *Trends Genet.*, 7: 19-54 (1991).
- Hadden, J.W., Coffey, R.G., Hadden, E.M., López-Corrales, E.** (1975) Effects of levamisole and imidazole on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels. *Cell. Immunol.* 20, 98-103.
- Han, X.M., Zhou, H.H.** Polymorphism of CYP450 and cancer susceptibility. *Acta Pharmacol. Sin.* 21: 673-679 (2000).

**Hartmann, A., Speit G.** Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister chromatid exchanges (SCE). *Mutation Res.* 346: 49-56 (1995).

**Hartwell, L.H., Kastan, M.B.** Cell cycle control and cancer. *Science.* 266: 1821-1828 (1994).

**Hassapoglidou, S., Diamandis, E.P., Sutherland, D.J.** Quantification of p53 protein in tumor cell lines, breast tissue extracts and serum with time-resolved immunofluorometry. *Oncogene*, 8: 1501-1509 (1993).

**Hung, D.T., Jamison, T.F., Schreiber, S.L.** Understanding and controlling the cell cycle with natural products. *Chem. Biol.*, 3: 623- 639 (1996).

**IARC** Evaluation of carcinogenic risk to humans. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. Suppl. 7 (1987) 250-251.

**Iguchi-Ariga, S.M.M., Okazaki, T., Yamaguchi, M., Itani, T., Ogata, Y., Sato, Y., Ariga, H.** An initiation site of DNA replication with transcriptional enhancer activity present upstream of the c-myc gene. *EMBO J.* 7:3135-3142 (1988).

**Inga, A., Resnick, M.** Novel human p53 mutations that are toxic to yeast can enhance transactivation of specific promoters and reactivate tumor p53 mutants. *Oncogene.* 20: 3409-3419 (2001).

**Izume, T., Maller, J.L.** Phosphorylation of xenopus cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transition. *Mol. Cell Biol.*, 11: 3860-3867 (1991).

**Johnson, D.G., Walker, C.L.** Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39: 295-312 (1999).

**Kedderis, G.L., Argenbrighth, L.S., Miwa, G.T.** Covalent interaction of 5-nitroimidazoles with DNA and protein in vitro. *Chem. Res. Toxicol.*, 2: 146-149 (1989).

**Kern, S.E., Kinzler, K.W., Baker, S.J., Nigro, J.M., Rotter, V., Levine, A.J., Friedman, P., Prives, C., Vogelstein, B.** Mutant p53 proteins bind DNA abnormally in vitro. *Oncogene.* 6: 131-136 (1991).

**Kern, S.E., Kinzler, K.W., 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).



**Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, K.W., Vogelstein B.** Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science*. 256: 827-830 (1992).

**Kessis, T.D., Slebos, R.J., Nelson, W.G., Kastan, M.B., Plunkett, B.S., Han, S.M., Lorincz, A.T., Hedrick, L.** Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53 -mediated cellular response to DNA damage. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 3988-3992 (1993).

**Khanna, K.K., Gatti, R., Concannon, P., Weemaes, C.M.R., Hoekstra, M.F., Lavin, M., D'Andrea, A.** Cellular responses to DNA damage and human chromosome instability syndromes. En DNA damage and repair. Volume II: DNA repair in higher eukaryotes. Edit. J.A. Nickoloff y M.F. Hoekstra. Humana Press, pp 395-442 (1998).

**Kirsh-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P.** The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome lose and non-disjunction. *Mutat. Res.*, 272: 223-236 (1998).

**Kirsch-Volders, M., Soduni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech M., Ishidate, M. Jr., Lorge, E., Norppa, H., Surallés, J., von der Hude, W., Wakata, A.** Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environ. Mol. Mutagen.* 315: 167-172 (2000).

**Kubbutat, M.H.G., Voulsen, K.** Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol. Med. Today.* 4: 250-256 (1998).

**Lania, L., Majello, B., Napolitano, G.** Transcriptional control by cell-cycle regulators: a review. *J. Cell Physiol.*, 179: 134-141 (1999).

**Lew, J.D., Marini, J.N., Reed, I.S.** Different G1 cyclin control the timing of cell cycle commitment in mother and daughter cells of the budding yeast *S.cerevisiae*. *Cell*, 69 :317-327 (1992).

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

**Lowndes, N.F., Murguia, J.R.** Sensing and responding to DNA damage. *Curr. Opin. Gene. Develop.*, 10: 17-25 (2000).

**Maki, C.G., Huibregtse, J.M., Howley, P.M.** In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res.* 56: 2649-2654 (1996).

**Manfioletti, G., Ruaro, M.E., Del Sal, G., Philipson, I., Schneider, B.** A growth arrest-specific (gaps) gene codes for a membrane protein. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 2924-2930 (1990).

- Meek, D.W.** Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene*. 18: 4668-4679 (1999).
- Menéndez, D.** Efecto del arsenito de sodio sobre el gen supresor de tumores p53. Tesis de Licenciatura, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. (1997).
- Menéndez, D., Mora G., Salazar A.M., Ostrosky-Wegman, P.** Sensitivity to arsenic cytotoxic effects is dependent on ATM gene status. *Mutagen.*,16: 443-448 (2001).
- Mercer, W.E., Avignolo, C., Baserga, R.** Role of the p53 protein in cell proliferation as studied by microinjection of monoclonal antibodies. *Mol. Cell Biol.* 4: 276-281 (1984).
- Merluzzi, V., Bagder, A., Kaiser, C., Cooperband, S.** *In vitro* stimulation of murine lymphoid cell cultures by levamisole. *J. Clin. Exp. Immunol.* 22: 486-490 (1975).
- Michiels, F.M., Caillou, B., Talbot, M., Dessarps-Freichey, F., Maunoury, M.T., Schlumberger, M., Mercken, L., Monier, R., Feunteun, J.** Oncogenesis potencial of guanine nucleotide stimulatory factor  $\alpha$  subunit in thyroid glands of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 10 488- 10 492 (1994).
- Miller, J., Reeves, S., Salaman, J.** Effects of simple imidazoles on human peripheral blood lymphocytes stimulated by mitogen or allogenic cells. *J. Immunopharmacol.* 2: 225-243 (1980).
- Morgan, D.O.** Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13: 261-291 (1997).
- Muca, C., Vallar, L.** Expression of mutationally activated *Gas* stimulates growth and differentiation of thyroid FRTL 5 cells. *Oncogene*, 9: 3647-3653 (1994).
- Mudryj, M., Devoto, S.H., Hiebert, S.W., Hunter, T., Pines, J., Nevins, J.** Cell cycle regulation of E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell*, 65: 1243-1253 (1991).
- Nagarajan, M., Johnson, F.L.** Regulation of thymidine synthase gene expression in mouse fibroblasts synchronized by mitotic selection. *Exp. Cell Res.*, 181: 289-297 (1989).
- Nasmyth, K.** Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 274, 1643-1645 (1996).

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

**Nourby, C., Nurse, P.** Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 441-470 (1992).

**Nurse, P.** Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344: 503-508 (1990).

**Oren, M.** The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties *Biochim. Biophys. Acta.*, 823: 67-78 (1985).

**Pardee, A.B.** A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71: 1286-1290 (1974).

**Pardee, A.B.** G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, 246: 603-608 (1989).

**Paulovich, A.G., Tocksysky, D.P., Hartwell, L.H.** When checkpoints fail. *Cell*. 88: 315-321 (1997).

**Pepper, R.J., Tina, W.Z., Mickelson, M.N.** Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation. *J. Lab. Clin. Med.* 72: 842-846 (1968).

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

**Persons, D.A., Wilkinson, W.O., Bell, R.M.** Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity with protein kinase C-1 cDNA. 52: 447-458 (1988).

**Pines, J.** Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv. Cancer Res.*, 66: 181-219 (1997).

**Prives, C., Hall, P.A.** The p53 pathway. *J. Pathol.* 187: 112-126 (1999).

**Raycroft, L., Wu, Y., Lozano, G.** Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science*. 249: 1049-1051 (1990).

**Ré, J.L., De Méo, M.P., Laget, M., Guiraud, H., Castegnaro, M., Vanelle, P., Duménil, G.** Evaluation of the genotoxic activity of metronidazole and dimetridazole in human lymphocytes by the comet assay. *Mutat. Res.*, 375: 147-155 (1997).

- Redondo, J.M., López-Guerrero, J.A., Fresno, M.** Potentiation of interleukin-2 activity by levamisole and imidazole. *Immunol. Lett.* 14: 111-116 (1987).
- Reddy, P.** Cell cycle: regulatory events in G<sub>1</sub> - S transition of mammalian cells. *J Cellular Biochemistry*, 54: 379-386 (1994).
- Reed, M., Woelker, B., Wang, P., Wang, Y., Anderson, M.E., Tegtmeyer, P.** The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. was done in duplicates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:9455-9459 (1995).
- Reich, N.C., Levine, A.J.** Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature.* 308:199-201(1984).
- Reisman, D., Balint, E., Loging, T., Rotter, V., Almon, E.** A novel transcript encoded within the 10Kbp 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, W.T.** 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).
- Reitz, M., Rumpf, M., Knitza, R.** DNA single strand-breaks in lymphocytes after metronidazole therapy. *Drug Res.*, 41: 155-156 (1991a).
- Reitz, M., Rumpf, M., Knitza, R.** Metronidazole induces DNA strand-breaks in cultures of human lymphocytes and phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Drug Res.*, 41: 65-69 (1991b).
- Rojas, E., López, M.C., Valverde, M.** Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 722: 225-254 (1999).
- Rollins, B.J., Stiles, C.D.** Serum-inducible genes. *Adv Cancer Res*, 53:1-32 (1989).
- Rotter, V., Abutbul, H., Ben-Ze'ev, A.** P53 transformation-related protein accumulates in the nucleus of transformed fibroblasts in association with the chromatin and is found in the cytoplasm of non-transformed fibroblasts. *EMBO J.* 2: 1041-1047 (1983).
- Ryan, K.M., Phillips, A.C. Vousden, K.H.** Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 332-337 (2001).

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

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

**Samuelson J.** Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 1533-41 (1999).

**Scheffner, M., Münger, K., Byrne, J.C., Howley, P.M.** The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**:5523-5527 (1991).

**Schnapf, J.L., Baylor, D.A.** How photoreceptor cells respond to light. *Sci. American*, 256: 40-47 (1987).

**Schneider, C., King, R.M., Philipson, L.** Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cell. *Cell*, 54: 787-793 (1988).

**Serrano, M., Hannon, G.J., Beach, D.** A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/Cdk4. *Nature*, 366: 704-707 (1993).

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

**Shubert, S., Andersen, B.H., Bahr, V., Fischer, L., Stamp R., Stricke, G., Wittke, J.W., Ulmann, U.** The immunomodulatory effects of antibiotics: *in vitro* and *ex vivo* investigations of 21 substances by means of the lymphocyte transformation test. *Zentralab. Bakteriologie*. 284: 402-438 (1996).

**Slingerland, J.M., Hengst, L., Pan, C.H., Alexander, D., Stampfer, M.S., Reed, S.I.** A novel inhibition of cyclin-cdk activity detected in transforming growth factor  $\beta$ -arrested epithelial cell. *Mol. Cell Biol.*, 14: 3683-3694 (1994).

**Soussi, T., Caron de Fromentel, 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).

**Stein, G.S., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Lian, B.** Regulation of histone gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4: 166-173 (1992).

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

**Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T., Wahl, G.M.** 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).

**Strauss, G.H.** Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation Res.* 252: 1-15 (1991).

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

**Sukhatme, V., Cao, X., Chang, L., Tsai-Morris, C., Stamenovich, D., Ferreira, P., Cohen, D., Edwards, S., Shows, T., Curran, T., LeBeau, M., Adamson, E.** A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation and after cellular depolarization. *Cell*, 53: 37-43 (1988).

**Tocher, J.H., Edwards, I.** Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases. *Biochem. Pharmacol.*, 48: 1089-1094 (1994).

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

**Treisman, R.** Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *EMBO J.*, 6:2711-2717 (1987).

**Unger, T., Mietz, J.A., Scheffner, M., Yee, C.L., Howley, P.M.** 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).

**Visvardis, E.E., Tassiou, A.M., Piperaki, S.M.** Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gamma radiation with alkaline comet assay. *Mutation Res.* 383: 71-80 (1997).

**Walker, K.K., Levine, A.J.** 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, J.E., Anderson, M.E., Schwedes, J.F., Tegtmeier, P.** p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol. Cell Biol.* 13: 5182-5191 (1994).

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

**Webster, K.R.** Therapeutic potential of targeting the cell cycle. *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 940-943 (2000).

**Weinberg, R.A.** The action of oncogenes in the cytoplasm and the nucleus. *Science*, 230 :770-776 (1985 a).

**Weinberg, R.A.** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81: 323-330 (1995 b).

**Weinstein, I.B., Zhou, P.** Cell cycle control gene defects and human cancer. In: *Encyclopedia of Cancer*. Academic Press Inc. USA, 1:256-267 (1997).

**White, R.** Regulation of RNA polymerases I and III by the retinoblastoma protein: a mechanism for growth control. *Trends. Biochem. Sciences*, 22: 77-80 (1997).

**WHO.** World Health Organization, Essential Drugs, WHO Drug Information 13 (1999) 249-262.

**Williams, J.G., Penman, S.** The messenger RNA sequences in growing and resting mouse fibroblasts. *Cell*, 6: 197-206 (1975).

**Zetterbeng, A., Larson, O.** Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:5365-5369 (1985).

**Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W.H., Tom, E., Mack, D.H., Levine A.J.** Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes & Dev.* 14: 981-993 (2000).

**Zhou, B.B.S., Elledge, S.J.** The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408: 433-439 (2001).

## X. ANEXOS.



**ANEXO1**

# Metronidazol: una visión integral

Andrés Bendesky<sup>1,2</sup> Daniel Menéndez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Medicina, UNAM.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El metronidazol es un agente sintético antibacteriano y antiparasitario que se encuentra clasificado dentro de la clase de nitroimidazoles, y cuyo uso en la práctica clínica ya tiene más de 35 años. Su indicación original fue para el tratamiento de infecciones provocadas por *Trichomonas vaginalis*, pero con el paso del tiempo se ha ido ampliando el espectro de su acción, utilizándose hoy en día en el tratamiento de una variedad de infecciones provocadas por diferentes tipos de organismos. El metronidazol inicialmente fue aprobado por la asociación de alimentos y drogas de Estados Unidos (FDA) para uso humano en 1963, se encuentra disponible en formulación oral, parenteral, vaginal y tópica.

## I. Introducción

### a) Antecedentes

En el campo del tratamiento de infecciones provocadas por protozoarios, bacterias y otros organismos, los compuestos heterocíclicos con grupos nitros dentro de su estructura básica molecular, representan una gama de agentes importantes. En el año de 1944 Dood y Stilmann indicaron la importancia de la adición de grupos nitro a derivados del furano para incrementar el efecto antimicrobiano no. 1. En 1955 Nakamura aisló a partir de *Streptomyces ssp.* la azomicina (2-nitroimidazol) la cual mostró tener actividad microbicida contra *Trichomonas vaginalis*, iniciando la síntesis de fármacos derivados de nitroimidazoles. A finales de la década de los 50, Cosar y Julou<sup>2</sup> sintetizaron el metronidazol o (1-(β-hidroxiethyl (-2-metil-5-nitroimidazol) [figura 1].

### b) Espectro de acción

El metronidazol (MTZ) se desarrolló con el propósito de combatir infecciones por *Trichomonas vaginalis*. Poco después su uso se amplió para combatir las infecciones provocadas por otros protozoarios como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. Hoy en día el metronidazol tam-

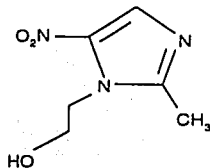


Figura 1. Estructura del metronidazol.

bién es considerado uno de los medicamentos más eficaces para combatir las infecciones por bacterias anaerobias tanto gram-negativas como positivas (cuadro 1), destacando la infección por *Helicobacter pylori*.<sup>13-15</sup>

El MTZ también es útil en el tratamiento de la enfermedad de Crohn,<sup>19</sup> así como para afecciones dérmicas como la rosácea,<sup>20</sup> el acné vulgar<sup>21</sup> y la dermatitis perioral<sup>22</sup> entre otras. Como dato interesante, el MTZ ha mostrado ser efectivo como radiosensibilizador para células hipóxicas, al grado de ser empleado para incrementar la efectividad biológica de la radiación ionizante durante la radioterapia de pacientes con cierta clase de tumores<sup>23</sup> así como en combinación con agentes alquilantes para mejorar la eficacia de la terapia antitumoral.<sup>24</sup>

### c) Mecanismo de acción como antibiótico y antiparasitario

El MTZ es relativamente inactivo hasta que es metabolizado dentro de los organismos susceptibles; es activado cuando se reduce, postulándose que su mecanismo de acción es a través de la eliminación del potencial reductor de microorganismos anaerobios y microaerófilos.<sup>25</sup> Esto se da mediante la acción de proteínas transportadoras de electrones como la piruvato: ferredoxina oxidoreductasa o flavodoxina localizadas en el interior del parasito/bacteria, las cuales llevan a cabo la reducción del grupo nitro del MTZ que resulta en la formación de N-(2-hidroxiethyl) del ácido oxámico y de acetamida. El MTZ daña a las células al formar aductos con las proteínas y los ácidos nucleicos.<sup>26</sup>

## II. Propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas

En cuanto a sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, el MTZ es uno de los antiparasitarios y antibacterianos más estudiados.

### a) Absorción

El MTZ puede ser administrado por vía oral, intravenosa, tópica, vaginal 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 la casi totalidad del organismo. Los niveles en suero pueden llegar a detectarse después de 1 hora de la ingestión de una dosis de 500 mg alcanzando una concentración plasmática máxima de 8 a 13 mg/L en el tiempo máximo de 0.25 a 4.0 horas.<sup>27,28</sup> La absorción es excelente, presentando

Cuadro 1. Organismos susceptibles al metronidazol.

Organismo	Referencias
<b>Protozoarios</b>	
<i>Trichomonas vaginalis</i>	2-4
<i>Giardia lamblia</i>	5,6
<i>Entamoeba histolytica</i>	7,8
<b>Anaerobios</b>	
<b>Gram-negativos</b>	
<i>Bacteroides fragilis</i>	9
Otros <i>Bacteroides</i> spp.	10
<i>Fusobacterium</i> spp.	10
<i>Actinobacillus</i> spp.	11
<i>Campylobacter fetus</i>	12
<i>Helicobacter pylori</i>	13-15
<i>Gardenerella vaginalis</i>	16
<b>Anaerobios Gram-positivos</b>	
<i>Peptostreptococcus</i>	17,18
<i>Clostridium perfringens</i>	17,18
<i>Clostridium difficile</i>	17-18

una biodisponibilidad de  $\pm$  90% por vía oral. La administración de 500 mg por vía rectal presenta una biodisponibilidad de 62 al 82% y concentración máxima de 4 a 5.5 mg/L.<sup>29</sup> La administración intravenosa, de 7.5 mg/kg del fármaco cada 6 horas en individuos adultos sanos, produce un pico de concentración en el plasma entre 18 y 26 mg/L.<sup>30</sup> En cuanto a la administración tópica, principalmente intravaginal o dérmica, las concentraciones absorbidas son mínimas, aunque puede variar dependiendo del vehículo usado. 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.<sup>31</sup> En el caso de dispositivos vaginales de 500 mg, estos valores son de 1.9 mg/L, alcanzándose una biodisponibilidad de alrededor de 25% con respecto a la de una dosis oral pero de 56% con respecto a la intravenosa.<sup>32</sup> Por su parte la absorción dérmica del MTZ en gel al 0.75% está reportada como muy baja en pacientes con rosácea, se detectaron en suero concentraciones de 66  $\mu$ g/L después de 24 horas de ser aplicado 1 g del medicamento.<sup>33</sup>

#### b) Distribución

Tanto la administración oral como intravenosa del MTZ son ampliamente distribuidas en los tejidos y fluidos del organismo, debido en gran parte a que su unión a proteínas séricas o plasmáticas es relativamente baja (< 20%).<sup>33</sup> Los volúmenes de distribución reportados varían de 0.53 a 0.96 L/kg.<sup>34,35</sup> El MTZ también logra penetrar en el líquido cerebroespinal, alcanzando así el sistema nervioso central donde las concentraciones son aproximadamente del 43 al 100% de las encontradas en el plasma.<sup>36</sup> También se han encontrado concentraciones bajas en tejido placentario (0-1.4 mg/L) y en la leche materna (3.7-15.5 mg/mL).<sup>37</sup>

#### c) Metabolismo

En los mamíferos incluyendo al humano, la principal vía de biotransformación del MTZ 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) y como las de fase II (conjugaciones) que finalmente dan origen a las formas metabólicas hidroxilada, acetilada, así como a metabolitos conjugados con glucurónidos respectivamente.<sup>38</sup>

En el humano es el hígado el principal órgano encargado de llevar a cabo la mayoría de las reacciones de biotransformación del MTZ mencionadas. En las reacciones de fase I participan los complejos enzimáticos de citocromos P450 (CYP450); se ha propuesto la participación de los complejos de las subfamilias 1A, 2B y 2C.<sup>39</sup>

Cabe señalar que uno de los productos del metabolismo de MTZ, el metabolito hidroxilado, también presenta una actividad antimicrobiana considerable aunque menor a la del fármaco original. Se ha reportado que este metabolito presenta entre un 30 a 65% de la actividad reportada para el MTZ.<sup>11,39</sup>

#### d) Excreción

El MTZ en humanos es principalmente excretado por vía renal, en forma de sus metabolitos y en menor grado como su forma parental.<sup>42</sup> Los valores medios de eliminación varían entre 6 y 12 horas en individuos sanos.<sup>27,34</sup> Usando trazas radiactivas, los estudios de farmacocinética de MTZ en humanos muestran que en un periodo de 5 días, aproximadamente el 77% del medicamento es eliminado en la orina y el 14% es excretado en las heces.<sup>40</sup> Alrededor del 5% del MTZ es excretado como bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como resultado del metabolismo reductivo de la flora intestinal.<sup>41</sup> El metabolito hidroxilado del MTZ (1-(2-hidroxietyl)-hidroximetil-5-nitroimidazol) es el que se encuentra en mayor cantidad en la orina y junto con la forma 2-metil-5-nitroimidazol, el metabolito acetilado (1-(2-hidroxietyl)-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.<sup>38,39</sup> Bergan y colaboradores<sup>42</sup> 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,<sup>43</sup> bilis,<sup>44</sup> saliva<sup>45</sup> e inclusive como ya se había mencionado con anterioridad en leche materna donde la vida media es de 9 horas aproximadamente.<sup>37</sup>

#### e) Farmacodinamia

El MTZ es capaz de destruir rápidamente a los anaerobios susceptibles.<sup>46</sup> Como los aminoglucósidos y fluoroquinolonas, el MTZ exhibe una efectividad dependiente de la

concentración y tiene un efecto posantibiótico 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.

