



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Diferencias Individuales a los Efectos Genotóxicos del
Metronidazol.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

TORRES PARRA JUAN



DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño.

ASESOR INTERNO: Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano.

10 de Septiembre, 2013



El presente trabajo se realizó en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por ponerme en este camino, en el cual he encontrado satisfacción personal; porque de él es la sabiduría, y de su boca viene el conocimiento, la inteligencia. Gracias Padre porque nunca me has dejado en ningún momento, por sostenerme en mi camino y todo lo que has sido en mi vida.

A mis padres **Carmen Parra Pablo y Mises Torres Romero**, gracias por el apoyo durante toda mi vida, que en todo momento estuvieron conmigo apoyándome y aconsejándome para salir adelante, aun en los momentos más difíciles nunca me dejaron solo, que Dios los bendiga.

A mis hermanos **David, Daniel, Abraham y Esli**, gracias por ser mis hermanos y regalarme muchos momentos felices e inolvidables, gracias por todo el apoyo que me brindaron y todos los recuerdos que tengo de cada uno de ustedes, los quiero mucho.

A la **Q.F.B. Monserrat Sordo**, por sus enseñanzas, confianza y comprensión, pero sobre todo por su apoyo en todo momento y paciencia. Gracias por ser una excelente tutora y una excelente amiga.

A los miembros del Jurado: **M.C. Raúl Zavala Chavero, QFB. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño, Dr. Mario Agustín Altamirano, Dra. Elia Roldán Reyes y M. en C. Rodrigo Aníbal Mateos Nava**, por sus sugerencias y correcciones al presente trabajo.

A la **Dra. Patricia Ostrosky-Wegman**, por darme la oportunidad de formar parte del grupo de trabajo de su laboratorio donde realicé este proyecto.

A mis amigos **Rubí, Miguel, Ricardo y Monserrat**, por todas los momentos que pasamos llenos de alegrías. Espero contar con su amistad por siempre.

A todos mis compañeros de Laboratorio de Biomédicas, mi segunda familia, en especial a **Sonia, Tere y Paty**, por ser siempre personas en las cuales se puede confiar, por su generosidad y su apoyo continuo y todas las palabras de aliento gracias.

INDICE.

RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	9
METRONIDAZOL.	9
Espectro de acción y mecanismo de acción.	10
Metabolismo en mamíferos.	11
Farmacocinética.	12
Efectos Adversos del Metronidazol.	13
Genotoxicidad y Carcinogénesis.	14
GENOTOXICIDAD.	15
BIOMARCADORES.	15
ENSAYO DE MICRONÚCLEOS.	16
Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.	16
Criterios para evaluar células.	18
Criterios para determinar micronúcleos.	19
ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL O ENSAYO COMETA.	19
Ensayo del cometa en la evaluación de la capacidad de reparación del ADN.	20
2. ANTECEDENTES.	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVO.	23
Objetivos particulares.	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS.	25
Sujetos de estudio.	25

Tratamiento.	25
Aislamiento de linfocitos.	25
Conteo celular.	26
Ensayo de micronúcleos.	26
Ensayo Cometa con “reto”.	29
Preparación de laminillas.	29
Desenrollamiento y Electroforesis.	29
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	32
8. RESULTADOS.	33
Efecto citostático del metronidazol.	33
Efecto genotóxico de metronidazol: ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.	34
Daño al ADN por metronidazol y efecto en los mecanismos de reparación. Electroforesis unicelular (ensayo cometa) con reto.	36
Correlación entre la frecuencia de micronúcleos y momento de la cola después del tratamiento con metronidazol.	39
9. DISCUSIÓN.	41
10. CONCLUSIONES.	45
11. REFERENCIAS.	46

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág.	
Figura 1.	Estructura química del metronidazol.	9
Figura 2.	Metabolismo del metronidazol en mamíferos.	12
Figura 3.	Formación de MN debido a la pérdida de un cromosoma entero y fragmentos cromosómicos de tipo acrocéntrico en anafase mitótica.	17
Figura 4.	Divisiones celulares observadas en el ensayo de MN.	17
Figura 5.	Diagrama de flujo del ensayo de micronúcleos e índice nuclear.	28
Figura 6.	Diagrama de trabajo ensayo cometa con reto.	31
Figura 7.	Efecto del MTZ en el índice nuclear.	33
Figura 8.	El efecto genotóxico del metronidazol mediante el ensayo de micronúcleos.	34
Figura 9.	Diferencias en la frecuencia de MN antes y después del tratamiento.	35
Figura 10.	Frecuencia de MN normalizada antes y después del tratamiento.	36
Figura 11.	El efecto genotóxico del metronidazol mediante el ensayo cometa.	37
Figura 12a.	Reparación celular mediante el ensayo cometa con reto, antes del tratamiento con MTZ	38
Figura 12b.	Reparación celular mediante el ensayo cometa, después del tratamiento con MTZ.	39
Figura 13.	Correlación entre frecuencia de MN y momento de la cola después del reto con H ₂ O ₂ en linfocitos de los individuos tratados con MTZ.	40

ABREVIATURAS.