### III. Uso terapéutico

#### a) Amibiasis

*E. histolytica* es una causa común de diarrea crónica y aguda, particularmente en países en desarrollo. El espectro clínico de la enfermedad puede ir de portador asintomático a enfermedad invasiva con formación de abscesos hepáticos secundarios a su actividad lítica de tejidos. El MTZ oral en 750 mg tres veces diarias por 5 a 10 días es el tratamiento de elección tanto para la infección gastrointestinal aguda, como para el absceso hepático.<sup>7,8,46</sup> En más del 50% de los pacientes, la fiebre se resuelve en 3 días de iniciado el tratamiento.<sup>46</sup> Desafortunadamente, una respuesta rápida al tratamiento con MTZ no puede predecir un control a largo plazo de las infecciones por *E. histolytica*. Un estado de colonización asintomática persiste en aproximadamente 60% de los pacientes tratados con MTZ y requiere el tratamiento subsiguiente con diloxanida o paromomicina.<sup>46</sup>

#### b) Trichomoniasis

El parásito protozoario *T. vaginalis* es un causante principal de infecciones del tracto urinario, causando vaginitis en las mujeres y uretritis y/o prostatitis en los hombres. El MTZ en forma oral a una dosis de 200 a 250 mg tres veces al día por siete días fue el régimen de tratamiento tradicional por muchos años después de su lanzamiento inicial, teniendo un éxito superior al 90%.<sup>5,46</sup>

Al principio de los años 70, una única dosis oral de 2 g de MTZ fue considerada tan eficaz como el régimen de 7 días, y así este nuevo esquema se volvió más común gracias a la mayor conveniencia y apego al tratamiento. El éxito ha ido del 82 al 100%, pero aún pueden ocurrir fallas. Se ha reportado resistencia de *T. vaginalis* al MTZ,<sup>6</sup> pero en este caso, parece no ser una característica de todo o nada.

#### c) *Helicobacter pylori*

*H. pylori* es un bacilo gram-negativo pequeño, en forma de S que se encuentra ocasionalmente en la capa mucosa del estómago humano y que juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad úlcero-péptica.<sup>13-15,46</sup> (EUP). La evaluación del papel del MTZ en la terapia para la EUP ha sido complicada debido a las numerosas combinaciones de antibióticos, antagonistas del receptor de histamina H<sub>2</sub> e inhibidores de la bomba de protones usados para combatir infecciones por *H. pylori*. En estos casos se necesita terapia de combinación debido a problemas de resistencia.

#### d) Vaginosis bacteriana

La vaginosis bacteriana es una infección polimicrobiana. Algunos de los microorganismos involucrados son *Gardnerella vaginalis*, varios anaerobios (*Prevotella*, *Peptostrep-*

*tococcus*, *Mobilincus spp.* y *Bacteroides spp.*) y micoplasmas.<sup>12,16,18,46</sup> Los tratamientos preferidos han sido MTZ administrado ya sea a una dosis de 500 mg oralmente dos veces al día por 7 días, 2 g orales en dosis única, o como gel al 0.75% administrado intravaginalmente dos veces al día por 5 días, con un porcentaje de cura que va del 80 al 100%.<sup>46</sup>

#### e) Enfermedad de Crohn

Aunque no se han implicado bacterias específicas en la recaída de la enfermedad de Crohn después de resección intestinal, el MTZ se ha usado desde hace más de 20 años para prevenir o retardar el desarrollo de recurrencias. El MTZ tiene un papel de adyuvante en el tratamiento de la enfermedad de Crohn. Sin embargo, podría no afectar el curso a largo plazo de la enfermedad. MTZ a una dosis de 250 mg 4 veces al día con ciprofloxacina 500 mg dos veces diarias ha sido útil para pacientes con la fase activa aguda de la enfermedad de Crohn.

#### f) Giardiasis

*G. lamblia* es un protozooario intestinal que causa una infección intestinal sintomática. Dependiendo de la respuesta inmune del huésped y la cepa de *G. lamblia*, el paciente puede ser asintomático, o tener un síndrome de diarrea crónica, malabsorción y pérdida de peso. Dosis grandes de MTZ, 6 0.25 g 3 veces al día por 7 días, han sido reportadas como efectivas para adultos, y dosis de 5 a 7.5 mg/kg 3 veces diarias por 7 días, para niños.<sup>4,5,46</sup>

#### g) Otros usos

El MTZ también es utilizado en el tratamiento de infecciones bacterianas anaeróbicas intra-abdominales, en abscesos cerebrales anaeróbicos (con un gran éxito), infecciones anaeróbicas del SNC; como profiláctico en cirugía de colon, cabeza y cuello; en infecciones dermatológicas como acné rosácea, acné vulgaris, dermatitis perioral y úlceras de decúbito; y colitis por *Clostridium difficile*.<sup>46</sup>

### IV. Interacciones farmacológicas

El MTZ es un inhibidor del CYP2C9 por lo que puede bloquear el metabolismo de los sustratos de esta isoenzima como son la tolbutamida, la S-warfarina, la fenitoína, el ibuprofen y el flurbiprofen.<sup>47</sup>

Se habla mucho de un efecto antabuse al ingerirse conjuntamente con alcohol, sin embargo, en una revisión reciente de la literatura de 1964 a 1999 realizada por Williams,<sup>48</sup> no encontró el reporte de tal interacción en las publicaciones de estos años salvo en contadas excepciones.

### V) Reacciones adversas

Los efectos adversos del MTZ raramente son lo suficientemente severos como para que causen la suspensión del tratamiento; los más comunes son cefalea, náusea, sequedad de la boca, y sabor metálico; ocasionalmente se presenta vómito, diarrea y dolor abdominal. Se han observado algunos efectos neu-

rotóxicos del MTZ: pueden aparecer mareo, vértigo y muy raramente, encefalopatía, convulsiones, incoordinación y ataxia. La reversibilidad de estas neuropatías puede ser lenta o incompleta. El MTZ está contraindicado en pacientes con enfermedad activa del SNC. La dosis debe ser disminuida en pacientes con enfermedad obstructiva del hígado o disfunción hepática, cirrosis alcohólica, o disfunción renal severa. También se ha reportado pancreatitis aguda concomitante al tratamiento con MTZ.<sup>49</sup>

a) *Teratogenicidad y embriotoxicidad*

Dada la facilidad que tiene el MTZ de atravesar la barrera placentaria, este medicamento presenta un potencial teratogénico y embriotóxico en ratones, ratas, conejos.<sup>50,51</sup> En humanos se ha mostrado que a dosis terapéuticas de MTZ, este fármaco no presenta aparentemente ningún peligro teratogénico serio.<sup>52,53</sup> De cualquier modo no se recomienda el tratamiento con MTZ durante el primer trimestre del embarazo.

b) *Carcinogenicidad*

El MTZ es un mutágeno en sistemas bacterianos, produciendo sustitución de pares de bases;<sup>1,39,54</sup> sin embargo, su mutagenicidad y actividad clastogénica en mamíferos es controvertida.<sup>1,54,55</sup>

Datos recientes, sin embargo, han mostrado que 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-<sup>55,58</sup> aunque varía la respuesta según los individuos. Existen suficientes evidencias para aceptar la actividad carcinogénica del MTZ en animales experimentales, produciendo linfomas, cáncer pulmonar y fibroadenomas mamarios y adenocarcinomas.<sup>59</sup> Al respecto, ya ha sido prohibido para uso veterinario en Alemania.<sup>60</sup>

Desde 1960 hasta la fecha se han llevado a cabo diferentes estudios en poblaciones humanas terapéuticamente expuestas al fármaco. Pese a que la mayoría de los datos son negativos, en un estudio de ellos el carcinoma broncogénico aumentó significativamente en el grupo que tomó metronidazol.<sup>64</sup> 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.<sup>59</sup>

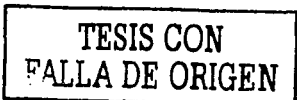
VII. Conclusión

El MTZ es un fármaco muy efectivo como antibiótico y antiparasitario aunque, como era de esperarse, la resistencia microbiana al fármaco -sobre todo en *H. pylori*-, es cada vez mayor. A pesar de su efectividad, el MTZ tiene un potencial carcinogénico claro en animales experimentales, pero hasta la fecha los estudios epidemiológicos no han sido concluyentes en humanos. Por lo tanto, son necesarios más estudios

que aclaren su capacidad cancerígena para humanos y la susceptibilidad individual al fármaco.

Referencias

1. Dobíás L, Cerná M, Rössner P et al. Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutat Res* 1994; 317: 177-194.
2. Cosar C, Julou L. Activité de l'(hydroxy-2-ethyl)-1-methyl-2-nitro-5-imidazole (8.823R.P.) vis-a-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis*. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1959; 96: 238-241.
3. Ralph ED, Darwish R, Austin TW et al. Susceptibility of *Trichomonas vaginalis* strains to metronidazole: response to treatment. *Sex Transm Dis* 1983; 10: 119-122.
4. Sears SD, O'Hare J. *In vitro* susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to 50 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 144-146.
5. Khambatta RB. Metronidazole in giardiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1971; 65: 487-489.
6. Jikipii L, Jikipii AM. *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to metronidazole and tinidazole. *J Infect Dis* 1980; 141: 317-325.
7. Powell SJ, McLeod I, Wilmont AJ, Elsdon-Drew R. Metronidazole in amoebic dysentery and hepatic liver abscess. *Lancet* 1966; 2: 1329-1331.
8. Mahajan RC, Chitkara NL, Vinayak VK. *In vitro* comparative evaluation of tinidazole and metronidazole strains of *Ectoparasitology*. *Indian J Pathol Bacteriol* 1974; 17: 226-228.
9. 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, penicillins, clindamycin and metronidazole in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 18: 235-241.
10. Appelbaum PC, Spangler SK, Jacobs MR.  $\beta$ -lactamase production and susceptibilities to amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis* *Bacteroides* isolates and 129 fusobacteria from 28 U.S. centers. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1546-1550.
11. Pavicic MJ, van Winkelhoff AJ, de Graaff J. *In vitro* susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetem comitans* to a number of antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2634-2638.
12. Freydiere AM, Gillie Y, Tiguand S et al. *In vitro* susceptibilities of 40 *Campylobacter fetus* subs. Jejun strains to niridazole and metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 145-146.
13. Lopez-Brea M, Martin E, Lopez-Lavid C et al. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to metronidazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10:1082-1083.
14. Moore RA, Beckthold B, Bryan LE. Metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*. *Can J Microbiol* 1995; 41: 746-749.
15. Frasser AG, Sim R, Sankey EA, Dhillon AP, Pounder RE. Effect of eradication on *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell proliferation. *Aliment Pharmacol Ther* 1994; 8: 167-173.
16. Jones BM, Geary I, Alawattegama AB et al. *In vitro* and *in vivo* activity of metronidazole against *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp* and *Mobiluncus ssp.* in bacterial vaginosis. *J Antimicrob Chemother* 1985; 16: 189-97.
17. Wexler HM, Finegold SM. *In vitro* activity of cefotetan compared with that of other antimicrobial agents against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 601-604.
18. Pankuch GA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Susceptibilities of 428 gram-positive and gram-negative anaerobic bacteria to Bay y3118 compared with their susceptibilities to ciprofloxacin, clindamycin, metronidazole, piperacillin, piperacillin-tazobactam and cefoxitin. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1649-1654.
19. Pranter C, Berto E, Scribano ML, Falasco G. Use of antibiotics in the treatment of active Crohn's disease: experience with metronidazole and ciprofloxacin. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30: 602-606.
20. Bleicher PA, Charles JH, Sober AJ. Topical metronidazole for rosacea. *Arch Dermatol* 1987; 123: 609-14.



21. Nielsen PG. Topical metronidazole gel: use in acne vulgaris. *Int J Dermatol* 1994; 30: 662-6.
22. Veien NK, Munkvad JM, Nielsen AO et al. Topical metronidazole in the treatment of perioral dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 258-60.
23. Wilson RL, Cramp WA, Ings RM. Metronidazole ("Flagyl"): mechanisms of radiosensitization. *Int J Radiat Biol* 1974; 26: 557-69.
24. Teicher BA, Herman TS, Shulman L, Bublely G, Coleman CN, Frei E. Combination of metronidazole with cyclophosphamide and platinum complexes. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; 28: 153-58.
25. Müller M. Mode of action of metronidazole on aerobic bacteria and protozoa. *Surgery* 1983; 93: 165-71.
26. Samuelson J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1533-41.
27. Bergan T, Arnold F. Pharmacokinetics of metronidazole in healthy volunteers after tablets and suppositories. *Chemotherapy* 1980; 26: 231-41.
28. Houghton GW, Smith J, Thorne PS et al. The pharmacokinetics of oral and intravenous metronidazole in man. *J Antimicrob Chemother* 1979; 5: 621-3.
29. Houghton GW, Thorne PS, Smith J et al. Plasma metronidazole concentrations after suppository administration. In: Philips Y, Collier J, editors. *Metronidazole: proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Infections*. Academic Press, New York, Royal Society of Medicine 1979: 41-44.
30. Ti TY, Lee HS, Khoo YM. Disposition of intravenous metronidazole in Asian surgical patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2248-51.
31. Cunningham FE, Kraus DM, Brubaker L et al. Pharmacokinetics of intravaginal metronidazole gel. *J Clin Pharmacol* 1994; 34: 1060-5.
32. Mattila J, Männistö PT, Mäntylä R et al. Comparative pharmacokinetics of metronidazole and tinidazole as influenced by administration route. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23: 721-5.
33. Schmadel K, McEvoy GK. Topical metronidazole: a new therapy for rosacea. *Clin Pharm* 1990; 9: 94-101.
34. Schwartz DE, Jeunet F. Comparative pharmacokinetics studies of ornidazol and metronidazole in man. *Chemotherapy* 1976; 22: 19-29.
35. Lau AH, Lam NP, Piscitelli SC. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin Pharmacokin* 1992; 23: 328-64.
36. Loft S, Dossing M, Poulsen H et al. Influence of dose and route of administration on disposition of metronidazole and its metabolites. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 30: 467-73.
37. Kokipii AM, Myllylä VV, Hokkanen E et al. Penetration of the blood barrier by metronidazole and tinidazole. *J Antimicrob Chemother* 1977; 3: 239-45.
38. Heisterberg L, Branerberg PE. Blood and milk concentrations of metronidazole in mothers and infants. *J Perinat Med* 1983; 11: 114-20.
39. Stambaugh JE, Feo LG, Manthei RW. The isolation and identification of the urinary oxidative of metronidazole in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1968; 161: 373-6.
40. Loft S. Metronidazole and antipyrine as probes for the study of foreign compound metabolism. *Pharmacol Toxicol* 1990; 66: 3-31.
41. Andersen M, Binderup M, Kiel P, Larsen H. Mutagenicity of metronidazole. *Arch Pharm Chem Sci Ed* 1982; 10: 25-44.
42. Rosenblatt JE, Edson RS. Metronidazole. *Mayo Clin Proc* 1983; 58:154-157.
43. Rowland IR. Factors affecting metabolic activity of the intestinal microflora. *Drug Metab Rev* 1988; 19: 243-61.
44. Bergan T, Throsteinsson SB. The pharmacokinetics of metronidazole and its metabolites in reduced renal function. *Chemotherapy* 1986; 32: 305-18.
45. Tu YH, Wang Y, Allen Jr LV, Albers DD, Gorgin MK. Pharmacokinetics of metronidazole administered intravenously to male rats. *Int J Pharmaceut* 1990; 61: 119-125.
46. 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* 1977; 12: 1002-8.
47. Knov V, Nord CE. Concentrations of tinidazole and metronidazole in serum saliva and alveolar bone. *J Antimicrob Chemother* 1982 10: suppl. A, 165-72.
48. Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. Metronidazole: a therapeutic review and uptake. *Drugs* 1997; 54: 679-708.
49. Goldstein JA, de Morais SMF. Biochemistry and molecular biology of the human CYP 2C subfamily. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 285-99.
50. Williams CS, Woodcock KR. Do ethanol and metronidazole interact to produce a disulfiram-like reaction? *Ann Pharmacother* 2000; 34: 255-7.
51. Eland IA, van Puijnenbroek EP, Sturkenboom MJ, Wilson JH, Stricker BH. Drug-associated acute pancreatitis: twenty-one years of spontaneous reporting in The Netherlands. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2417-22.
52. Bost RG. Metronidazole: toxicology and teratology. In: SM Finegold, editor. *metronidazole Proceedings of the International metronidazole Conference, Montreal, 1977: 126-31.*
53. Mudry MD, Martinez-Flores I, Palermo AM et al. Embryo lethality induced by metronidazole (MTZ) in *Rattus norvegicus*. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001; 21: 197-205.
54. Diav-Citrin O, Shechtman S, Gottciner T, et al. Pregnancy outcome after gestational exposure to metronidazole: A prospective controlled cohort study. *Teratology* 2001; 63: 186-92.
55. Caro-Paton T, Carvajal A, Martín de Diego I et al. Is metronidazole teratogenic? A meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 44: 179-82.
56. Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Eighth ed. 1992: 1004.
57. De Meo M, Vanelle P, Bernardini E, Laget M, Maldonado J, Jentzer O, Crozet MP, Dumencil G. Evaluation on mutagenic and genotoxic activities of 48 nitroimidazoles and related imidazole derivatives by the Ames test and the SOS chromotest. *Envir Mol Mut* 1992; 19: 167-70.
58. Fahrning 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* 1997; 395: 219-21.
59. Ostrosky-Wegman P, Lares I, Santiago P. Metronidazole hprt mutation induction in sheep and the relationship with its elimination rate. *Mutat Res* 1994; 307: 253-9.
60. Elizondo G, Gonscibait ME, Salzar AM, Lares I, Santiago P, Herrera J, Hong E, Ostrosky-Wegman P. Genotoxic effects of metronidazole. *Mutat Res* 1996; 370: 75-80.
61. Ré JL, De Meo MP, Laget M et al. Evaluation of the genotoxic activity of metronidazole and dimetridazole in human lymphocytes by the comet assay. *Mutat Res* 1997; 375: 147-55.
62. Reitz M, Rumpf M, Knitza R. Metronidazole induces DNA strand-breaks in cultures of human lymphocytes and phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Drug Res* 1991b; 41: 65-9.
63. Menéndez D, Rojas E, Herrera LA et al. DNA breakage due metronidazole treatment. *Mutat Res* 2001; 478:153-8.
64. IARC. Evaluation of carcinogenic risk to human. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France, 1987: Supp. 7.
65. Rustia M y Shubik P. Experimental induction of hepatomas, mammary tumors, and other tumors with metronidazole in noninbred Sas;MRC(W1)BR rats. *J Natl Can Inst* 1979; 63: 863-867.
66. WHO Pharmaceuticals Newsletters 3&4, World Health Organization 1998.
67. Beard CM, Noller KL, o'Fallon WM, Kurland L, Dockerty MB. Lack of evidence for cancer due to use of metronidazole. *N Engl J Med* 1979; 301: 519-22.
68. Danielson DA, Hannan MT, Jick H. Metronidazole and cancer. *J Am Med Assoc* 1982; 247: 2498-9.
69. Thapa PB, Whitlock JA, Brockman KG et al. Prenatal exposure to metronidazole and risk of childhood cancer. *Cancer* 1998; 83: 1461-8.
70. Beard CM, Noller KL, O'Fallon WM et al. Cancer after exposure to metronidazole. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 147-153.