MTZ	Metronidazol
OMS	Organización mundial de la salud
ADN	Ácido desoxirribonucleico
MH	1-(2-hidroxiethyl)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol
MAA	Ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol
MN	Micronúcleos
AC	Aberraciones cromosómicas
BC	Bloqueo de la citocinesis
Mo	Mononucleadas
BN	Binucleadas
PN	Polinucleadas
Cyt B	Citocalasina-B
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
CHO	Células de ovario de hámster chino
HPRT	Hipoxantín-guanín fosforibosil transferasa.
IN	Índice nuclear.
ABPF	Agarosa de bajo punto de fusión.

RESUMEN.

El metronidazol es un fármaco antibacteriano y antiparasitario ampliamente utilizado en todo el mundo. Forma parte del listado de las drogas esenciales de la organización mundial de la salud y uno de los medicamentos esenciales para el tratamiento de enfermedades infecciosas y parasitarias indicado por la Secretaria de Salud de nuestro país, así como de las 100 drogas más prescritas en los Estados Unidos de América. Ha demostrado ser mutágeno en sistemas bacterianos y animales, sin embargo, el efecto que tiene en el humano es controvertido. Por este motivo, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer lo cataloga como carcinógeno en animales, pero sin suficiente evidencia para serlo en humanos (grupo II B). En estudios realizados en el laboratorio se ha observado que el metronidazol produce daño al ADN en linfocitos, además de que presenta una respuesta individual a dicho efecto. Con el fin de evidenciar que existe susceptibilidad individual al metronidazol, se evaluó en voluntarios sanos tratados con dosis terapéuticas de metronidazol: la proliferación celular, la inducción de micronúcleos los rompimientos de cadena sencilla y la capacidad de reparación. Los resultados indican que aunque el metronidazol no modificó la proliferación celular en los donadores, existen diferencias individuales a los efectos genotóxicos del metronidazol, medidos a través de la formación de micronúcleos. Asimismo, se encontró un incremento en el daño al ADN por efecto del metronidazol, medido por electroforesis unicelular en gel. Además, se observó un retraso en la reparación de las células al enfrentarse a una segunda exposición o reto (H_2O_2) mostrando una correlación positiva entre la frecuencia de micronúcleos y el daño al ADN (momento de la cola) al tiempo 60 min de reparación.

1. INTRODUCCIÓN

METRONIDAZOL

En 1955 Nakamura aisló la azomicina (2-nitroimidazol) a partir de *Streptomyces ssp* la cual mostró tener actividad contra *Trichomonas vaginalis*. Así se da inicio a la síntesis de fármacos derivados de nitroimidazoles, los cuales son compuestos que tienen acción antibacteriana, fungicida y antiprotozoaria. A finales de la década de los años 50, los investigadores Cosar y Julou sintetizaron el metronidazol (MTZ) o 1-(2-hidroxiethyl)-2-metil-5-nitroimidazol, el cual forma cristales de color blanco o amarillo pálido, con un peso molecular de 171.16 g/mol, estable a temperatura ambiente, se oscurece al exponerlo a la luz y es poco soluble en agua, etanol y cloroformo (Figura.1) [1, 2].

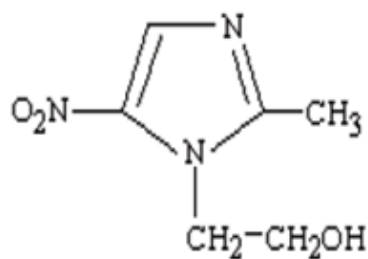


Figura 1. Estructura química del metronidazol. Tomado de Rediguieri CF, 2011.

Es uno de los fármacos más usados en el mundo, comercialmente conocido como *Flagyl*, *Flagenase*, *Metricom*, *Metroson*, *Orvagil*, *Sanizol*, entre otros. Forma parte del listado de los medicamentos esenciales de la organización mundial de la salud (OMS), así como de los 100 fármacos más prescritos en los Estados Unidos de América [1] y uno de los medicamentos más utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas y parasitarias indicado por la Secretaria de Salud de nuestro país [3].

Inicialmente fue un agente efectivo contra trichomoniasis, amibas y giardiasis, posteriormente los usos terapéuticos del MTZ se extendieron al tratamiento de infecciones causadas por bacterias anaeróbicas [4].

Espectro y mecanismo de acción.

Su espectro de acción incluye protozoos, bacterias anaerobias y algunas microaerófilas. Es muy activo frente a prácticamente todo tipo de bacilos gram negativos anaerobios, como *G. vaginalis* y *H. pylori*. Su espectro antiprotozoario incluye *E. histolytica*, *G. lamblia*, *T. vaginalis* y *E. coli* [4].

El mecanismo de acción del MTZ y de la mayoría de los nitroimidazoles es reflejo de la toxicidad selectiva que poseen contra microorganismos anaerobios o microaerófilos y por células anóxicas o hipóxicas, a través de cuatro fases [4]:

1. Entra a la célula bacteriana mediante difusión pasiva.
2. Es activado por proteínas del metabolismo anaerobio (proteínas de transporte de electrones de bajo potencial redox como la piruvato ferredoxina oxidoreductasa o flavodoxina localizadas en el interior del parásito/bacteria) que reducen el grupo nitro que está unido al anillo de imidazol [2,5].
3. Tras la reducción da paso a la producción de N-(2-hidroxietil) del ácido oxámico y de acetamida, estos compuestos dañan al ácido desoxirribonucleico (ADN), ya que interactúan con él oxidándolo. Esto libera fosfato de timidina, causando una lesión caracterizada por la desestabilización helicoidal de la molécula, lo cual induce la pérdida de su estructura, el rompimiento de la cadena, la inhibición de la síntesis del ADN, así como de su reparación, ocasionando la muerte celular [1, 6, 7].
4. Formación de productos finales inactivos [4,5].

Se ha observado que el MTZ es mucho más activo cuando actúa en lugares donde existe anaerobiosis [7].

Metabolismo en mamíferos

El metabolismo oxidativo (fase I) es la vía más importante de biotransformación del MTZ. Las principales modificaciones se dan sobre las cadenas alifáticas en la posición 1 y 2, las cuales son mediadas por enzimas de la familia del citocromo P-450 [1, 2, 8].

La hidroxilación del grupo metil en posición 2 del MTZ forma el 1-(2-hidroxi-etil)-2-hidroxi-metil-5-nitroimidazol (MH: metabolito hidroxilado) que representa la eliminación de aproximadamente el 40% de la dosis. Una parte del MH se vuelve a oxidar para formar el ácido carboxílico en posición 2, lo que corresponde aproximadamente a la eliminación del 10% de la dosis. Las vías de eliminación menos importantes del MTZ en el hombre son la oxidación del alcohol en posición 1 para formar el ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol (MAA: metabolito del ácido acético) en un 15% (Figura. 2) [2, 8].

En cuanto al metabolismo de fase II en humanos el MTZ solo presenta conjugación con el ácido glucurónico en posición 1 (7%) y su metabolito hidroxilado en posiciones 1 y 2 (3%) [2, 8].