**ANEXO 2**

# Is Metronidazole carcinogenic?

Andrés Bendesky<sup>1,2</sup>, Daniel Menéndez<sup>2</sup> and Patricia Ostrosky-Wegman<sup>2\*</sup>.

---

<sup>1</sup> Facultad de Medicina, <sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.

\* Corresponding author: Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. PO BOX 70228, Ciudad Universitaria, México D.F, 04510. México.  
Phone: (525)-6223846  
Fax: (525)-6223365  
E-mail: ostrosky@servidor.unam.mx



## **Abstract**

Metronidazole, an antiparasitic and antibacterial compound, is one of the world's most used drugs and one of the 100 most prescribed drugs in the United States. Metronidazole and one of its products of metabolism (an hydroxylated compound) are proven mutagens in bacterial systems –the latter being 10 times more mutagenic than the former– and have been shown to be genotoxic to human cells. Metronidazole is also an animal carcinogen and there is some epidemiological evidence that suggests that this drug might be carcinogenic for humans too. Nevertheless, some studies have yielded negative results in both genotoxic activity and cancer induction and a plausible explanation for these results is discussed here. Reviewed in this article too, are the known facts about the genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole, as well as the mechanisms that underlie its genotoxicity to mammalian cells.

## Introduction

Metronidazole (MTZ) is an antibacterial and antiprotozoal drug that has been in use for over 35 years. Nowadays it is one of the most used drugs worldwide, it is among the top 100 most prescribed drugs in the United States (data by IMS Health [1]) and one of the 10 most used drugs during pregnancy [2]. It appears in the Essential Drug List of the World Health Organization [3].

Metronidazole was introduced as a trichomonicide in Europe in 1959 by Cosar and Julou [4]. Since then, its clinical applications have been growing and it is now the principal treatment for *Helicobacter pylori* infections, amebiasis, giardiasis, trichomoniasis and Crohn's disease. It has also been extensively used to treat bacterial vaginosis and several other anaerobic bacterial infections and as a prophylactic antibiotic in surgical interventions. For a review about its clinical applications and characteristics see Freeman, 1996 [5].

According to the International Agency for Research on Cancer (IARC) [6], the evidence is sufficient to consider MTZ as an animal carcinogen, but insufficiently so for humans. This review deals with MTZ's genetic toxicity, as well as with the facts about its carcinogenic potential.

## **Mechanism of action as an antibiotic**

Metronidazole is active only against anaerobic organisms. It is activated when reduced through electron donation from ferredoxin or flavodoxin that were themselves reduced by the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (POR) [7], possibly forming an hydroxylamine [8]; this process occurs only under strongly reducing conditions [9]. Metronidazole is also activated in hypoxic cells of animals and hence it has been applied as a radiosensitizer of human tumors [10, 11]. Activated MTZ is thought to interact directly with DNA and the resultant complex can no longer function as an effective primer for DNA and RNA polymerases. This is the most widely held explanation of its toxic action on cells [12], but it has not yet been properly proved.

## **Human metabolism**

What follows is a short account of the pharmacokinetics of MTZ, focusing primarily on the oral and vaginal routes of administration. Metronidazole is readily absorbed in the intestinal mucosa. Its oral bioavailability is higher than 90 % and the maximal plasmatic concentrations ( $C_{max}$ ) after an oral dose of 500 mg range from 45 to 75  $\mu\text{mol/L}$  approximately [13]. There are some reports of concentrations as high as 240  $\mu\text{mol/L}$  [14], but with higher and multiple doses. Vaginal administration of a 500 mg formulation has yielded values of  $C_{max}$  from 7 to 12  $\mu\text{mol/L}$  [15-17].

Metronidazole is widely distributed in the human body, with steady-state volumes of distribution of 0.55-0.76 L/kg [18, 19]. It crosses the blood-brain barrier [20] and it has been found in placental tissue [21] and maternal milk [22, 23]. Metronidazole's half-life is about 8 hours and it is excreted primarily through the kidney.

The oxidation of the aliphatic side chains of MTZ in humans is the principal metabolic pathway. Both the parent compound and its oxidation products can also be conjugated with glucuronic acid. Metronidazole is metabolized by the human liver through the cytochrome P450 (CYP) family of enzymes. There are very few reports about the hepatic biotransformation of MTZ, the last articles having been published 10 years ago by Loft [24, 25]. In these studies he observed that the biotransformation of MTZ yields two principal metabolites: an hydroxylated metabolite (HM) which represents 40% of the urinary excretion of a dose of MTZ and an acetylated metabolite (AAM) which accounts for 15%. There was an interindividual variation of 14 % in the amount of metabolites formed. It was also found that the ingestion of ethanol correlated with a higher hydroxylation of MTZ, a fact that might involve the CYP2E1 as a possible metabolizer, since this CYP is induced by ethanol. Besides, after the administration of phenobarbital (an inducer of CYP's of the families 2B, 2C and 3A) to healthy subjects, it was observed that the metabolism of MTZ was also elevated. Alternatively, Loft suggested as well that MTZ is an *in vitro* substrate of CYP1A1, and that due to the biphasic kinetics of its biotransformation MTZ is hydroxylated by at least two different CYP's, and

proposes CYP1A1 and CYP2E1 as possible candidate enzymes. In spite of this the identity of the participant CYP's has not been determined to date.

## **Genotoxicity**

Genotoxic activity of MTZ has been intensively studied in different *in vivo* and *in vitro* assays. Particularly short-term tests of genetic effects reveal an apparent contradiction in the literature [26, 27]. Some of the studies performed in human systems are summarized in Table 1.

Metronidazole, as well as HM are mutagenic in bacterial systems inducing mainly base pair substitutions [28-30]. The hydroxy metabolite has proved to be ten times more potent than MTZ in the Ames test with *S. typhimurium* TA1535 [31]. Increased mutagenicity has been observed after microsomal activation [28]. Metronidazole and its metabolites isolated from the urine of patients increased gene mutations in bacteria [31, 32]. Although MTZ did not induce mutations in V79 mammalian cells [33], another study has suggested that MTZ is also mutagenic in mammals *in vivo* as tested by Ostrosky and co-workers [34] through the hprt assay. In this study, 9 sheep were treated with MTZ human therapeutical doses (1 g / day for 10 days) and found no significant mutation induction as a group, but rather an exponential relationship between steady-state plasma concentrations of the drug and the mutated lymphocytes frequency. So those animals with the slowest elimination rates of MTZ were the ones with the highest mutation rates.

Regarding to the induction of DNA strand breaks, Reitz et al [35] studied 10 female patients with *Trichomonas vaginalis* infection who were treated with 3 x 400 mg MTZ / day for 4 days and analyzed their lymphocytes for DNA single strand breaks (ssb) using the Fluorescence Analysis of DNA Unwinding method (FADU). They found that MTZ induces DNA ssb and a statistically significant difference of mean values before and immediately after therapy, but the values 7 days after therapy were similar to those before treatment. In a similar approach, Menéndez and co-workers [36] using the alkaline version of the single cell gel electrophoresis (SCG, 'comet') assay, evaluated the amount of ssb and 'alkali labile'-sites of the DNA in 10 healthy subjects treated with 3 x 500 mg MTZ / day for 10 days. The results showed a significant increase in DNA damage in 9 out of 10 individuals one day after the end of treatment, a damage that tended to recovery in a blood sample taken 14 days later. Another relevant finding was that the plasmatic concentrations of MTZ inversely correlated with the amount of DNA damage. Thus, the subjects with the highest concentrations of the drug had the least amount of damage. The authors suggested that the DNA breaks could be generated by the oxidative metabolites of MTZ rather than by the parent compound itself.

Fahrig and Engelke [37] arrived at different results when using the comet assay under alkaline conditions. They used lymphocytes of MTZ-treated patients with different infections (3 x 500 to 3 x 750 mg / day for 5 days), and examined 400 nuclei per patient immediately before the first application and 30 min to 2 h after the last one, finding no differences in DNA damage before and after treatment.

Although certain studies in murine cells have yielded some positive results concerning the induction of SCE [38], reports on human cells have been negative [39]. The evaluation of chromosomal aberrations (CA) in human lymphocytes has also been contradictory. Elizondo et al [40], studying 10 healthy men aged 18-25 receiving therapeutic doses of MTZ, 3 x 500 mg p.o. / day for 10 days, found significant increases in the frequency of chromatid and isochromatid breaks after the treatment, in the percentage of cells with aberrations and in the frequency of CA per cell. A relevant outcome was the existence of a linear correlation between CA and the replication index of the cells (a measure of the rate of cell proliferation). The subjects with higher proliferation kinetics after treatment were those with a higher number of CA. One would anticipate cells with greater damage to stop proliferating in order to repair the genotoxic insult. Their unexpected finding could be due to a shorter cell cycle (induced by MTZ) and thus less time to remove DNA damage as the authors themselves suggested, or alternatively to an increased probability of appearance of CA in a cell that is dividing more rapidly.

Mudry and co-workers [41] conducted several tests to measure the genotoxicity of MTZ. In the CHO cell line they used the anaphase-telophase test looking for abnormal anaphases. On human lymphocytes they carried out the CA tests and the cytokinesis blocked micronucleus assay. On CFW mice they tested the induction of micronuclei in bone marrow. In all of those tests at all applied doses a significant genotoxic effect was found.

Mitelman et al [42] studied 15 patients with Crohn's disease under treatment with 200-1200 mg MTZ / day for 1 to 24 months with a mean of 10 months, and compared their CA with seven other patients with Crohn's disease not treated with MTZ (he offered no specification of whether these were receiving an alternative treatment) and also with 10 healthy controls. They found a significant increase in the CA frequency in the treated patients (2.63 % of breaks + exchanges [BE]) compared with any of the other two groups (0.79 % BE in untreated Crohn's and 0.80 % BE in controls). In a second study they reported that MTZ in a long-term treatment does not show any clastogenic effect [43]. Two groups of Crohn's disease patients (22 individuals) were included in a double-blind cross-over study, one of the groups receiving MTZ 0.8 g daily for 4 months and then 4 months of sulphasalazine 3 g daily, and the other group receiving the drugs in an inverse order. The conclusions, i.e. that MTZ at daily doses of 0.8 g for 4 months is not clastogenic as measured from lymphocytes from Crohn's patients, are to be taken with care. The statistical data "showed no significant change in the mean yield for any aberration type or combination of aberration types..." but if we look at the individual data, we observe that some of the patients receiving MTZ, show a clear increase in the CA with respect to their own basal values at the start of the study. This indicates that the sensitivity to MTZ varies between individuals and that this should be taken into account in further studies. Although the authors did not find a correlation between plasma MTZ concentration and cytogenetic damage, the MTZ's-metabolites concentrations might be more appropriate than the parent compound itself for correlations with DNA damage. Besides, treatment compliance



was not evaluated and the data for some of the patients (including the basal values for one of them) is missing.

## **Carcinogenicity**

### *Animal*

The potential of MTZ to induce cancer has been a matter of debate since Rustia and Shubik [44] reported the induction of tumors in mice by this compound. Using Swiss mice they observed a significant increase of lung tumors (males developing it even more than females) and of malignant lymphomas in females only. This study was contested a few years later by Roe [45] because food intake was not controlled and since MTZ can affect the gut flora, the nutritional status might change altering the incidence of tumors. A few years later, Rustia and Shubik, [46] reported the induction of tumors in rats with MTZ. In this case, females developed hepatomas and mammary tumors, and in males, the number of pituitary and testicular tumors was elevated. Later on, Cavaliere et al [47], using BALB/c mice reported the induction of lung tumors in males and of lymphomas in females, further establishing MTZ's carcinogenicity in animals. Then again, Cavaliere et al [48] observed an induction of mammary tumors in Sprague-Dawley rats by MTZ.

There is sufficient evidence to consider MTZ as an animal carcinogen. In this regard, the IARC has classified MTZ as an animal carcinogen. Germany has already prohibited MTZ for veterinary use while further studies are being carried out [49].

### *Human*

Data on MTZ carcinogenicity for humans is ambiguous. In one of the first studies, Beard and her group [50] analyzed 771 women who had been treated with MTZ (750 or 500 mg / day for 10 days either orally or vaginally). The mean observation period was 11 years from date of first exposure to date of publication [51]. Beard found that cancer in almost all the sites of appearance had increased in the treated group, although most of them were not significant. The only high and significant increase was in lung cancer (4 observed vs. 0.6 expected, RR 6.7, 95% CI 1.8-17.2). She suggested that the higher incidence in lung cancer might have been due to the fact that all of the subjects were smokers and that three of them were over 60 years of age. This argument was later criticized [52] because it was speculated rather than proved. Nine years later, after following the same patients for up to 15 to 25 years, Beard's group [53] found that the standardized morbidity ratios (SMR) for bronchogenic carcinoma, breast cancer, melanoma, cancer of the thyroid, bladder, brain, and kidney, multiple myeloma, nasopharyngeal and oropharyngeal cancer, were greater than 1.0, yet only cancer of the lung was significantly elevated (12 observed vs. 3.5 expected, SMR 3.4, 1.8-5.9). After adjusting for smoking habits, the SMR was lowered to 2.5 with a 95% CI of 1.3-4.4. They concluded that there

was an excess of bronchogenic carcinoma among the exposed group and that MTZ is possibly a risk factor for lung cancer.

Regardless of the fact that the authors found an association between MTZ exposure and lung cancer, one major issue is the lack of information about the administration route and of compliance with the treatment. This is a very important matter, since the absorption (and consequently the systemic distribution) of the vaginal suppositories is much lower than the tablets taken orally (at least 5-fold lower [15-17, 54]), so the number of exposed individuals could be overestimated and thus the relative risk of developing cancer after exposure to MTZ could be calculated as lower than it actually is.

In 1980 Friedman and Ury [55] conducted a screening of carcinogenicity of many drugs. They collected the records of all the prescriptions dispensed to the members of the Kaiser Permanente Medical Care Program between 1969 and 1973 and correlated them with the cancer cases of the cohort up to 1976. Only 2460 persons used metronidazole, and the follow-up period was at the most 7.5 years but in many cases could have been much shorter. The only excess risk of cancer was in the uterine cervix (23 observed vs. 8.3 expected, RR 2.8,  $P < 0.002$ ), but this was attributed to "an artifact due to the association of vaginitis with cervical cancer". As the authors suggested, these findings may be incorrect mainly due to the short follow-up interval, but also because of the lack of more information on patient characteristics and of compliance with treatment.

Two years later, in a letter addressed to the Journal of the American Medical Association, Danielson et al [56] reported a follow-up study of 12,000 users of MTZ in relation to the subsequent development of certain cancers. Persons exposed to MTZ were those who filled a prescription between 1977 and 1979 and the cases were included if they were diagnosed from July 1977 through December 1979. No risk was observed for MTZ use. Again, the longest period of follow-up was at most 2.5 years, which is obviously too short to demonstrate any carcinogenic effect of the drug; the time lag for many chemical carcinogens is up to 20 to 30 years [57]! Besides, being this a letter and not a formal research article not much can be concluded from this work.

Krause et al [58] reported 3 patients with Crohn's disease that developed a malignancy (two breast and one cholangiocarcinoma) at an early age (27-32 years of age), although case reports are hardly useful in determining an association between exposure and disease.

In 1998 the results from a follow-up of the Group Health Cooperative (GHC) of Puget Sound, Seattle were published [59]. 5222 MTZ treated/untreated pairs both members having >7, >12 and >15 years of cancer-free follow-up were analyzed. Statistical analysis did not reveal any increase in the cancer incidence of the treated group; however, if we look at the cancer incidence in the treated/untreated pairs through time, we see that they begin too close together and diverge to the 15 years of follow-up and that the relative risk (RR) also increases with time (Figure 1), without reaching a significant value for any period. If this group were to be

followed up for a longer time (20-25 years) it would have possibly achieved statistical significance. Besides, this paper has some major disadvantages making it difficult to draw any conclusions: lack of data about dose, duration, route of administration and compliance with treatment; lack of information on possible exposure to MTZ before enrollment in the GHC or during a patient hospitalization; and the small number of subjects with prolonged exposure to MTZ (608 pairs in the 15 years subgroup).

A retrospective study of cancer in children younger than 5 years [2] in a cohort of 328,846 children born to women enrolled in Tennessee Medicaid during their pregnancy gave negative results on cancer incidence of all sites in children who had been exposed to MTZ *in utero* (RR 0.81; 95% CI, 0.41-1.59). There was a 2.5-fold increase in the risk of neuroblastoma (RR 2.60; 95% CI, 0.89-7.59) nevertheless it was not statistically significant. The two major limitations of this study are the lack of information on compliance to treatment, and the loss of some cases due to migration out of state, since the cases considered were those reported in a Tennessee hospital and included in the Tennessee Childhood Cancer Database. The authors themselves suggested a relationship between MTZ treatment and neuroblastoma, which needed further study.

An epidemiological evaluation of MTZ [ 6 ], based on the report by Beard [50] and those of Friedman and Danielson, resulted to be insufficient to consider this drug as a human carcinogen. It should be remarked that these studies had a very brief follow-up period. A new evaluation will have to take into account the second work

by Beard and co-workers [53], since it had a longer follow-up of the same patients and demonstrated an increased and significant risk of lung cancer after 15 to 25 years of treatment with MTZ. Consideration should also be given to Thapa [2] in which an increased risk for neuroblastoma was observed among the children exposed to MTZ during fetal life.

### **Mechanism of DNA damage by metronidazole**

There are several hypotheses that try to explain MTZ genotoxicity to aerobic cells. One of them deals with its nitroreduction, another with the bacterial metabolism in the gut and the last one with the involvement of an oxidative metabolite as responsible for the DNA damage.

#### *a) Nitroreduction hypothesis*

Nitroimidazoles are preferentially cytotoxic to hypoxic cells [60]. As already mentioned, anaerobic organisms reduce MTZ and activate it in this way. In mammalian cells reduction of the nitro group of 2-nitroimidazoles (MTZ is a 5-nitroimidazole) is mediated by NADH, xanthine oxidase, NADPH cytochrome P450 reductase and NADPH cytochrome *c* reductase [60]. A summary of the reactions is depicted in Figure 2.

It has been found that DNA helix destabilization and strand breakage induced by reduced nitroimidazoles is related to high content of A+T bases [60]. Metronidazole can be reduced by xanthine oxidase to seven products, but the synthetic amine derivative of MTZ has been found to be inactive [60].

Electrolytically reduced MTZ (the specific nature of the molecule is not known) produces extensive DNA damage by loss of helix conformation, strand breakage and possibly by the alteration of bases [61].

Since the reduction of MTZ in humans is very small if at all, this mechanism of DNA damage is probably not the one occurring in humans.

#### *b) Bacterial activation hypothesis*

When MTZ is incubated anaerobically with rat cecal contents, it is metabolized to acetamide in yields of 8-15 % and to *N*-(2-hydroxyethyl)-oxamic acid (HOA) in much lower quantities (6-9 fold less) [62] (Figure 3). 1.3 to 1.8 % of a 200 mg/kg doses of MTZ in rats is recovered as acetamide in the urine and 0.9 to 2.4 % in the feces, which seems to depend in the bacterial population of the intestine, since in germfree rats no acetamide is recovered either in their urine or feces [62]. Acetamide is a liver carcinogen for rats [6, 63, 64] and mice [64], and possibly for humans [65], although there is no epidemiological data available. Thus, this could be the way through which MTZ causes cancer in rodents. Later on, Koch et al [66] reported the appearance of acetamide and HOA in the urine of patients being

treated with MTZ (750 mg / day, not reported for how long). The recovery of acetamide and HOA was of approximately 1 to 2 % of the dose, a yield similar to that observed in the rat, but the authors argued that a patient is probably exposed to 10-fold more acetamide than what is actually recovered in his urine because some of it is lost by mammalian metabolism.