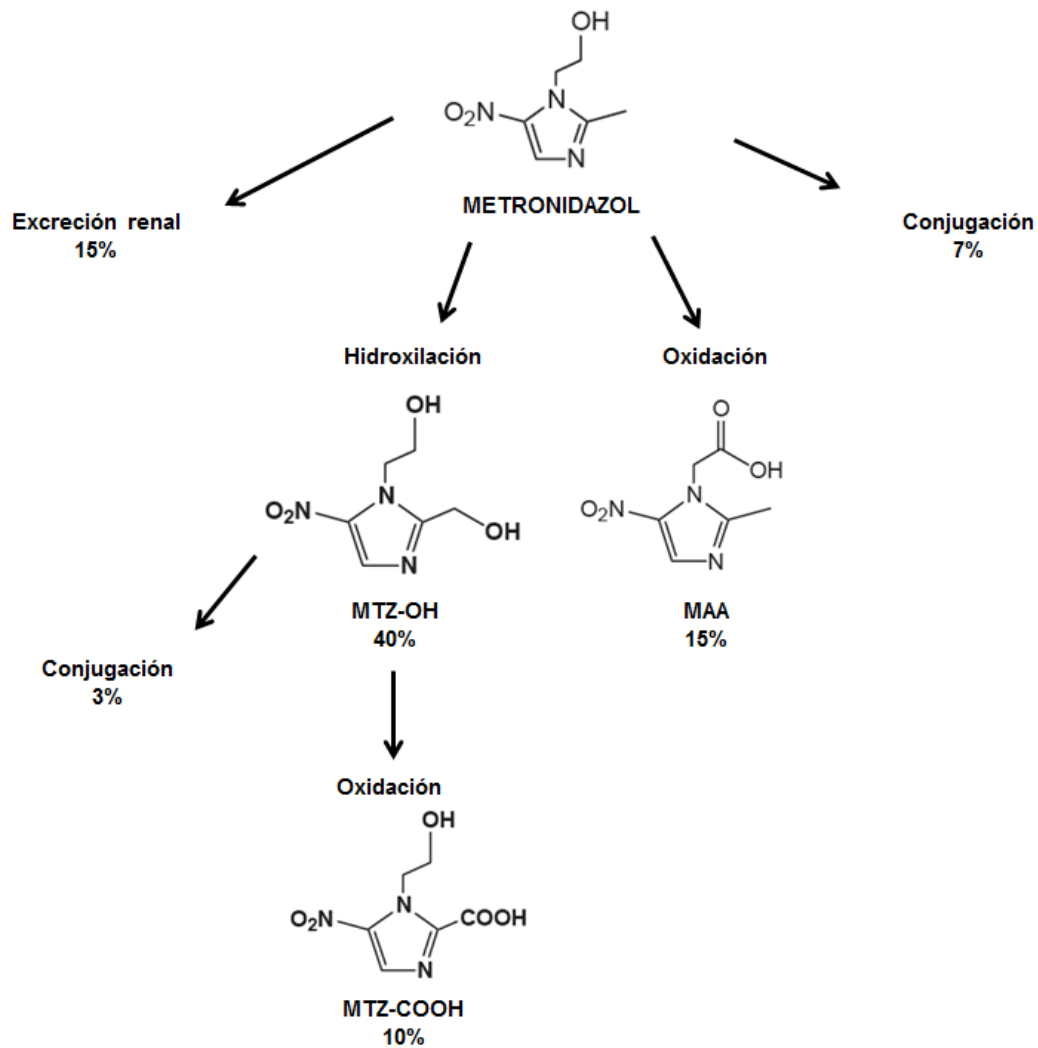


Figura 2. Metabolismo del metronidazol en mamíferos tomado y modificado de Loft S, 1990 [9].

Farmacocinética

El MTZ puede ser administrado por vía: intravenosa, tópica, vaginal, rectal y oral. En humanos se absorbe rápida y casi totalmente (biodisponibilidad mayor al 90%). Se difunde bien en casi todos los tejidos y fluidos corporales [1,4], permitiendo que se alcancen concentraciones similares en plasma y otros tejidos, incluso la leche materna. El MTZ puede atravesar la barrera feto placentaria y la hematoencefalica [7].

La absorción en forma oral del MTZ es excelente, alcanza niveles detectables en plasma entre 1 y 2 h después de su administración. La concentración máxima (Cmax) en plasma es de 12 µg/mL con una dosis de 500 mg [1]. Su unión a proteínas es baja (menor al 20%), con una vida media de eliminación que oscila entre 4-12 h con un promedio alrededor de 8 h [4,10].

La eliminación en humanos es principalmente por vía renal (alrededor del 80%), mayormente en su forma de metabolitos, el MH representa el 40% de la excreción urinaria y el MAA el 15%. Se ha observado una variación interindividual del 14% en la cantidad de metabolitos formados [2]. En forma de MTZ se elimina el 20% de la dosis y del 6-15% del MTZ es excretado en las heces [4].

Efectos adversos del Metronidazol

El MTZ es generalmente muy bien tolerado sin embargo se pueden presentar reacciones adversas severas lo que lleva a suspender el tratamiento. Las más comunes ocurren en el tracto gastrointestinal: náuseas, diarrea, dolor estomacal, calambres abdominales y constipación [11].

Con menor frecuencia se presentan efectos en el sistema digestivo, como desagradable sabor metálico y vómito. Ocasionalmente se puede presentar: disuria, cistitis, sequedad bucal, salpullido, dolor de cabeza y puede ocurrir insomnio. Falta de coordinación, mareos, vértigo, encefalopatía, convulsiones y ataxia son efectos neurotóxicos raros que hacen que se interrumpa el tratamiento [11,12].

La dosis debe ser disminuida en pacientes con enfermedades obstructivas del hígado o disminución hepática, cirrosis alcohólica o disfunción renal severa [1].

Genotoxicidad y Carcinogénesis.

El MTZ ha demostrado ser mutagénico en sistemas bacterianos, induciendo principalmente sustituciones en pares de bases [4,13]. El fármaco reducido forma enlaces covalentes con las bases citosina y guanina del ADN (aductos), así como sustitución de pares de bases y rompimientos de la cadena de ADN [14].