### *c) Aerobic biotransformation hypothesis*

The vast majority of MTZ is metabolized in the human to 2 principal metabolites: 1-(2-hydroxyethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole (HM) and 1-acetic acid-2-methyl-5-nitroimidazole (AAM) to yields of approximately 40 and 15-20% respectively [25, 67].

In 1975 Legator et al [68] reported that the mutagenicity of the urine of 6 female patients treated with MTZ (3 x 250 mg p.o. / day for 10 days) was significant when the urine was sampled on day 6, 8 or 9 of therapy. Nevertheless, the identity of the metabolites was not established and hence the mutagenicity could be attributed to the oxidative metabolites as well as to acetamide, although this latter compound is found in much lower quantities than either of the oxidative metabolites (40-fold less than HM approximately). One year later Speck [69] evaluated the metabolites of MTZ separated by chromatography from the urine of patients receiving this drug and found mutagenic activity for HM and AAM. It has been observed that the degree of mutagenic activity is 7 to 85 times higher in the urine of patients treated with MTZ compared to the controls [31]. In a recent study from our group



(submitted), HM was found to induce MN in cell lines with a functional P53 (the guardian of the genome, a tumor suppressor gene) (RKO and HeLa), and both MTZ and HM induced MN in cell lines with a deficient P53 (RKO-E6, C33-A and Jurkat). Besides, P53 protein levels also increased in the cell lines treated with HM, a very important finding since an induction of P53 has been suggested as an early biomarker of DNA damage [70].

This is most probably the correct hypothesis (shown in Figure 4), since the nitroreduction products of MTZ are very short-lived and these products together with acetamide and HOA are formed in too small amounts to account for the carcinogenicity of MTZ. Besides, HM which is formed in much larger quantities is also mutagenic in bacterial systems and genotoxic to human cells as measured through the MN assay and the induction of P53.

## Conclusion

Whether MTZ is carcinogenic for humans is still an open and important question due to the extensive use of this drug. There is a lack of a large cohort of people treated with MTZ to be followed up for a long period of time (which the available data suggests it would be at least 20 years), to clearly establish the risk that MTZ treatment carries with it. It also remains to be determined which of the mechanisms of genotoxicity hypotheses is correct. If the aerobic biotransformation hypothesis were valid, the metabolism of the drug by an individual would be very important. This is so, because approximately 40% of drug metabolism dependent on CYP's is carried out by polymorphic enzymes [71]. Since HM is more genotoxic than MTZ itself, the broad interindividual differences in MTZ metabolism could in part account for the individual susceptibility to the development of cancer induced by MTZ.

## References

- [1] Rxlist [www.rxlist.com/top200.htm](http://www.rxlist.com/top200.htm) (1999)
- [2] P.B. Thapa, J.A. Whitlock, K.G. Brockman Worrell, P. Gideon, E.F. Mitchel Jr, P. Roberson, R. Pais and W.A. Ray, Prenatal exposure to metronidazole and risk of childhood cancer: a retrospective cohort study of children younger than 5 years, Cancer 83 (1998) 1461-1468.
- [3] World Health Organization, Essential Drugs, WHO Drug Information 13 (1999) 249-262.
- [4] C. Cosar, L. Julou, Activitiè de 1'(hydroxy-2-ethyl)-1-methyl-2-nitro-5-imidazole (8.823R.P.) vis-a-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis*, Ann. Inst. Pasteur (Paris) 96 (1959) 238-241.
- [5] C.D. Freeman, N.E. Klutman and K.C. Lamp, Metronidazole. A therapeutic review and update, Drugs 54 (1997) 679-708.
- [6] IARC, Evaluation of carcinogenic risk to humans. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. Suppl. 7 (1987) 250-251.
- [7] K.M. Land and P.J. Johnson, Molecular mechanisms underlying metronidazole resistance in trichomonads, Exp. Parasitol. 87 (1997) 305-308.
- [8] R.M. Ings, J.A. McFadzean and W.E. Ormerod, The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other micro-organisms, Biochem. Pharmacol. 23 (1974) 1421-1429.
- [9] J. Samuelson, Why metronidazole is active against both bacteria and parasites, Antimicrob. Agent. Chemother. 43 (1999) 1533-1551.
- [10] M.B. Roy, P.C. Mandal and S.N. Bhattacharyya, Radiosensitization of thymine by copper(II) and nickel(II) complexes of metronidazole, Int. J. Radiat. Biol. 69 (1996) 471-480
- [11] R.L. Willson, W.A. Cramp, R.M. Ings, Metronidazole ('Flagyl'): mechanisms of radiosensitization, Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 26 (1974) 57-69.
- [12] M. Müller, Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa, Surgery 93 (1983) 165-171.
- [13] I. Amon, K. Amon, G. Franke, C. Mohr, Pharmacokinetics of metronidazole in pregnant women, Chemother. 27 (1981) 73-79.
- [14] I. Amon, K. Amon, H. Hüller, Pharmacokinetics and therapeutic efficacy of metronidazole at different dosages, Int. J. Clin. Pharmacol. 16 (1978) 384-386.
- [15] C. Hoffmann, N. Focke, G. Franke, M. Zschiesche and W. Siegmund, Comparative bioavailability of metronidazole formulations (Vagimid) after oral and vaginal administration, Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 33 (1995) 232-239.
- [16] I.G. Salas-Herrera, M. Lawson, A. Johnston, P. Turner, D.M. Gott and M.J. Dennis Plasma metronidazole concentrations after single and repeated vaginal pessary administration, Br. J. Clin. Pharmacol. 32 (1991) 621-623.

- [17] M.M. Alper, N. Barwin, W.M. McLean, I.J. McGilveray and S. Sved, Systemic absorption of metronidazole by the vaginal route, Obstet. Gynecol. 65 (1985) 781-784.
- [18] T.Y. Ti, H.S. Lee and Y.M. Khoo, Disposition of intravenous metronidazole in Asia surgical patients, Antimicrob. Agents Chemother. 40 (1996) 2248-2251.
- [19] A.H. Lau, N.P. Lam, S.C. Piscitelli, L. Wilkes and L.H. Danziger, Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives, Clin. Pharmacokinet. 23 (1992) 328-364.
- [20] A.M. Jokipii, V.V. Myllyla, E. Hokkanen and L. Jokipii, Penetration of the blood barrier by metronidazole and tinidazole, J. Antimicrob. Chemother. 3 (1977) 239-245.
- [21] A.A. Visser and H.K. Hundt, The pharmacokinetics of a single intravenous dose of metronidazole in pregnant patients; J. Antimicrob. Chemother. 13 (1984) 279-283.
- [22] C.M. Passmore, J.C. McElnay, E.A. Rainey and P.F. D'Arcy, Metronidazole excretion in human milk and its effect on the suckling neonate, Br. J. Clin. Pharmacol. 26 (1988) 45-51.
- [23] L. Heisterberg and P.E. Branbjerg, Blood and milk concentrations of metronidazole in mothers and infants. J. Perinat. Med. 11 (1983) 114-120.
- [24] S. Loft, S.V. Otton, M.S. Lennard, G.T. Tucker and H.E. Poulsen, Characterization of metronidazole metabolism by human liver microsomes, Biochem. Pharmacol. 41 (1991) 1127-1134.
- [25] S. Loft, Metronidazole and antipyrindine as probes for the study of foreign compound metabolism. Pharmacol. Toxicol. 66 Suppl. VI (1990) 1-31.
- [26] L. Dobiás, M. Cerna, P. Rosner, R. Sram, Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole, Mutat. Res. 317 (1994) 177-194.
- [27] C.E. Voogd, On the mutagenicity of nitroimidazoles, Mutat. Res. 86 (1981) 243-277.
- [28] M. De Meo, P. Vanelle, E. Bernadini, M. Laget, J. Maldonado, O. Jentzer, M.P. Crozet and G. Dumenil, Evaluation of the mutagenic and genotoxic activities of 48 nitroimidazoles and related imidazole derivatives by the Ames test and the SOS chromotest, Environ. Mol. Mutagen. 19 (1992) 167-181.
- [29] G. Cantelli-Forti, G. Aicardi, M.C. Guerra, A.M. Barbaro and G.L. Biagi, Mutagenicity of a series of 25 nitroimidazoles and two nitrothiazoles in *Salmonella typhimurium*, Teratog. Carcinog. Mutagen. 3 (1983) 51-53.
- [30] J.B. Chin, D.M. Sheinin and A.M. Rauth, Screening for the mutagenicity of nitro-group containing hypoxic cell radiosensitizers using *Salmonella typhimurium* strains TA100 and TA98, Mutat. Res. 58 (1978) 1-10.
- [31] T.H. Connor, M. Stoeckel, J. Evrad and M.S. Legator, The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans and mice, Cancer Res. 37 (1977) 629-633.
- [32] C.E. Voogd J.J. Van der Stel, J.J. Jacobs, The mutagenic action of nitroimidazoles I. Metronidazole, nimoridazole, dimetridazole and ronidazole, Mutat. Res. 26 (1974) 483-490.
- [33] J. Dayan, M.C. Crajer and S. Deguingand, Mutagenic activity of 4 active-principle forms of pharmaceutical drugs. Comparative study in the *Salmonella*

- typhimurium microsome test, and the HGPRT and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase systems in cultured mammalian cells, Mutat. Res. 102 (1982) 1-12.
- [34] P. Ostrosky-Wegman, I.L. Asseff, P. Santiago, G. Elizondo and R. Montero, Metronidazole hprt mutation induction in sheep and the relationship with its elimination rate, Mutat. Res. 307 (1994) 253-259.
- [35] M. Reitz, M. Rumpf and R. Knitza, DNA single strand-breaks in lymphocytes after metronidazole therapy, Drug Res. 41 (1991) 155-156.
- [36] D. Menéndez, E. Rojas, L.A. Herrera, M.C. López, M. Sordo, G. Elizondo and P. Ostrosky-Wegman, DNA breakage due to metronidazole treatment, Mutat. Res. 478 (2001) 153-158.
- [37] R. Fahrng and M. Engelke, Reinvestigation of *in vivo* genotoxicity studies in man. I. No induction of DNA strand breaks in peripheral lymphocytes after metronidazole therapy, Mutat. Res. 395 (1997) 219-221.
- [38] S.B. Neal and G.S. Probst, Assessment of sister chromatid exchange in spermatogonia and intestinal epithelium in Chinese hamster, Basic Life Sci. 29 (1984) 613-628.
- [39] B. Lambert, A. Lindblad and V. Ringborg, Absence of genotoxic effects of metronidazole and two of its urinary metabolites of human lymphocytes *in vitro*, Mutat. Res. 67 (1979) 281-287.
- [40] G. Elizondo, R. Montero, J.E. Herrera, E. Hong and P. Ostrosky-Wegman, Lymphocyte proliferation kinetics and sister-chromatid exchanges in individuals treated with metronidazole, Mutat. Res. 305 (1994) 133-137.
- [41] M.D. Mudry, M. Carballo, M. Labal de Vinuesa, M. González Cid and I. Larripa, Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs: III. Metronidazole (MTZ), Mutat. Res. 305 (1994) 127-132.
- [42] F. Mitelman, B. Hartley-Asp and B. Ursing, Chromosome aberrations and metronidazole, Lancet 2 (1976) 802.
- [43] F. Mitelman, B. Strombeck, B. Ursing, O. Nordle, B. Hartley-Asp, Metronidazole exhibits no clastogenic activity in a double blind cross over study on Crohn's patients, Hereditas 96 (1982) 280-285.
- [44] M. Rustia and P. Shubik, Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole, J. Natl. Cancer Inst. 48 (1972) 721-729.
- [45] F.J.C. Roe, Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential, Surgery 93 (1983) 158-164.
- [46] M. Rustia and P. Shubik, Experimental induction of hepatomas, mammary tumors and other tumors with metronidazole in noninbred Sas:MRC/W1/BR rats, J. Natl. Cancer Inst. 63 (1979) 863-867.
- [47] A. Cavaliere, M. Bacci, A. Amorosi, M. Del Gaudio and R. Vitali, Induction of lung tumors and lymphomas in BALB/c mice by metronidazole, Tumori. 69 (1983) 379-382.
- [48] A. Cavaliere, M. Bacci and R. Vitali, Induction of mammary tumors with metronidazole in female Sprague-Dawley rats, Tumori. 70 (1984) 307-311.
- [49] World Health Organization, WHO Pharmaceuticals Newsletters 3&4 (1998) 15.
- [50] C.M. Beard, K.L. Noller, W.M. O'Fallon, L.T. Kurland and M.B. Dockerty, Lack of evidence for cancer due to use of metronidazole, N. Engl. J. Med. 301 (1979) 519-522.

- [51] F.E. Mirer and M.A. Silverstein, Cancer after metronidazole. Correspondence, New Engl. J. Med. 302 (1980) 519-520.
- [52] J.F. Haas, Cancer after metronidazole. Correspondence, N. Engl. J. Med. 302 (1980) 520.
- [53] C.M. Beard, K.L. Noller and W.M. O'Fallon, L.T. Kurland and D.C. Dahlin, Cancer after exposure to metronidazole, Mayo Clin. Proc. 63 (1988) 147-153.
- [54] B. Fredricsson, B. Hagstrom, C.E. Nord and A. Rane, Systemic concentrations of metronidazole and its main metabolites after intravenous oral and vaginal administration, Gynecol. Obstet. Invest. 24 (1987) 200-207.
- [55] G.D. Friedman and H.K. Ury, Initial screening for carcinogenicity of commonly used drugs, J. Natl. Cancer Inst. 65 (1980) 723-733.
- [56] D.A. Danielson, M.T. Hannan and H. Jick, Metronidazole and cancer, J. Am. Med. Assoc. 247 (1982) 2498-2499.
- [57] M. Taningher, D. Malacarne, A. Izzotti, D. Ugolini and S. Parodi, Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility, Mutat. Res.
- [58] J.R. Krause, H.Q. Ayuyang and L.D. Ellis, Occurrence of three cases of carcinoma in individuals with Crohn's disease treated with metronidazole, Am. J. Gastroenterol. 80 (1985) 978-982.
- [59] M.E. Falagas, A.M. Walker, H. Jick, R. Ruthazer, J. Griffith, D.R. Snyderman, Late incidence of cancer after metronidazole use: a matched metronidazole user/nonuser study, Clin. Infect. Dis. 26 (1998) 384-388.
- [60] D.I. Edwards, Reduction of nitroimidazoles *in vitro* and DNA damage, Biochem. Pharmacol. 35 (1986) 53-58.
- [61] R.C. Knight, I.M. Skolimowski and D.I. Edwards, The interaction of reduced metronidazole with DNA, Biochem. Pharmacol. 27 (1978) 2089-2093.
- [62] R.L. Koch, E.J. Chrystal, B.B. Beaulieu Jr. and P. Goldman, Acetamide—a metabolite of metronidazole formed by the intestinal flora, Biochem. Pharmacol. 28 (1979) 3611-3615.
- [63] B. Flaks, M.T. Trevan and A. Flaks, An electron microscope study of hepatocellular changes in the rat during chronic treatment with acetamide. Parenchyma, foci and neoplasms, Carcinogenesis 4 (1983) 1117-1125.
- [64] R.W. Fleischman, J.R. Baker, M. Hagopian, G.G. Wade, D.W. Hayden, E.R. Smith, J.H. Weisburger and E.K. Weisburger. Carcinogenesis bioassay of acetamide, hexanamide, adipamide, urea and P-tolylurea in mice and rats, J. Environ. Pathol. Toxicol. 3 (1980) 149-170.
- [65] IARC, Evaluation of carcinogenic risk to humans, International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. 71 (1999) 1211.
- [66] R.L. Koch, B.B. Beaulieu, E.J. Chrystal and P. Goldman, A metronidazole metabolite in human urine and its risks, Science 211 (1981) 398-400.
- [67] J.E. Stambaugh, L.G. Feo, and R.W. Manthei The isolation and identification of the urinary oxidative metabolites of metronidazole in man, J. Pharmacol. Exp. Ther. 161 (1968) 373-381.
- [68] M.S. Legator, T.H. Connor, M. Stoeckel, Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of humans and mice, Science 188 (1975) 1118-1119.

- [69] W.T. Speck, A.B. Stein, and H.S. Rosenkranz, Mutagenicity of metronidazole: presence of several active metabolites in human urine, J. Natl. Cancer Inst. 56 (1976) 283-284.
- [70] J. Yang and P. Duerksen-Hughes, A new approach to identifying genotoxic carcinogens: p53 induction as an indicator of genotoxic damage, Carcinogenesis 19 (1998) 1117-1125.
- [71] M. Ingelman-Sundberg, M. Oscarson, and R.A. McLellan, Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment, Trends Pharmacol. Sci. 20 (1999) 342-349.
- [72] F. Salamanca, G. Castañeda, J. Farfán, MC Santillán, O. Muñoz and S. Armendares, Chromosome studies of bone marrow cells from metronidazole treated patients, Ann. Genet. 23 (1980) 63-64.
- [73] G. Elizondo, M.E. Gonsebatt, A.M. Salazar, I. Lares, P. Santiago, J. Herrera, E. Hong and P. Ostrosky-Wegman, Genotoxic effects of metronidazole, Mutat. Res. 370 (1996) 75-80.
- [74] J.L. Ré, M.P. De Méo, M. Laget, H. Guiraud, M. Castegnaro, P. Vanelle and G. Dumenil, Evaluation of the genotoxic activity of metronidazole and dimetridazole in human lymphocytes by the comet assay, Mutat. Res. 375 (1997) 147-155.
- [75] M. Reitz, M. Rumpf and R. Knitza, Metronidazole induces DNA strand-breaks in cultures of human lymphocytes and phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes, Drug Res. 41 (1991) 65-69.
- [76] A. Martelli, A. Allavena, L. Robbiano, F. Mattioli and G. Brambilla, Comparison of the sensitivity of human and rat hepatocytes to the genotoxic effects of metronidazole, Pharmacol. Toxicol. 66 (1990) 329-334.





Table 1. Human genotoxic studies of MTZ

Subject of study <sup>1</sup>	Assay performed	Results	Comments	Reference
15 patients of Crohn's disease	CA in L	<input type="checkbox"/> in CA frequency compared to healthy controls	Some of the patients were concurrently treated with sulphasalazine	[42]
DBCOS <sup>2</sup> of 22 patients of Crohn's disease	CA in L	No increase in CA after treatment as a group	Several individuals showing large increases in their CA	[43]
10 MTZ treated children	CA in bone marrow	No increase in CA after treatment		[72]
10 healthy volunteers	CA <sup>6</sup> in L	<input type="checkbox"/> Chromatid and isochromatid breaks	Linear correlation between chromosomal aberrations and replication index	[73]
		<input type="checkbox"/> Percentage of cells with aberrations		
2 healthy volunteers	CA and CBMN <sup>8</sup> in L	<input type="checkbox"/> Frequency of chromosomal aberrations per cell		[41]
One volunteer	SCG <sup>1</sup> L, pH=10	<input type="checkbox"/> In both assays		
		<input type="checkbox"/> Tail moment	The genotoxic effect was reduced when S9 mix or antioxidants such as 8-hydroxyquinoline or vitamin C were added to the incubation mixture.	[74]
10 healthy volunteers	SCG L pH=13	<input type="checkbox"/> Tail length 1 day after treatment	Inverse correlation between DNA damage and MTZ plasmatic concentrations	[36]
13 MTZ-treated patients	SCG L pH=13	No DNA damage after treatment		[37]
10 females with <i>T. vaginalis</i> infection	FADU <sup>7</sup>	<input type="checkbox"/> DNA ssb <sup>14</sup> immediately after therapy		[35]
PHA <sup>2</sup> stimulated and unstimulated lymphocytes treated <i>in vitro</i>	FADU	<input type="checkbox"/> DNA ssb	Doses of 31, 62, 125 and 250 mcg/ml	[75]
Human hepatocytes	AET <sup>9</sup> and QA <sup>10</sup>	DNA fragmentation and unscheduled DNA synthesis	Marked interdonor variation in the sensitivity to the genotoxic effects of MTZ.	[76]
12 healthy volunteers	CPK <sup>11</sup> , RI <sup>12</sup> and SCE <sup>13</sup>	<input type="checkbox"/> CPK		[40]
		<input type="checkbox"/> RI		
		No change in frequency of SCE		

<sup>1</sup> See text for details

<sup>2</sup> Phytohemagglutinin

<sup>3</sup> Double-blind cross-over study

<sup>4</sup> Single Cell Gel electrophoresis 'comet'

<sup>5</sup> Lymphocytes

<sup>6</sup> Chromosomal aberrations

<sup>7</sup> Fluorescence Analysis of DNA Unwinding

<sup>8</sup> Cytokinesis blocked micronucleus technique

<sup>9</sup> Alkaline Elution Technique

<sup>10</sup> Quantitative autoradiography

<sup>11</sup> Cell proliferation kinetics

<sup>12</sup> Replication Index

<sup>13</sup> Sister chromatid exchanges

<sup>14</sup> Single-strand breaks

## Legends to figures

Figure 1. Time of follow-up after MTZ treatment vs. cancer incidence and relative risk of developing cancer. Data from Falagas et al, 1998.

Figure 2. Nitroreduction hypothesis of MTZ genotoxicity. MTZ is possibly reduced in this way by hypoxic mammalian cells. No final reduction product produces any cytotoxicity or DNA damage. A possible damaging agent could be the nitroso metabolite.

Figure 3. Bacterial activation hypothesis of MTZ genotoxicity. This reaction is mediated by gut flora and catalyzes the degradation of MTZ (I) to HOA (II) and acetamide (III).

Figure 4. Aerobic biotransformation hypothesis of MTZ genotoxicity. MTZ (I) is metabolized in the human liver to AAM (II) and HM (III) which is a genotoxic agent more powerful than MTZ itself.

Figure

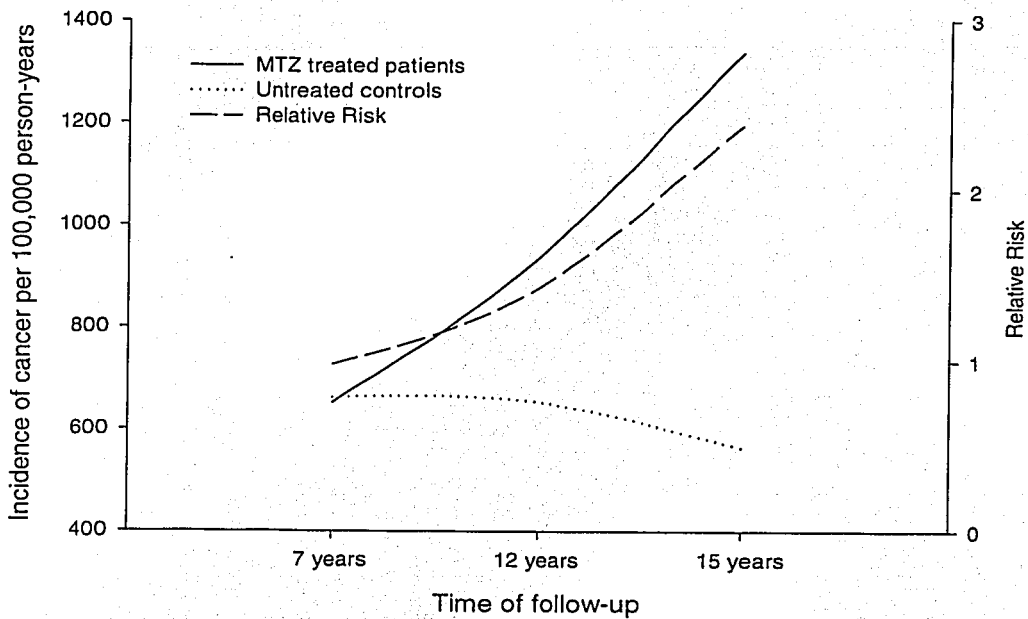


Figure 2

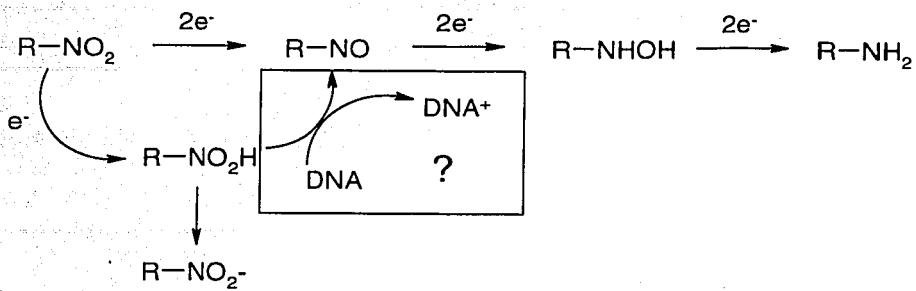


Figure 3

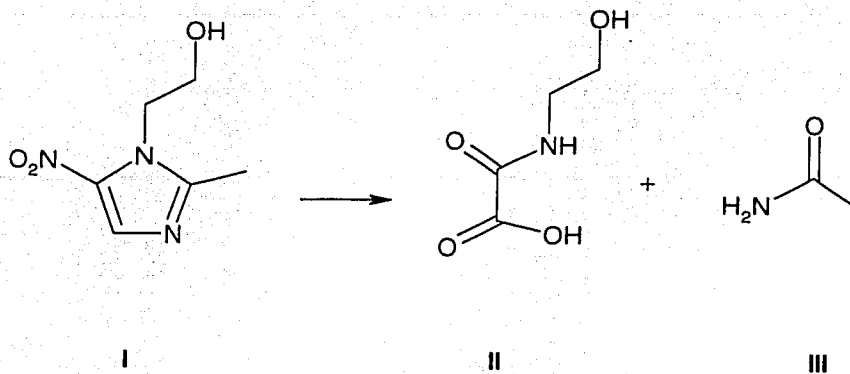
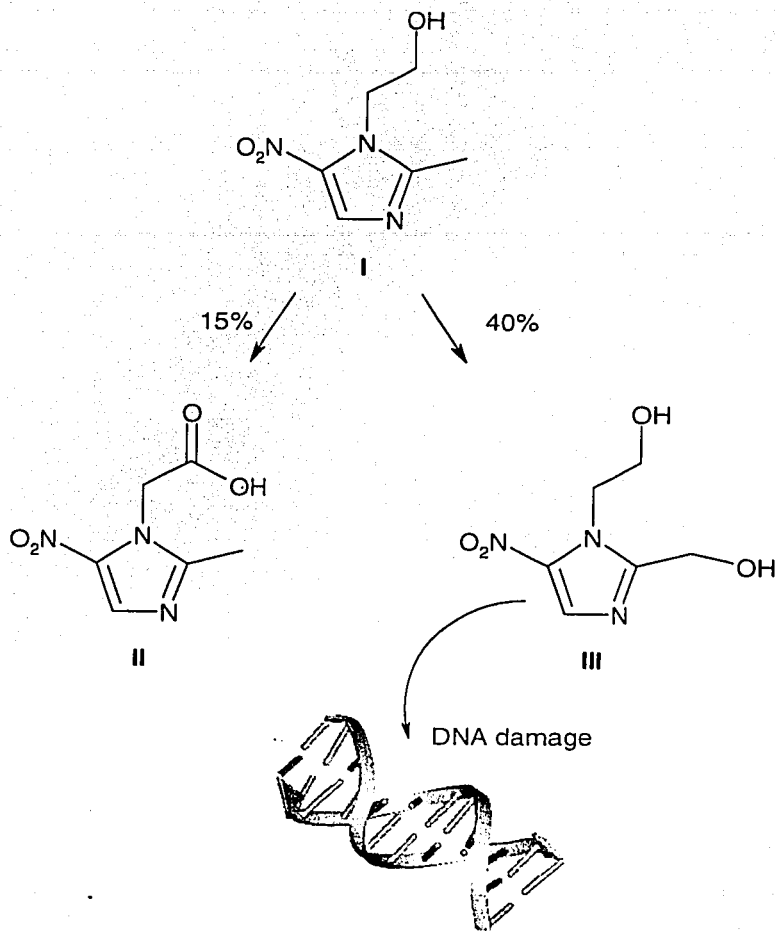


Figure 4



## **ANEXO 3**



ELSEVIER

Mutation Research 478 (2001) 153–158

MR

Fundamental and Molecular  
Mechanisms of Mutagenesis

www.elsevier.com/locate/molmut

Community address: www.elsevier.com/locate/mutres

## DNA breakage due to metronidazole treatment

D. Menéndez<sup>a</sup>, E. Rojas<sup>a</sup>, L.A. Herrera<sup>a,c</sup>, M.C. López<sup>a</sup>,  
M. Sordo<sup>a</sup>, G. Elizondo<sup>b</sup>, P. Ostrosky-Wegman<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM,

P.O. Box 70228, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F., México

<sup>b</sup> Sección de Toxicología, CINVESTAV, México, D.F., México

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Cancerología, México, D.F., México

Received 1 May 2000; received in revised form 23 February 2001; accepted 18 March 2001

### Abstract

The mutagenicity of metronidazole [1-(hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole] (MTZ) has been shown in different prokaryotic systems. However, data on human cells are still contradictory. In this study DNA damage was determined by the single cell gel electrophoresis (SCGE) assay, in lymphocytes from 10 healthy subjects treated with therapeutic doses of this drug. Samples were obtained before treatment, as well as 1 and 15 days after ending treatment. Results showed a significant increase of DNA strand breaks 1 day after ending treatment, although, an inverse correlation between the amount of DNA damage and plasma concentrations of MTZ was obtained. Thus, the observed damage may be induced by some MTZ metabolite rather than by the parent drug. Interestingly, the amount of DNA damage returned to basal levels 15 days after ending treatment, except in two individuals. This persistent damage should be further investigated. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Comet assay; Antiparasitic drugs; DNA repair

### 1. Introduction

Metronidazole [1-(hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole] (MTZ) is an antiprotozoal and bactericidal drug used for the treatment of several parasitic diseases such as trichomoniasis, giardiasis and amebiasis. This compound has also been utilized against infections caused by anaerobic microorganisms [1–4], including *Helicobacter pylori* [5,6]. MTZ has shown to be a potent mutagen in bacteria and low eukaryotic systems [7–9], mainly inducing base-pair substitutions [9,10].

The mutagenic effect of MTZ is increased by microsomal activation [11], being necessary an enzymatic reduction of the nitro group by microorganisms to produce its mutagenic reactive intermediates ([12]; for review see [13]).

In contrast to data in bacteria, MTZ mutagenicity studies in mammalian cells are contradictory [13,14]. MTZ has been reported to interact, bind and damage DNA directly [15–19], however, there are controversial data on the capacity of MTZ or its metabolites to induce gene mutations in mammalian cells [20,21]. In human cells, MTZ did not induce sister chromatid exchanges or micronuclei both in vitro and in vivo [22]. However, Mudry et al. [23] reported that MTZ has a clastogenic effect, evaluated as chromosomal aberrations and micronuclei, both in CHO cells and in human

\* Corresponding author. Tel.: +52-56223846;

fax: +52-56223365.

E-mail address: ostrosky@servidor.unam.mx

(P. Ostrosky-Wegman).



lymphocytes. Although, the first report concerning the evaluation of chromosomal aberrations in cells from patients treated with MTZ showed an increased frequency of damage after treatment [24], this effect could not be confirmed by further studies [25–27].

The capacity of MTZ or its metabolites to produce DNA breaks in human cells is also debated. Reitz et al. [17] analyzed DNA unwinding to measure DNA damage, and showed that MTZ produced DNA single strand breaks in human lymphocytes from patients treated with 4800 mg of the drug. This damage was repaired seven days after ending MTZ therapy. The same group reported the induction of DNA single strand breaks in cultured human lymphocytes treated with MTZ [18], an observation confirmed by others using the single cell gel electrophoresis (SCGE) assay [28]. On the other hand, an *in vivo* study, in which MTZ genotoxicity was investigated with the SCGE assay, did not find differences in the level of DNA damage before and after treatment [29]. However, it should be mentioned that confounding factors, such as age, sex, weight, and type of infection, were not controlled.

We have previously reported an increased frequency of chromosomal aberrations in lymphocytes from healthy individuals treated with therapeutic doses of MTZ [30]. In the present study we evaluated the genotoxicity of MTZ using the SCGE assay in frozen lymphocytes obtained from the same healthy individuals analyzed in the mentioned study [30].

## 2. Material and methods

### 2.1. Blood samples

Ten healthy men weighing between 55 and 65 kg were included in this trial; median age was 23.5 years (range: 18–25 years). Strict inclusion and exclusion criteria were taken into consideration in an attempt to avoid, as far as possible, confounding factors that could alter the biological endpoints studied. The subjects were non-smokers, not exposed to any known mutagen or carcinogen in the last 3 months before and during this study, and had not received any drug for at least 4 weeks before the MTZ treatment. The Ethics and Research Committee of the Miguel Silva Hospital approved the investigation protocol.

Individuals received therapeutic doses of MTZ (500 mg, *p.o.*) three times a day for 10 days. Blood samples were taken on the first day of treatment before administration of MTZ, and 1 and 15 days after the last treatment. Mononuclear cells were separated by a Ficoll gradient. Buffy coat was removed and washed twice with RPMI 1640 medium at 1200 rpm for 10 min; the cells were resuspended in 2 ml of medium and counted with a hemocytometer. The leukocytes were slowly frozen as described [31] and cryopreserved in liquid nitrogen until use.

Cell viability was evaluated by the FDA assay as described [32]. Briefly, an aliquot of cells (800  $\mu$ l) was taken and cells were recovered by centrifugation, the pellet of cells was resuspended and washed in PBS 1X twice and resuspended in 50  $\mu$ l of PBS. The recovered cells were mixed 1:1 (*v/v*) with a staining solution containing fluorescent diacetate (5 mg/ml) ethidium bromide (1 mg/ml) in PBS 1X, dropped onto a slide, and analyzed by a fluorescence microscope at 20X, where 500 cells are counted.

### 2.2. SCGE assay

The SCGE assay was performed as described by Rojas et al. [33] with minor modifications. After alkaline lysis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10 at 4°C for 1 h), slides were placed on a horizontal electrophoresis unit. The DNA was allowed to unwind for 20 min in electrophoresis running buffer solution (300 mM NaOH, and 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 13). Electrophoresis was conducted for 10 min at 25 V and 300 mA. All technical steps were conducted using very dim indirect light. After electrophoresis, the slides were gently removed and alkaline pH neutralized with 0.4 M Tris, pH 7.5. Ethidium bromide (75  $\mu$ l of a 20  $\mu$ g/ml solution) was added to each slide and a cover glass was placed on the gel, DNA migration was analyzed by an Olympus Bmax60 microscope with fluorescence equipment (filter G-2A), and measured with a scaled ocular. For the evaluation of DNA migration (tail length), 50 cells were scored for each individual.

### 2.3. Determination of MTZ plasma concentration

Determination of MTZ plasma concentration was done 1 day after ending MTZ treatment. Plasma from peripheral blood samples was obtained by

Table 1  
Cell viability in lymphocyte samples before treatment as well as 1 and 15 days after ending MTZ treatment<sup>a</sup>

Individuals	Before		1 day after		15 days after <sup>b</sup>	
	X̄	S.D.	X̄	S.D.	X̄	S.D.
1	99.00	0.577	99.75	0.500	99.50	0.577
2	97.50	2.380	98.75	2.500	98.50	2.380
3	98.50	1.000	98.75	0.957	98.25	0.500
4	97.00	3.000	100.0	0.000	98.50	1.000
5	97.00	0.816	98.25	2.061	97.25	1.892
6	98.25	1.258	99.50	1.000	99.00	1.154
7	96.25	1.258	97.25	2.217	ND	
8	99.00	1.414	99.75	0.500	ND	
9	98.75	0.957	98.25	1.500	ND	
10	97.25	2.217	98.50	1.290	98.00	0.957

<sup>a</sup> X̄ represents the average value of three lectures; ND = not determined.

<sup>b</sup> End of treatment.

centrifugation at 400 × g for 30 min. MTZ plasma concentrations were analyzed by the HPLC technique described by Lanbeck and Lindström [34]. Protein was removed by centrifugation of plasma samples and treated with an equal volume of acetonitrile immediately before the assay. Concentrations of parent compound were estimated from standard curves of peak height ratios, using ornidazole. The 1-(3-chloro-2-

hydroxuporpyl-2-methyl-5-nitroimidazole) was used as internal standard. The ultraviolet detector was operated at wavelength of 313 nm. Separation was accomplished using a reverse phase silica gel μBondpack C18 column (3.9 mm × 300 mm, 10 μm), chromatograms were based on a mobile phase containing 0.01 M phosphate buffer (pH 7.5), 0.02 M sodium acetate mixed with 15% acetonitrile operated a flow-rate of 1 ml/min MTZ and internal standard were detected at 4 and 7 min, respectively on a mobile phase. The peak area ratio of MTZ to internal standard was linearly related to the standard plasma MTZ concentration over the range of 5–50 μg/ml. The percentage of recovery was 94.8 ± 2.5%. The correlation coefficient of the assay was 0.998.

#### 2.4. Statistical analysis

A non-parametric Mann–Whitney test was applied to analyze statistical differences in DNA damage in cells from each individual before MTZ administration, 1 and 15 days after the end of treatment. Data from seven donors in which the evaluation of DNA damage in all sampling times was obtained, were included to analyze differences by group before and after treatment with a Wilcoxon test for paired samples.

Table 2  
Amount of DNA damage measured as the tail length (μm) in lymphocytes from individuals treated with MTZ

Individuals	Before		1 day after <sup>a</sup>		<i>p</i> <sup>b</sup>	15 days after <sup>a</sup>		<i>p</i> <sup>b</sup>
	Tail length	+/-	Tail length	+/-		Tail length	+/-	
1	45.1	1.609	40.7	2.927	0.2756	47.9	1.263	0.0741
2	37.2	1.459	50.6	2.255	<0.0001	42.4	1.887	0.0009
3	42.4	1.832	56.3	2.798	<0.0001	41.9	1.563	0.3526
4	40.4	1.838	50.9	2.744	<0.0001	34.9	1.878	0.0094
5	44.1	1.547	50.3	2.746	0.0006	43.3	1.364	0.9338
6	39.6	1.496	47.7	2.965	0.0027	35.3	1.910	0.0710
7	27.5	2.159	36.8	2.164	<0.0001	ND <sup>c</sup>		
8	32.2	1.786	44.7	2.113	<0.0001	ND <sup>c</sup>		
9	37.7	1.853	43.3	2.273	0.0058	ND <sup>c</sup>		
10	29.1	1.826	44.1	2.161	<0.0001	46.6	2.092	<0.0001
	X̄	+/-	X̄	+/-	<i>p</i> <sup>d</sup>	X̄	+/-	<i>p</i> <sup>d</sup>
	37.5	6.118	45.1	6.475	0.0098	41.7	5.002	0.2831

<sup>a</sup> End of treatment.

<sup>b</sup> Two-tailed *P*, Mann–Whitney test for unpaired samples.

<sup>c</sup> ND = not determined.

<sup>d</sup> Two-tailed *P*, Wilcoxon test for paired samples.

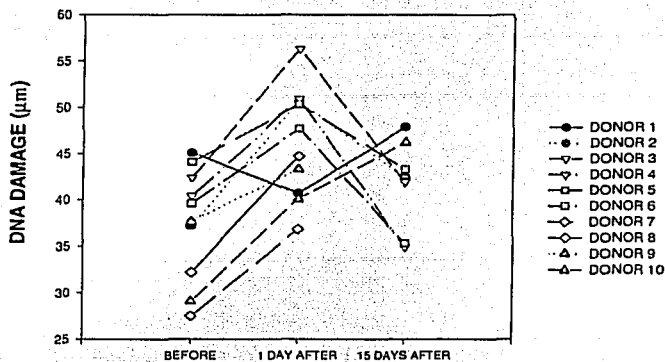


Fig. 1. DNA damage level in lymphocytes from individuals treated with metronidazole. Evaluation of DNA damage was performed by the SCGE assay at pH 13 in cells obtained before treatment as well as 1 and 15 days after ending treatment.

### 3. Results

Cell viability was evaluated immediately after thawing all samples to discard a potential effect in DNA damage by the freezing-thawing process. Cell viability was  $\geq 97\%$  in all samples (Table 1). Table 2 shows the median values of DNA damage by individuals after treatment with MTZ. Data indicate significant levels of DNA damage 1 day after ending MTZ treatment. The magnitude of this damage was statistically significant in nine of ten individuals (Fig. 1). An inverse correlation was found between DNA damage and plasmatic concentrations of MTZ (Table 3),

indicating that individuals with the lower concentrations of MTZ had higher levels of DNA damage (Fig. 2;  $r = -0.6$ ,  $P < 0.03$ ). DNA damage occurring 15 days after the end of MTZ treatment could be evaluated in seven individuals, three donors did not show up for sampling. The levels of DNA breaks tended to diminish in most donors, although, the amount of DNA damage observed in two subjects was still higher than their basal values (Table 2, Fig. 1).

Table 3  
Individual MTZ plasma concentrations 1 day after ending MTZ treatment

Subjects	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	7.42
2	5.76
3	7.55
4	4.85
5	4.17
6	4.35
7	13.84
8	6.69
9	10.41
10	6.35

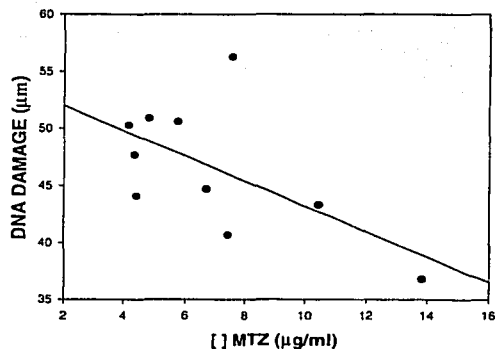


Fig. 2. Correlation between DNA damage in lymphocytes and MTZ plasma concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) 1 day after ending MTZ treatment.

#### 4. Discussion

Our results indicated an increased DNA damage, visualized by the SCGE assay, in lymphocytes obtained from individuals 1 day after ending a 10 days MTZ treatment regime. These results agree with other reports [17,18,28], as well as with our previous study with the same samples, in which we found that MTZ raised the frequency of chromosomal aberrations. It has been proposed that the MTZ-induced DNA damage is linked to the oxidant activity of this compound [28]. However, the inverse correlation between DNA damage and plasmatic levels of MTZ found in the present work, suggest that this effect may be generated by the metabolic products of MTZ rather than by the parent drug. MTZ is biotransformed by the cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1) to a hydroxylated metabolite (1-(hydroxyethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole) and to an acetylated metabolite (2-methyl-5-nitroimidazole-1-acetic acid) [35,36]. The presence of an OH group in the MTZ-hydroxyl metabolite increases its reactivity with macromolecules such as DNA, RNA or proteins. In fact, this metabolite is more mutagenic and DNA damaging than MTZ itself [12,13,19,37,38].

It is important to mention that most of the studies carried out with humans exposed to MTZ, did not consider the individual response as an important factor for analysis. Even the double blind study realized by Mitelman et al. [27], the statistical evaluation was based on group data. The authors did not find significant differences in the frequency of chromosomal aberrations among controls and exposed groups. However, their data showed some individuals in which there is a clear induction in chromosomal aberrations.

Persistent DNA damage 15 days after finishing MTZ treatment could be due to different repair capacity among donors or some influence of MTZ or its metabolites on the functionality of DNA repair mechanisms, both possibilities should be investigated in future studies.

In summary, although, this study was performed with a reduced number of subjects, the results indicated that therapeutic doses of MTZ produced DNA damage in circulating lymphocytes. However, this DNA damage seems to be repaired as indicated by the tendency, observed in most of the studied individuals, to return to basal levels 15 days after finishing

MTZ treatment, except in two donors in which DNA damage showed values higher than their basal level. This individual susceptibility should be further evaluated because if DNA damage is not repaired, a mutation can be transmitted to the next generation of cells, representing a potential risk that eventually may lead to cancer. On the other hand, since xenobiotics metabolism could be altered in individuals harboring hepatic parasites that are treated with MTZ, such as *Entamoeba histolytica*, and taking into account that some MTZ metabolites are even more genotoxic than the parent drug, it is important to investigate MTZ genotoxicity in those individuals.

#### Acknowledgements

This project was partially supported by CONACYT and DGEP (UNAM).

#### References

- [1] C. Cosar. L. Julou, Activité de 1'-(hydroxy-2-ethyl)-1-methyl-2-nitro-5-imidazole (8.823R.P.) vis-a-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis*, Ann. Inst. Pasteur (Paris) 96 (1959) 238–241.
- [2] R.B. Khambatta, Metronidazole in giardiasis, Ann. Trop. Med. Parasitol. 65 (1971) 487–489.
- [3] S.J. Powell, I. McLeod, A.J. Wilmontt, R. Eldson-Drew, Metronidazole in amoebic dysentery and hepatic liver abscess, Lancet (1966) 404–408.
- [4] F.P. Tally, V.L. Sutter, S.M. Finegold, Treatment of anaerobic infections with MTZ, Antimicrob. Agents Chemother. 237 (1975) 672–675.
- [5] G.D. Bell, K.U. Powell, S.M. Burridge, et al., *Helicobacter pylori* eradication: efficacy and side effects profile of a combination of omeprazole, amoxicillin and metronidazole compared with four alternative regimens, Q. J. Med. 86 (1993) 743–750.
- [6] R.A. Moore, B. Beckthold, L.E. Bryan, Metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*, Can. J. Microbiol. 41 (1995) 746–749.
- [7] C.E. Voogd, On the mutagenicity of nitroimidazoles, Mutat. Res. 86 (1981) 243–277.
- [8] G.R. Mohn, T. Ong, D.F. Callen, P.G. Kramers, C.S. Aaron, Comparison of the genetic activity of 5-nitroimidazole derivatives in *Escherichia coli*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*, J. Environ. Pathol. Toxicol. 2 (1970) 657–670.
- [9] G. Cantelli-Forti, G. Aicardi, M.C. Guerra, A.M. Barbaro, G.L. Biagi, Mutagenicity of a series of 25-nitroimidazoles and two nitrothiazoles in *Salmonella thymipurium*, Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 3 (1983) 51–63.

- [10] P. Vanelle, M.P. De Mèo, J. Maldonado, P. Nougier, M.P. Crozet, M. Laget, G. Duménil, Genotoxicity in oxazolidine derivatives: influence of the nitro group, *Eur. J. Med. Chem.* 25 (1990) 241-250.
- [11] M. De Mèo, P. Vanelle, E. Bernadini, M. Laget, J. Maldonado, O. Jentzer, M.P. Crozet, G. Duménil, Evaluation of the mutagenic and genotoxic activities of 48-nitroimidazoles and related imidazole derivatives by the Ames test and the SOS chromotest, *Environ. Mol. Mutagen.* 19 (1992) 167-181.
- [12] D.I. Edwards, Nitroimidazoles drugs — action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action, *J. Antibiot. Chemother.* 31 (1993) 9-20.
- [13] L. Dobias, M. Cerná, P. Rossner, R. Sram, Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole, *Mutat. Res.* 317 (1994) 177-194.
- [14] T.J. Matula, Validity of in vitro testing, *Drug. Metab. Rev.* 22 (1990) 777-787.
- [15] N.F. LaRusso, M. Tomasz, M. Müller, R. Lipman, Interaction of metronidazole with nucleic acids in vitro, *Mol. Pharmacol.* 13 (1977) 872-882.
- [16] D.I. Edwards, Reduction of nitroimidazoles and DNA damage, *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986) 53-58.
- [17] M. Reitz, M. Rumpf, R. Knitza, DNA single strand-breaks in lymphocytes after metronidazole therapy, *Drug. Res.* 41 (1991a) 155-156.
- [18] M. Reitz, M. Rumpf, R. Knitza, Metronidazole induces DNA strand-breaks in cultures of human lymphocytes and phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes, *Drug. Res.* 41 (1991) 65-69.
- [19] A. Martelli, A. Allavena, L. Robbiano, F. Mattioli, G. Brambilla, Comparison of the sensitivity of human and rat hepatocytes to the genotoxic effects of metronidazole, *Pharmacol. Toxicol.* 66 (1990) 329-334.
- [20] P. Ostrosky-Wegman, I. Lares, P. Santiago, G. Elizondo, R. Montero, Metronidazole *hprt* mutation induction in sheep and the relationship with its elimination rate, *Mutat. Res.* 307 (1994) 253-259.
- [21] J. Dayan, M.C. Crajer, S. Deguingand, Mutagenic activity of four active-principle forms of pharmaceutical drugs: comparative study in the *Salmonella typhimurium* microsome test, and the HGPRT and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase systems in cultured mammalian cells, *Mutat. Res.* 102 (1982) 1-12.
- [22] B. Lambert, A. Lindbald, U. Ringborg, Absence of genotoxic effects of metronidazole and two of its urinary metabolites in human lymphocytes in vitro, *Mutat. Res.* 67 (1979) 281-287.
- [23] M.D. Mudry, M. Carballo, M. Labal de Vinuesa, M. Gonzalez Cid, I. Larripa, Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs. III. Metronidazole (MTZ), *Mutat. Res.* 305 (1995) 127-132.
- [24] F. Mitelman, B. Hartley-Asp, B. Ursing, Chromosome aberrations and metronidazole, *Lancet* 2 (1976) 802.
- [25] F. Salamanca, G. Castañeda, J. Farfán, M.C. Santillán, O. Muñoz, S. Armendares, Chromosome studies of bone marrow cells from metronidazole treated patients, *Ann. Gen.* 23 (1980) 63-64.
- [26] F. Mitelman, B. Strombeck, B. Ursing, No cytogenetic effect of metronidazole, *Lancet* 1 (1980) 1249-1250.
- [27] F. Mitelman, B. Strombeck, B. Ursing, O. Nordle, B. Hartley-Asp, Metronidazole exhibits no clastogenic activity in a double blind cross over study on Crohn's patients, *Hereditas* 96 (1982) 280-285.
- [28] J.L. Ré, M.P. De Mèo, M. Laget, H. Guiraud, M. Castegnaro, P. Vanelle, G. Duménil, Evaluation of the genotoxic activity of metronidazole and dimetridazole in human lymphocytes by the comet assay, *Mutat. Res.* 375 (1997) 147-155.
- [29] R. Fahrig, M. Engelke, Reinvestigation of in vivo genotoxicity studies in man. I. No induction of DNA strand breaks in peripheral lymphocytes after metronidazole therapy, *Mutat. Res.* 395 (1997) 215-221.
- [30] G. Elizondo, M.E. Gensebatt, A.M. Salazar, I. Lares, P. Santiago, J. Herrera, E. Hong, P. Ostrosky-Wegman, Genotoxic effects of metronidazole, *Mutat. Res.* 370 (1996) 75-80.
- [31] E.E. Visvardis, A.M. Tassiou, S.M. Piperaki, Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gamma radiation with the alkaline comet assay, *Mutat. Res.* 383 (1997) 71-80.
- [32] G. Speit, C. Dennog, L. Lampl, Biological significance of DNA damage by hyperbaric oxygen, *Mutagenesis* 13 (1998) 85-87.
- [33] E. Rojas, M.C. López, M. Valverde, Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications, *Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 722 (1999) 225-254.
- [34] K. Lanbeck, B. Lindström, Determination of metronidazole and tinidazole in plasma and feces by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 162 (1979) 117-121.
- [35] S. Loft, Metronidazole and antipyrine as probes for the study of foreign compound metabolism, *Pharmacol. Toxicol.* 66 (1990) 1-31.
- [36] S. Loft, M. Dossing, H.E. Poulsen, et al., Influence of dose and route of administration on disposition of metronidazole and its metabolites, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 30 (1986) 467-473.
- [37] V. Bahr, U. Ulman, The influence of metronidazole and its two main metabolites on murine in vitro lymphocytes transformation, *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2 (1983) 568-570.
- [38] T.H. Connor, M. Stoeckel, J. Evvard, M.S. Legator, The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans and mice, *Cancer Res.* 37 (1977) 629-633.

## **ANEXO 4**

**De :** Patricia Ostrosky <ostrosky@servidor.unam.mx>  
**Para :** drendon@hotmail.com  
**Asunto :** Fwd: Your paper MUT 9302 submitted to Mutation Research Regular Papers  
**Fecha :** Mon, 07 Jan 2002 22:35:54 -0600  
**Datos adjuntos :** MUT\_9302\_CTF\_11190162.PDF (15k), MUT\_9302\_OOF\_11190162.PDF (9k), TERMS1\_11190162.PDF (16k)

Date: Mon, 7 Jan 2002 11:28:10 GMT  
X-Authentication-Warning: screavie.elsevier.co.uk: ptsemail set sender to e.neylon@elsevier.ie using -f  
To: <ostrosky@servidor.unam.mx>  
From: "Ms. Edelle Neylon" <e.neylon@elsevier.ie>  
Subject: Your paper MUT 9302 submitted to Mutation Research Regular Papers  
X-Original-From: ENEYLON@BACCUS.ELSEVIER.CO.UK

Shannon, 07 January 2002

Re: Role of P53 functionality in the gentoxicity of metronidazole and its hydroxy metabolite

Journal: Mutation Research Regular Papers  
Editorial reference: JGEN2157  
Our reference: MUT 9302

Dear Dr. Ostrosky-Wegman

We have received your above-mentioned article for publication. On behalf of Elsevier Science, I would like to take this opportunity to thank you for choosing Mutation Research Regular Papers as your publishing medium.

>From the details supplied by the journal editor we have logged your address, to which your proofs will be sent unless you indicate otherwise by return.

Attached you will find a Copyright Transfer form and an Offprint order form plus price list in PDF format. To view and print the attachments you will need Acrobat Reader from Adobe. This program is freely available and can be downloaded from <http://www.adobe.com/>. The Acrobat reader is available for a whole series of platforms which include PC, Mac and Unix. If you would prefer to receive the forms by fax or mail then please inform us immediately by replying to this e-mail with full fax details.

Copyright transfer: We are proceeding with the publication of your article on the explicit understanding that you will sign and return the original copy of the attached Transfer of Copyright form. A fax or copy of the signed form is sufficient for us to proceed in good faith; however, for legal reasons we still need you to mail us the form with the original signature present. If you have any doubts about your ability to do so or if your employer has asked you to return a different form, it is essential that you contact us immediately

to avoid difficulties at a later date. Corresponding authors who are US government employees or who elect to claim Crown copyright should ask any co-authors who are not government employees to sign the form and mark the appropriate box. Where all authors are US government employees or are claiming

Crown copyright, please sign the warranties section and indicate your government status on the form.

If we have not heard from you within 15 days of the date of this letter we will publish the article with an Elsevier Science copyright line, or, in the case of Society journals, with the appropriate Society copyright line.

Offprint order: With this form you can order offprints at the prices quoted. The number of printed pages of your article is estimated at 10. (This has been calculated using the average number of figures and average figure size for this journal.)

If you wish to order offprints you can return this form with your corrected proofs once you know the actual number of printed pages of your article. It is important for our administration that you return this form to us even if you do not wish to order offprints.

Information on the status of your paper can be obtained at : <http://www.elsevier.nl/oasis>. You will need to fill in your surname Ostrosky-Wegman and our reference MUT 9302 for access. Please note that it takes 24 hours before your paper's details become available via this system.

If any questions or problems arise, please do not hesitate to contact us, preferably by fax or e-mail quoting MUT 9302 in all correspondence.

Yours sincerely,

Elsevier Science  
Edelle Neylon  
Administrator  
Fax: +353-61-709107  
Email: [e.neylon@elsevier.ie](mailto:e.neylon@elsevier.ie)



© 2002 Microsoft Corporation.  
Reservados todos los derechos. [CONDICIONES DE USO](#) [Declaración de privacidad con aprobación de TRUSTe](#)



## **Role of P53 functionality in the genotoxicity of metronidazole and its hydroxy metabolite.**

D. Menéndez<sup>1</sup>, A. Bendesky<sup>2</sup>, E. Rojas<sup>1</sup>, F. Salamanca<sup>3</sup> and P. Ostrosky-Wegman<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

<sup>3</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>2</sup> Hospital de Pediatría, Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

\*Correspondence: Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. P.O. Box 70228, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.

Phone: (5255 / 56223846)

Fax: (5255 / 56223365)

E-mail: [ostrosky@servidor.unam.mx](mailto:ostrosky@servidor.unam.mx)

## ABSTRACT

P53 mediates several biological processes for preservation of genetic stability such as the induction of cell cycle arrest, DNA repair or apoptosis in response to DNA damage. The antiparasitic drug, metronidazole (MTZ) is able to increase lymphocyte proliferation inducing at the same time chromosomal aberrations. Trying to understand this unexpected event we used cell lines with different P53 functionality, determining the proliferation capacity and the induction of micronuclei (MN) after the treatment with MTZ or its hydroxy metabolite. Our results show that MTZ increased proliferation in a dose response manner in all P53 functional cell lines without inducing changes on the levels of P53 nor MN. However MTZ hydroxy metabolite induced a dose response increase of P53 and MN, while cell proliferation was not increased. Several studies have shown that the hydroxy metabolite is more potent than MTZ itself. Only in cell lines that do not have a functional P53, MTZ and its metabolite increased both cell proliferation and MN. MTZ use is increasing and its carcinogenicity has not been discarded. Our data indicate that MTZ hydroxy metabolite is potentially a carcinogen and needs to be further studied.

## INTRODUCTION.

The 5-nitroimidazoles compounds have been applied as antibacterial, antifungal and antiprotozoal drugs [1]. Metronidazole [1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole] (MTZ) is a nitroimidazole that has been used in clinical practice for over 35 years, where it has played an important role in the treatment of anaerobic-related infections. This drug has activity against protozoans like *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* and gram negative anaerobes such as *Helicobacter pylori*, for which the drug has been proved an effective treatment [2]. In addition MTZ has been applied as a radiosensitizer of hypoxic or tumor cells [3].

In humans, oxidative metabolism is the major route for biotransformation of MTZ and two major oxidative metabolites are found: the hydroxy metabolite 1-(hydroxyethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole (HM) that represents the principal metabolite founded in urine (50%) and in minor degree, the acetic metabolite 2-methyl-5-nitroimidazole-1-acetic acid (AAM), [4].

MTZ is a potent mutagen in bacterial systems [5]; the main DNA lesions being base pair substitutions [6]. In addition, several reports have demonstrated that HM and AAM also have mutagenic potential [7-9]. In contrast, in humans the genotoxic potential of MTZ and its metabolites is still contradictory [10]. MTZ is classified by the IARC as an animal carcinogen and possible human carcinogen with inadequate evidence [11].

Recent reports have shown that MTZ is able to produce DNA strand breaks in human lymphocytes both "in vivo" and "in vitro" [12-14]. MTZ and its hydroxy metabolite are also able to increase lymphocyte proliferation after mitogenic stimulus in humans [15-18] and mice [18-19].

In a study carried by our group with healthy subjects treated with MTZ at therapeutic doses, we observed that after the treatment finished, there was a

significant increase in the number of chromosomal aberrations [20] and DNA strand breaks [21] in the lymphocytes of those individuals. Different responses among donors were observed. An unexpected situation was also observed in these samples, MTZ treatment was able to increase cell proliferation, inducing at the same time DNA damage.

Under normal conditions, cells harboring DNA damage, are either stopped at well defined cell cycle stages termed "checkpoints" for repair, or completely purged away from subsequent division by apoptotic cell death or by cell senescence and necrotic death [22-23]. The central component in this system is the p53 tumor suppressor gene, which in response to stress signals as DNA damage or hypoxia— is activated, preventing the growth of damaged cells or the proliferation of undamaged cells under unfavorable conditions [24-25].

P53 collects signals of emergency or irregular situations, stabilizing and quickly increasing its levels as well as changing its conformation to generate increased functional activity [26-29]. This changes leads cell cycle arrest, induction of repair mechanisms or activation of apoptosis [24-29].

In order to understand if P53 functionality was related with MTZ/HM induction of cell proliferation with damage, several cell lines with different P53 functionality were treated with MTZ or HM. In the evaluation of cell proliferation capacity and the induction of micronucleus (MN), we found that MTZ and its metabolite induce cells to proliferate with damage only when P53 is non-functional.

## MATERIAL AND METHODS.

### *Materials.*

Metronidazole (CAS No. 443-48-1) and actinomycin D (CAS No. 50-76-0) were purchased from Sigma. The hydroxy metabolite 1-(hydroxyethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole was a generous gift from Rhone Poulenc Pharmaceutical Co.

### *Cell cultures and treatment.*

Human cervical carcinoma cell lines HeLa and C33-A (ATCC) and colon carcinoma cell lines RKO and RKOE6 (provided generously by Drs. A. Dipple and K. Voudsen) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 12% (vol/vol) fetal bovine serum (Hyclone). Jurkat, a human acute T lymphoblastic leukemia cell line (ATCC) was cultured in RPMI 1640 medium containing 15% of fetal bovine serum (Hyclone), 10 mM non-essential amino acids (Sigma) and 2 mM L-glutamine (Sigma). All cultures were incubated in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37° C and grown to 90% confluence or exponential growth. The functional status of P53 in each cell line is shown in Table 1.

An aqueous sterile stock solution of MTZ and HM (10 mM) was prepared and appropriate volumes were diluted to obtain desired final concentrations. After growth for 24 h,  $1 \times 10^6$  cells per ml were treated with 25, 50 100 and 200  $\mu$ M concentrations of these drugs for an additional period of 24 h. Metronidazole and its hydroxy metabolite concentrations used in the cultures were within the therapeutic range found in plasma of individuals after MTZ treatment [4,8,13,19,20].

### *Fluorescein Diacetate [FDA] Assay.*

Evaluation of cell viability was measured using the Fluorescein Diacetate method (FDA), according to Hartmann and Speit [30]. Briefly: a freshly prepared solution consisting of 30  $\mu$ l fluorescein diacetate in acetone (5 mg/ml), 200  $\mu$ l ethidium

bromide (200 µg/ml) in PBS and 4.8 ml PBS is used. Thirty µl of cell suspension is mixed with 30 µl staining solution, spread on a microscope slide, and covered with a coverslip. Viable cells appear green-fluorescent; whereas orange-stained nuclei indicate dead cells. Five hundred cells were analyzed in a fluorescence microscope at 20 X per data point.

#### *Cell proliferation determination and micronuclei assay.*

To determine the effect of MTZ and its metabolite on cell proliferation and the induction of genotoxic damage –evaluated as frequency of micronuclei–, we used the cytokinesis blockage induced by addition of cytochalasin B (cyt-B) described by Fenech and Morley [31] with some modifications. Briefly,  $1 \times 10^6$  cells per ml were cultured during 48 h. Eighteen hours before harvesting, cyt-B was added (3 µg / ml), and 4 h later cells were treated with MTZ and HM . Cells were gently fixed with chilled methanol- acetic acid (3:1) and dropped onto coded slides. After 24 h, slides were stained with Wright's dye. Determination of cell proliferation was done by nuclear index, scoring the number of mononucleated, binucleated and polynucleated nuclei in 200 cells. A total of 1000 binucleated cells with preserved cytoplasm were scored for micronuclei for each concentration assayed.

#### *Western blotting*

Western blotting was carried out essentially as described [32]. After 24 h of treatment, cells were recovered by centrifugation at 1200 rpm 10 min and washed twice with Phosphate Buffer Saline (PBS) at 4° C. Cell pellet was then treated with RIPA lysis buffer containing 1% NP40 (Sigma), 0.5% deoxycholic acid sodium salt (Sigma), 0.1% SDS (BioRad), 3 mM PMSF (Sigma), 20 µg/ml aprotinin (Sigma) and 100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Sigma) for 1 h on ice, and membrane fragments were removed by centrifugation at 14 000 rpm for 30 min. The protein concentration of cleared lysates was determined by the Bradford assay. After boiling with sample running buffer [2% SDS (BioRad), 80 mM Tris pH 6.8 (BioRad), 10% glycerol (Sigma), 5% β-mercaptoethanol (BioRad) and 0.01% bromophenol blue (BioRad)] for 5 min, 80 µg of total protein was electrophoresed on a SDS-10% polyacrylamide

gel and then transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham) using a semi-dry transfer cell (BioRad), and then assessed for P53 and actin protein levels by western blot analysis using anti-p53 Do-1 and anti-actin I-19 human reactive antibodies (Santa Cruz). The immunoreactive bands were visualized by ECL chemiluminescence horseradish peroxidase system (Amersham) on autoradiographic films (Amersham, Tokyo, Japan). The relative intensity of the bands was quantified by optical densitometry Quantity One software (BioRad). Actinomycin D (AMD) was used as a positive induction controls (3 ng/ml).

#### *Transfection assay*

A Gene Pulser apparatus (BioRad) was used to electroporate Jurkat cells as described [32]. For the transfection assay, cells from exponentially growing cultures were collected by centrifugation and resuspended in ice-cold calcium and magnesium -free PBS. The cells were centrifuged for 5 min, and the pellet resuspended on ice cold PBS to final concentration of  $1.5 \times 10^7$  cells per ml and incubated on ice for 10 min. Ten  $\mu$ l of vector DNA (1 mg/ml) was added, and aliquots of 0.8 ml of the cell suspension were transferred into electroporation chambers.

Normal (pcDNA-53) and mutated (pcDNA273) p53 expression plasmids, were linearized with restriction enzyme Nhe-I (Amersham) and then used to transfect the cells with a single pulse 600 V (25  $\mu$ Fd) during 0.5 ms for Jurkat cells.

#### *Cell proliferation determination by incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine.*

Two hundred thousand cells per well were incubated (in duplicate) in 96-well culture plates in a total volume of 200  $\mu$ l for 48 h, under the same conditions described above. Cells were pulsed with 1  $\mu$ Ci of [<sup>3</sup>H]-thymidine (Du Pont, 6.7 Ci/mmol) for the last 18-h and were harvested onto glass-fiber filters by an automatic cell harvester (Skatron). [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation was assessed by liquid scintillation spectroscopy on a Betaplate counter (Wallac) to determine cellular response to MTZ.

*Statistical analysis.*

Statistical analysis was performed using pair-wise one way analysis of variance (ANOVA) and  $X^2$  test. The data were analyzed using the STAT Plot program.



## RESULTS.

After a 24 h treatment of MTZ or HM, we did not observe cytotoxic effects (data not shown) in the different cell lines used in our study (Table 1); viability was above 80%.

In order to evaluate if the functional status of P53 is involved in the generation of damage by these substances, we analyzed the induction of micronuclei (MN) in the cell lines with different P53 functionality. Although the basal number of micronucleated cells was different in each cell line as shown in Figure 1, all cell lines with abrogated P53 function exhibited a statistically significant dose response increase in the number of MN in binucleated cells when treated with MTZ and HM (Figure 1). In contrast, in P53 effective cell lines, no induction of MN with MTZ was observed, while in cultures treated with HM, we found a significant increase in the amount of damage (Figure 1). Interestingly a clear increase in cell proliferation was observed in all cell lines treated with MTZ, independently from their P53 status, while HM only induced an increased proliferation in cell lines harboring an abnormal P53 (Figure 1).

Trying to understand if the effects on cell proliferation and the induction of damage in the cell lines were related with the response of the P53 protein, we evaluated the levels of this protein after the treatment with MTZ and its metabolite (Figure 2). HeLa and RKO blots (both with normal P53 activity), show that MTZ treatment did not result in any induction of the protein. However, as also Figure 3 displays, the densitometric analysis of these cell lines treated with HM did show a dose response induction of P53 (Figure 2). In RKO cells, this increase in P53 protein begins after 1 h of treatment with 100  $\mu$ M of HM, reaching the maximal induction at 12 h, then the induction is sustained to 24 h (Figure 4). A similar treatment with a dose of 100  $\mu$ M with MTZ did not produce any change in P53 protein amount (Figure 4). As expected no induction of P53 was observed in RKO-E6 with any of the treatments (Figures 2 and 3). In the immunoblot of C33-A which have a mutant

form of P53 treated with MTZ and its metabolite, we detected protein expression, although the non-functionality of this protein in this cell line is known.

The results suggested that P53 functionality could be a key element to support a "cell proliferation with damage" scenario. In order to confirm this hypothesis we introduced a normal or a mutated non-functional version of p53 in the Jurkat cell line, which is heterozygous for the p53 gene and thus non-functional, and evaluated the effects of MTZ on cell proliferation through [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation. As shown in Figure 5, the transfection of a mutant form of p53 in Jurkat cells induces a more prominent proliferation response after treatment with MTZ, compared with non-transfected Jurkat cells. Conversely, the overexpression of a functional p53 gene in Jurkat cells does not allow cells to proliferate when they are treated with MTZ, as occurs in the parental cell line.

## DISCUSSION.

In the context of DNA damage, cellular checkpoints have a critical role in the damage response and establish barriers to prevent the perpetuation of injured genomes [23]. P53 tumor suppressor protein is considered a key element in the regulation of these systems, playing an important role in the restriction of proliferation of abnormal cells. One of the consequences of the loss of P53 safeguard function is the genetic instability as seen in destabilized genomes characteristic of cancer cells [33].

Metronidazole and its hydroxy metabolite are compounds that have the capacity to produce damage in macromolecules as the DNA, inducing principally breaks; HM being more mutagenic and DNA damaging than MTZ itself [8,10, 13-15, 19, 34-35]. Additionally, both MTZ and HM are able to increase cell proliferation, although this mechanism is not well understood [15-18,20].

In the present work, we show that MTZ and HM are able to induce cells to proliferate with damage in the presence of a non-functional P53 protein. Indeed, to demonstrate the role of functionality of p53, we transfected Jurkat cells with functional and non functional versions of p53 gene (Figure 5). Parental Jurkat cell line has a non functional P53 protein since they have a dominant negative point mutation in one allele that contrarrest the wild type activity of the functional allele (46-47). After DNA damage, tetramerization of P53 monomers occurs; the transfection of mutant or wild type versions of p53 genes produces an unbalanced condition in the oligomerization of P53, resulting in a full mutated P53 or a functional P53 respectively. Then, when wild type p53 gene is overexpressed in Jurkat cells and so its functionality is restored the DNA damage induced by MTZ, can now be detected and cell proliferation is restrained. In contrast the increase in cell proliferation induced by MTZ is potentate by the transfection with mutant p53, which due to a mutation in hotspot 273 (His by Arg), cannot bind to DNA and thus turn on the arrest of cell proliferation.

Furthermore, using the isogenic cellular system RKO/RKO-E6, where both cells have a wild type p53, but the presence of a viral protein E6-HPV16 in RKO-E6 disrupts P53 function, we observed that MTZ and HM increased RKO-E6 cell proliferation nevertheless the damage they present. In contrast in RKO cell line the induction of damage by HM treatment did not alter the cell proliferation.

Actually, previous works have demonstrated that in cells with functional P53, including RKO cells, the ectopic human papillomavirus 16 E6 expression leads to the total abrogation of P53 functions as transcriptional activity, cell cycle arrest or induction of apoptosis [36-37].

HeLa cell line is a particular case, because although it has a wild type p53 gene and a functional protein, it is infected with human papilloma virus type 18 (HPV-18) and there is controversy whether the functions of P53 protein are abrogated totally or not [36, 38-39]. Recent reports have demonstrated that in cervical carcinoma cell lines expressing E6 from their natural promoter, including HeLa cells, there is a residual wild-type P53 activity [40-41] even after DNA damage [39]. Our findings further support those results, since, we found that in HeLa cells, HM treatment induced P53 protein, in a dose response manner and cell proliferation was not increased. Elevated levels of P53 were also observed by the treatment of cells with actinomycin D.

In functional P53 cells the treatment with MTZ resulted in an increased cell proliferation without the induction of DNA damage nor P53 activation, while paradoxically the treatment with HM induced a dose related increase of MN and of P53. We also observed that the activation of P53 began 1 h after HM was added to the cultures. It is known that the activation of P53 in normal cells is due to a wide variety of stressful stimuli: DNA breaks, hypoxia, nucleotide depletion [24], disruption of microtubules [42] and lack of chromosome segregation at mitosis [43]. Accordingly with our data the former induction of P53 by HM, suggest that an earlier type of damage might be produced, for example DNA breaks. It has also been reported that the formation of micronuclei also triggers P53 activation

followed by cell cycle arrest [42]. Our data indicate that early and late induction of P53 could be related with different type of damage.

The differences between the effects of MTZ and its hydroxylated metabolite could be due to their intrinsic structural and molecular characteristics. HM presents an additional hydroxy (OH) group making it more nucleophilic than its parental drug. Others have also shown that HM is more potent than MTZ in inducing mutations [19] and increasing cell proliferation [15-18].

In summary, we observed that the non-functionality of P53 tumor suppressor protein is a key factor that allows cells to support a high rate of proliferation containing a large amount of damage induced by MTZ and HM. Further studies are needed to determine how MTZ and its metabolites alter the cell proliferation, which of the cell cycle phases is involved in this arrest and which are the molecular pathways both upstream as downstream to P53 activation.

Metronidazole is a very effective drug, old and new indications are increasing, although its potential carcinogenicity has not been discarded. Our data showed that HM is able to induce the expression of P53. The induction of P53 has been proposed as a biomarker of carcinogenicity [44], thus HM carcinogenicity requires to be further studied

#### **ACKNOWLEDGEMENTS.**

This project was partially supported by CONACYT and DGEP (UNAM).

M . Sordo for her technical support.

## REFERENCES.

- [1] M.D. Nair, K. Nagarajan, Nitroimidazoles as chemotherapeutic agents, *Prog. Drug Res.* **27** (1983) 163-252.
- [2] C.D. Freeman, N.E. Klutman, K.C. Lamp, Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs.* **54** (1997) 679-708.
- [3] A.M. Rauth, Pharmacology and toxicology of sensitizers: mechanism studies, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **10** (1984) 1293-1300.
- [4] S. Loft, Metronidazole and antipyridine as probes for the study of foreign compound metabolism, *Pharmacol. Toxicol.* **66** (1990) Suppl. VI, 1-31.
- [5] C.E. Voogd, On the mutagenicity of nitroimidazoles, *Mutat. Res.* **86** (1981) 243-277.
- [6] P. Vanelle, M.P. De Méo, J. Maldonado, P. Nougulier; M.P. Crozet, M. Laget, G. Duménil, Genotoxicity in oxazolidine derivatives: influence of the nitro group, *Eur. J. Med. Chem.* **25**(1990) 241-250.
- [7] R.L. Koch, B.B. Beaulieu, E.J. Chrystal, P. Goldman, A metronidazole metabolite in human urine and its risks. *Science.* **211** (1981) 398-400.
- [8] T.H. Connor, M. Stoeckel, J. Evrad, M.S. Legator, The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans and mice. *Cancer Res.* **37** (1977) 629-633.
- [9] E. Mohtashampur, K. Norpoth, Excretion of mutagens in sweat and faeces of man, and in serum, gastric juice and urine of rats, after oral dosing of niridazole or metronidazole, *Mutagenesis.* **1** (1986) 371-374.
- [10] L. Dobiás, M. Cerná, P. Rossner, R. Sram, Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole, *Mutat. Res.* **317** (1994) 177-194.
- [11] IARC Monographs Suppl. 7 (1987) 250.
- [12] M. Reitz, M. Rumpf, R. Knitza, DNA single strand-breaks in lymphocytes after metronidazole therapy, *Drug. Res.* **41** (1991) 155-156.
- [13] M. Reitz, M. Rumpf, R. Knitza, Metronidazole induces DNA strand-breaks in cultures of human lymphocytes and phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes, *Drug. Res.* **41** (1991) 65-69.

- [14] J.L. Ré, M.P. De Méo, M. Laget, H. Guiraud, M. Castegnaro, P. Vanelle, G. Duménil, Evaluation of the genotoxic activity of metronidazole and dimetridazole in human lymphocytes by the comet assay, *Mutat. Res.* **375** (1997) 147-155.
- [15] J.J. Miller, S. Reeves, J.R. Salaman, Effects of simple imidazoles on human peripheral blood lymphocytes stimulated by mitogen or allogenic cells, *J. Immunopharmacol.* **2** (1980) 225-243.
- [16] G. Elizondo, R. Montero, J.E. Herrera, E. Hong, P. Ostrosky-Wegman, Lymphocyte proliferation kinetics and sister-chromatid exchanges in individuals treated with metronidazole, *Mutat. Res.* **305** (1994) 133-137.
- [17] G. Elizondo, P. Ostrosky-Wegman, Effects of metronidazole and its metabolites on histamine immunosuppression activity, *Life Sci.* **59** (1996) 285-297.
- [18] S. Shubert, B.H. Andresen, V. Bahr, L. Fischer, R. Stamp, G. Stricke, J.W. Wittke, U. Ullmann, The immunomodulatory effects of antibiotics: in vitro and ex vivo investigations of 21 substances by means of the lymphocyte transformation test, *Zentralbl. Bakteriol.* **284** (1996) 402-438.
- [19] V. Bahr, U. Ullmann, The influence of metronidazole and its two metabolites on murine in vitro lymphocyte transformation, *Eur. J. Clin. Microbiol.* **2** (1983) 568-570.
- [20] G. Elizondo, M.E. Gonsebatt, A.M. Salazar, I. Lares, P. Santiago, J.E. Herrera, E. Hong, P. Ostrosky-Wegman, Genotoxic effects of metronidazole, *Mutat. Res.* **370** (1996) 75-80.
- [21] D. Menéndez, E. Rojas, L.A. Herrera, M.C. López, M. Sordo, G. Elizondo, P. Ostrosky-Wegman, DNA breakage due to metronidazole treatment, *Mutat Res.* **478** (2001) 153-158.
- [22] S.J. Elledge, Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis, *Science.* **74** (1996) 1664-1672.
- [23] L.H. Hartwell, M.B. Kastan, Cell cycle control and cancer, *Science.* **266** (1994) 1821-1828.
- [24] L.J. Ko, C. Prives, p53: puzzle and paradigm, *Genes Dev.* **10** (1996) 1054-1072.
- [25] A.J. Levine, p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* **88** (1997) 323-331.

- [26] D.P. Lane, Cancer: p53, guardian of the genome, *Nature*. **358** (1992) 15-16.
- [27] S.J. Ullrich, C.W. Andersson, W.E. Mercer, E. Appella, The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation, *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 15259-15262.
- [28] W. Maltzman, L. Czyzyk, UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells, *Mol. Cell. Biol.* **4** (1984) 1689-1694.
- [29] F. Janus, N. Albrechtsen, I. Dornreiter, L. Wiesmuller, F. Grosse, W. Deppert, The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity, *Cell Mol. Life Sci.* **55** (1999) 12-27.
- [30] A. Hartmann, G. Speit, Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells, *Environ. Mol. Mutagen.* **27** (1996) 98-104.
- [31] M. Fenech, A.A. Morley, Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* **147** (1985) 29-36.
- [32] A.M. Salazar, P. Ostrosky-Wegman, D. Menéndez, E. Miranda, A. García-Carrancá, E. Rojas, Induction of p53 protein expression by sodium arsenite, *Mutat. Res.* **381** (1997) 259-265.
- [33] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell*. **100** (2000) 57-70.
- [34] D.I. Edwards, Nitroimidazoles drugs--action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action, *J. Antibiot. Chemother.* **31** (1993) 9-20.
- [35] A. Martelli, A. Allavena, L. Robbiano, F. Mattioli, G. Brambilla, Comparison of the sensitivity of human and rat hepatocytes to the genotoxic effects of metronidazole, *Pharmacol. Toxicol.* **66** (1990) 329-334.
- [36] T.D. Kessis, R.J. Slebos, W.G. Nelson, M.B. Kastan, B.S. Plunkett, S.M. Han, A.T. Lorincz, L. Hedrick, Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90** (1993) 3988-3992.
- [37] S.A. Foster, G.W. Demers, B.G. Etscheid, D.A. Galloway, The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest, *J. Virol.* **68** (1994) 5698-5705.



- [38] M. Scheffner, K. Münger, J.C. Byrne, P.M. Howley, The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88** (1991) 5523-5527.
- [39] S. Hietanen, S. Lain, E. Krausz, C. Blattner, D.P. Lane, Activation of p53 in cervical carcinoma cell by small molecules *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** (2000) 8501-8506.
- [40] K. Butz, L. Shahabeddin, C. Geisen, D. Spitkovsky, A. Ullmann, F. Hoppe-Seyler, Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene.* **10** (1995) 927-936.
- [41] K. Butz, N. Whitaker, C. Denk, A. Ullmann, C. Geisen, F. Hoppe-Seyler, Induction of the p53-target gene GADD45 in HPV-positive cancer cells. *Oncogene.* **18** (1999) 2381-2386.
- [42] A. Sablina, G. Ilyinskaya, S.N. Rubtsova, L.S. Agapova, P. Chumakov, B.P. Kopnin, Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation, *J. Cell Sci.* **111** (1998) 977-984.
- [43] J.S. Lanni, T. Jacks, Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption, *Mol Cell. Biol.* **18** (1998) 1055-1064.
- [44] J.C. Semenza, L.H. Weasel, Molecular epidemiology in environmental health: The potential of tumor suppressor gene p53 as a biomarker, *Environ. Health Perspect.* **105** Suppl. 1, (1997) 155-162.
- [45] J. DeFrank, W. Tang, S.N. Powell, p53-null Cells Are More Sensitive to Ultraviolet Light Only in the Presence of Caffeine. *Cancer Res.* **56**, (1996) 5365-5368.
- [46] Cheng J. and Haas M. Frequent mutations in the p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. *Mol. Cell. Biol.* **10**, (1990) 5502- 5509.
- [47] Hassapoglidou S., Diamandis E.P. and Sutherland D.J. Quantification of p53 protein in tumor cell lines, breast tissue extracts and serum with time-resolved immunofluorometry. *Oncogene*, **8**. (1993) 1501-1509.

## FIGURE LEGENDS.

Figure 1. Effects of MTZ and HM on cell proliferation and induction of micronuclei in cell lines with functional and non-functional p53 protein. The percent of polynucleated cells after MTZ and HM treatment are showed in bars. The data represent the mean  $\pm$  s.d. from three separate experiments. \*  $p < 0.05$  versus control. Lines represent the frequency of cells with micronuclei (MN) after 24 h of treatment. MN were scored in 200 cells in duplicate in three independent experiment, each bar representing the average and standard deviations. <sup>+</sup> $p < 0.05$  versus control.

Figure 2. Effect of MTZ and HM on P53 response in p53 functional cell lines: HeLa and RKO; and in p53 non-functional cell lines: C33-A and RKO-E6. Immunodetection of P53 was carried on by western blot. Actin immunodetection was used as internal control in each experiment. Actinomycin D (AMD) was used as positive control. This is a representative experiment of three independent experiments.

Figure 3. Densitometric analysis of P53 response in HeLa, C33-A and RKO cell lines treated with MTZ and HM. The data represent the mean  $\pm$  s.d. from three separate experiments. \* $p < 0.05$  versus control.

Figure 4. Time-response curve of P53 in RKO cell line after MTZ and HM treatment. Cells were treated with 100  $\mu$ M of MTZ and HM during different times. A) Immunodetection of P53 protein response after drug treatment, This is a representative experiment of three independent experiments. B) Densitometric analysis of P53 response. The data represent the mean  $\pm$  s.d. from three separate experiments. \* $p < 0.05$  versus control.

Figure 5. Effect of MTZ on cell proliferation in Jurkat cells transfected with wild type (pcDNA53) and mutant p53 (pcDNA273) after 24 h of treatment. Cells were transfected by electroporation and cell proliferation was evaluated by incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine . The data represent the mean  $\pm$  s.d. from two separate experiments.

Table 1. Functional status of p53 in cell lines

<b>Cell line</b>	<b>p53 gene status</b>	<b>Codon affected</b>	<b>p53 protein functionality<sup>o</sup></b>	<b>References</b>
HeLa*	WT		+	[36, 38]
RKO	WT		+	[36]
RKO-E6**	WT		-	[36, 45]
C33-A	mutated	273	-	[36, 38]
Jurkat	mutated	196, 256, 259, 260	-	[46-47]

<sup>o</sup> Signs + and - refers to normal or altered function respectively.

\* Infected with HPV-18

\*\* Transfected with E6 (HPV16)

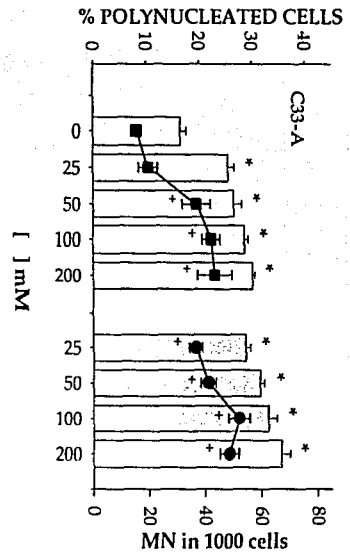
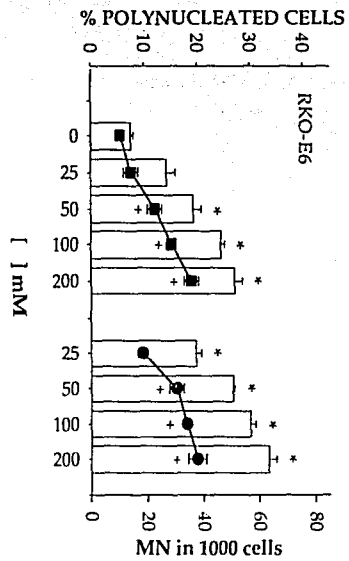
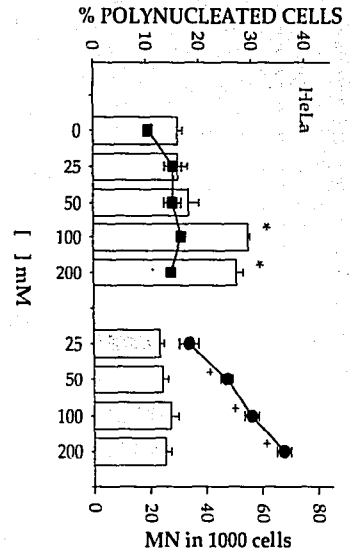
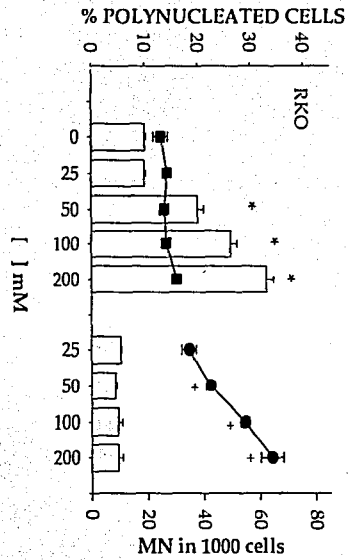
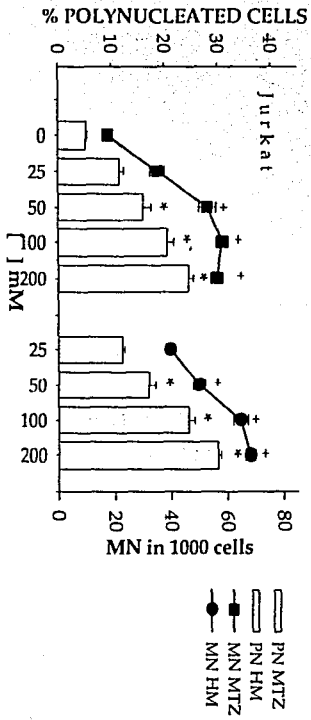


Figure 1

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

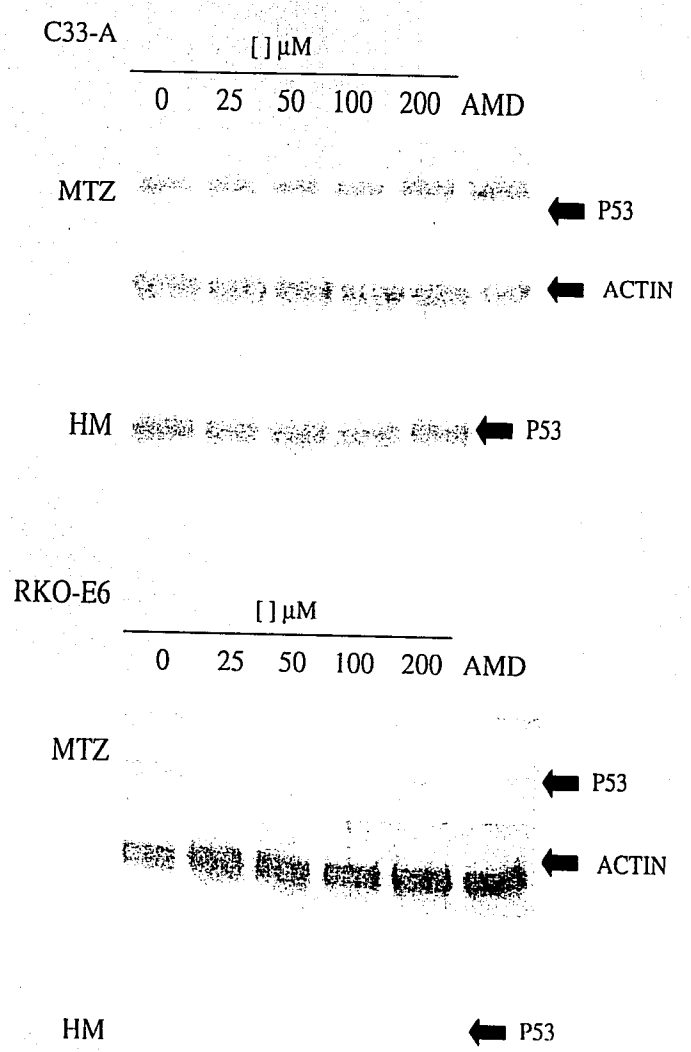
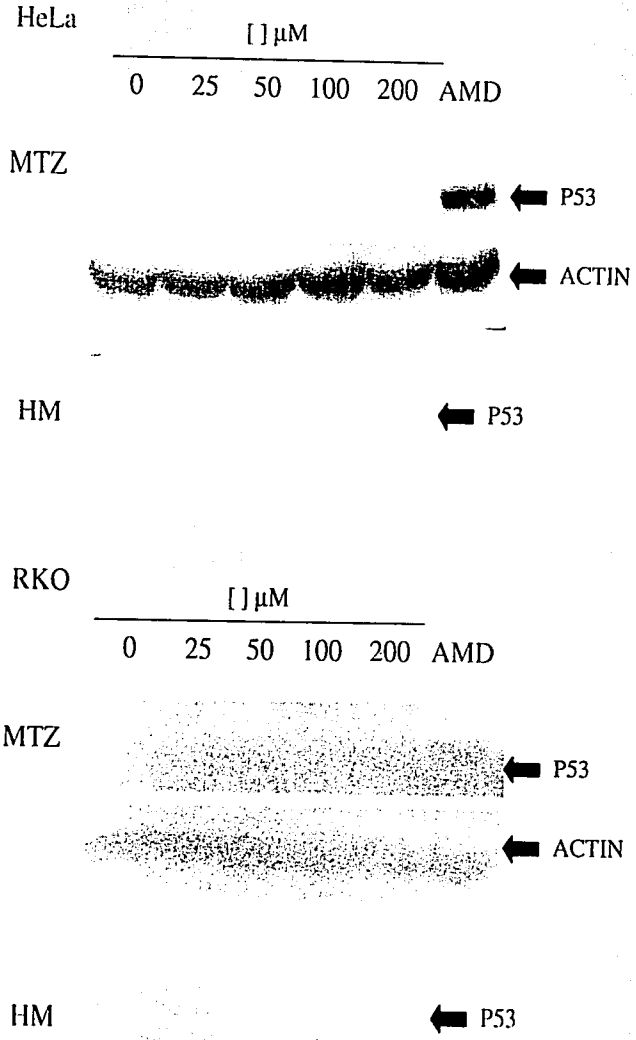


Figure 2

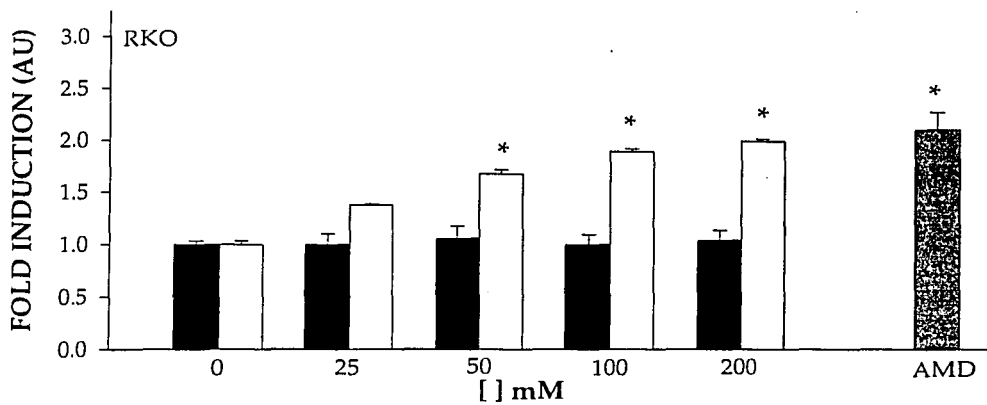
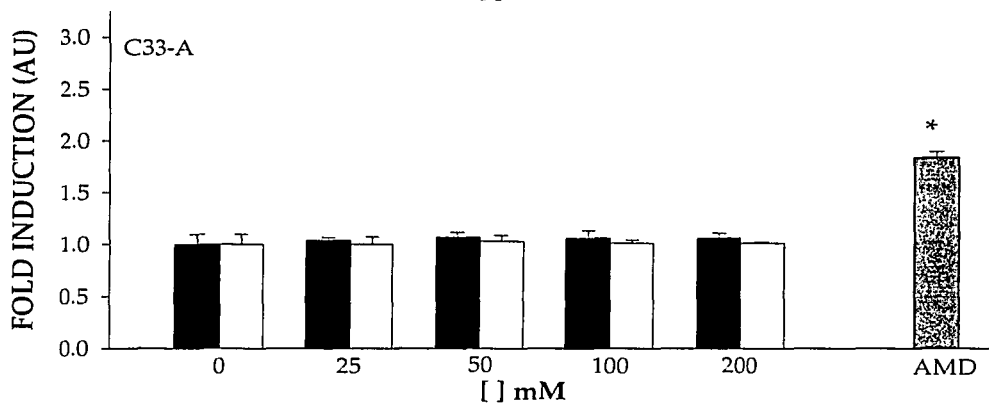
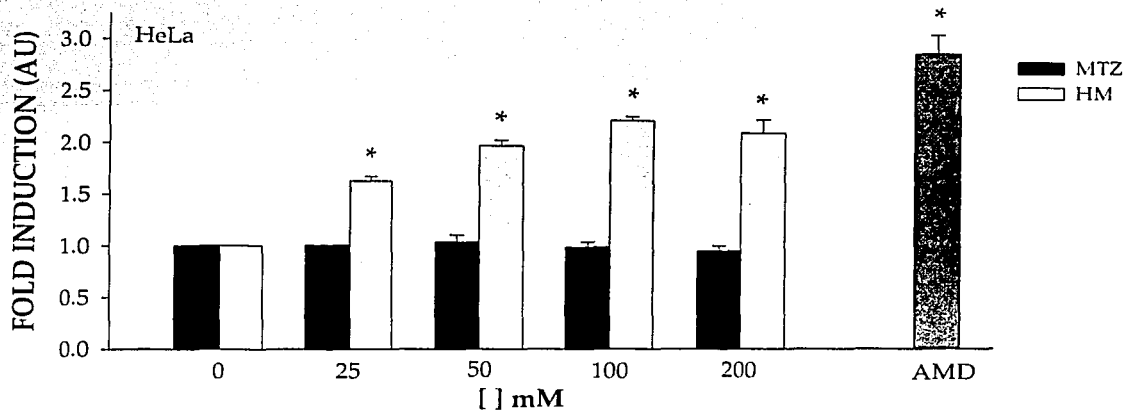


Figure 3

A

HOURS

0 1 3 6 12 24

MTZ

← P53

← Actin

HM

← P53

← Actin

B

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

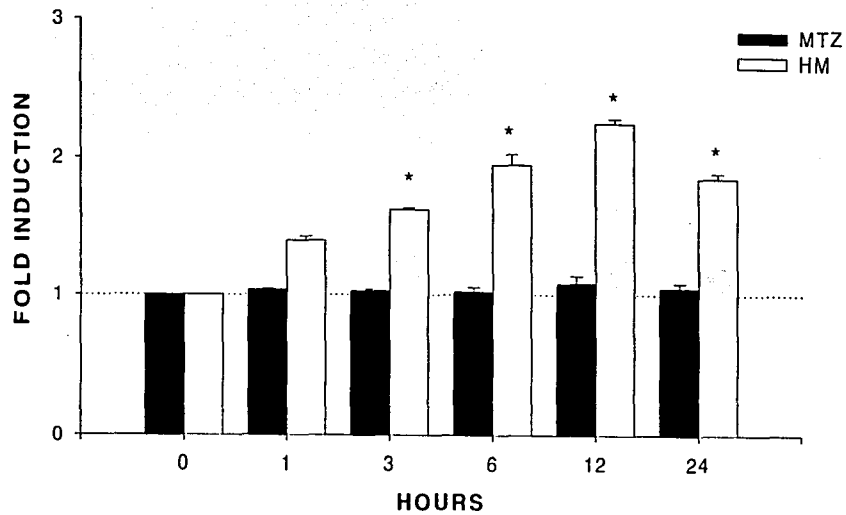


Figure 4

34



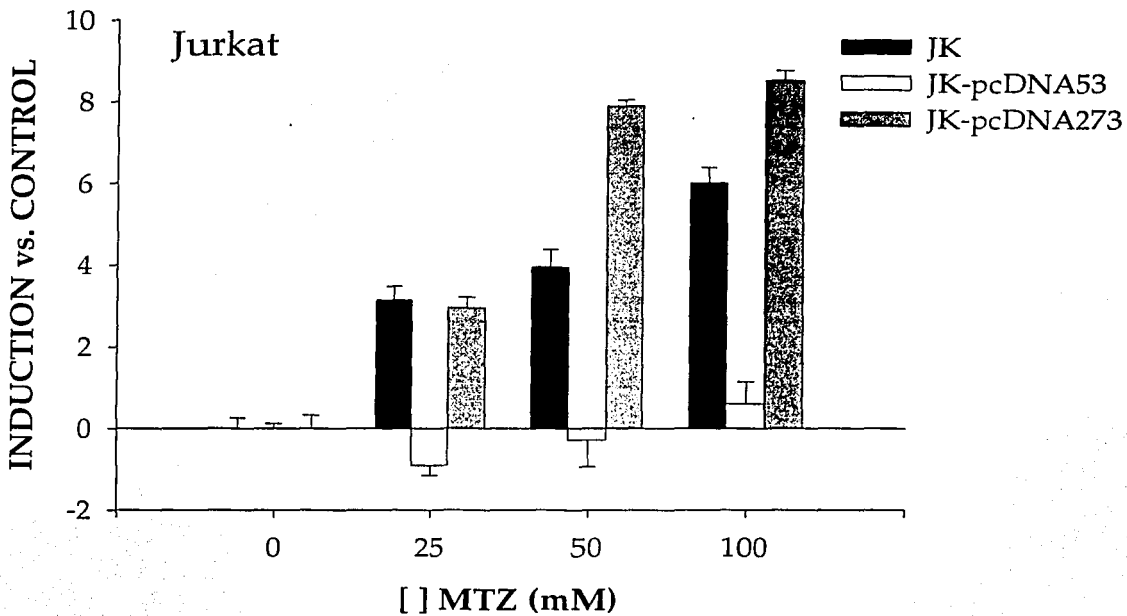


Figure 5

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Table 1. Human genotoxic studies of MTZ

Subject of study <sup>1</sup>	Assay performed	Results	Comments	Reference
15 patients of Crohn's disease	CA in L	<input type="checkbox"/> in CA frequency compared to healthy controls	Some of the patients were concurrently treated with sulphasalazine	[42]
DBCOS <sup>2</sup> of 22 patients of Crohn's disease	CA in L	No increase in CA after treatment as a group	Several individuals showing large increases in their CA	[43]
10 MTZ treated children	CA in bone marrow	No increase in CA after treatment		[72]
10 healthy volunteers	CA <sup>6</sup> in L	<input type="checkbox"/> Chromatid and isochromatid breaks	Linear correlation between chromosomal aberrations and replication index	[73]
		<input type="checkbox"/> Percentage of cells with aberrations		
2 healthy volunteers	CA and CBMN <sup>8</sup> in L	<input type="checkbox"/> Frequency of chromosomal aberrations per cell		[41]
One volunteer	SCG <sup>1</sup> L, pH=10	<input type="checkbox"/> In both assays		
		<input type="checkbox"/> Tail moment	The genotoxic effect was reduced when S9 mix or antioxidants such as 8-hydroxyquinoline or vitamin C were added to the incubation mixture.	[74]
10 healthy volunteers	SCG L pH=13	<input type="checkbox"/> Tail length 1 day after treatment	Inverse correlation between DNA damage and MTZ plasmatic concentrations	[36]
13 MTZ-treated patients	SCG L pH=13	No DNA damage after treatment		[37]
10 females with <i>T. vaginalis</i> infection	FADU <sup>7</sup>	<input type="checkbox"/> DNA ssb <sup>14</sup> immediately after therapy		[35]
PHA <sup>2</sup> stimulated and unstimulated lymphocytes treated <i>in vitro</i>	FADU	<input type="checkbox"/> DNA ssb	Doses of 31, 62, 125 and 250 mcg/ml	[75]
Human hepatocytes	AET <sup>9</sup> and QA <sup>10</sup>	DNA fragmentation and unscheduled DNA synthesis	Marked interdonor variation in the sensitivity to the genotoxic effects of MTZ.	[76]
12 healthy volunteers	CPK <sup>11</sup> , RI <sup>12</sup> and SCE <sup>13</sup>	<input type="checkbox"/> CPK		[40]
		<input type="checkbox"/> RI		
		No change in frequency of SCE		

<sup>1</sup> See text for details<sup>2</sup> Phytohemagglutinin<sup>3</sup> Double-blind cross-over study<sup>4</sup> Single Cell Gel electrophoresis 'comet'<sup>5</sup> Lymphocytes<sup>6</sup> Chromosomal aberrations<sup>7</sup> Fluorescence Analysis of DNA Unwinding<sup>8</sup> Cytokinesis blocked micronucleus technique<sup>9</sup> Alkaline Elution Technique<sup>10</sup> Quantitative autoradiography<sup>11</sup> Cell proliferation kinetics<sup>12</sup> Replication Index<sup>13</sup> Sister chromatid exchanges<sup>14</sup> Single-strand breaks