Se ha demostrado en roedores que el efecto genotóxico del MTZ el cual se metaboliza en acetamida y ácido oxámico, compuestos altamente tóxicos que provienen del metabolismo de la flora intestinal y que son capaces de dañar al ADN [2].

Es capaz de inducir tumores en ratas y ratones de manera género-selectiva, ya que se ha observado que incrementa la formación de tumores testiculares y de pituitaria en ratas macho y de hepatomas y mamarios en ratas hembra [2]. También se ha reportado la inducción de tumores pulmonares en ratones machos [2], linfomas en ratones hembras y cáncer de colon en ratas [2, 15].

Se han propuesto tres hipótesis sobre el posible origen del efecto genotóxico del MTZ en las células humanas. La primera es la nitro-reducción la cual podría generar metabolitos que dañen al ADN; la segunda propone que el metabolismo bacteriano en el intestino es el generador de compuestos genotóxicos. Sin embargo, los productos del proceso de nitro-reducción son de vida muy corta y éstos junto con la acetamida y el ácido oxámico, se forman en pequeñas cantidades para dar cuenta de la genotoxicidad de éste. La última, es la participación del MH producido por el metabolismo oxidativo [2], el cual se forma en cantidades mucho más grandes y ha demostrado ser mutagénico en sistemas bacterianos. Asimismo, es capaz de producir rompimientos de cadena sencilla, aberraciones cromosómicas (AC), MN y la inducción de *p53* [1,2].

Se ha observado que entre las personas tratadas con MTZ, las que tienen concentraciones más bajas en plasma del fármaco son las que presentan el

mayor daño en el ADN lo que está probablemente relacionado con una mayor producción del MH [2].

GENOTOXICIDAD

Estudia los efectos que ejercen los agentes químicos, físicos y biológicos en la integridad, expresión y regulación del material genético de los organismos. En la evaluación de las sustancias se busca reconocer aquellas con actividad genotóxica, con el fin de identificar el riesgo de exposición a éstas, así como caracterizar la relación dosis-respuesta y los mecanismos implicados en el efecto [16,17]. Asimismo, el daño al ADN puede ocasionarse a través de un proceso biológico alterado. Si estos daños no son reparados, la replicación del ADN puede dar por resultado una lesión permanente y en presencia de un promotor de tumor, originar células preneoplásicas, neoplásicas y finalmente metástasis. La célula posee diferentes mecanismos de respuesta a fin de mantener la fidelidad e integridad de la información genética [18].

BIOMARCADORES

Son indicadores de la variación de componentes o procesos bioquímicos o celulares que pueden ser medidos en muestras biológicas [19, 20].

Los biomarcadores pueden ser de:

1. Exposición: Miden la concentración del xenobiótico o de sus metabolitos y su análisis se realiza en fluidos biológicos [21].
2. Efecto: Determinan los cambios fisiológicos, bioquímicos, genéticos o moleculares que ocurren en las células o en los tejidos [21].
3. Susceptibilidad: implica una interacción especial del xenobiótico con las características genéticas del individuo [21, 22].

Con respecto a los de efecto, existen múltiples pruebas para detectar la inducción de daño genético en humanos tanto *in vivo* como *in vitro*, entre las cuales se encuentran: las AC, el intercambio de cromátidas hermanas (ICH), la electroforesis unicelular en gel o ensayo cometa, el ensayo de micronúcleos (MN), entre otras [23].

ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

El ensayo de MN es una de las técnicas más empleadas para el monitoreo del daño cromosómico inducido por agentes clastogénicos o aneugénicos en cultivos de linfocitos humanos. Su análisis también puede realizarse en células como fibroblastos y exfoliadas de epitelio bucal y de orina [24]. Es un ensayo para evaluar la genotoxicidad de sustancias (exposiciones agudas y crónicas) y es una de las más usadas para identificar agentes cancerígenos [25, 26].

Los MN son corpúsculos de cromatina separados del núcleo principal que se forman durante la transición de metafase a anafase. Se encuentran en el citoplasma y se originan a partir de rompimientos de cromosomas que pueden ocurrir en G1 o G2, o bien, por cromosomas que sufren rezago anafásico (daño del huso acromático) o inactivación del centrómero [27, 28, 29].

Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.

El ensayo de MN con el bloqueo de la citocinesis (BC) es un método muy utilizado para medir la frecuencia de MN en cultivos celulares humanos y de otros mamíferos [30]. Las células son tratadas con Citocalasina-B (CytB), metabolito aislado del hongo *Helminthosporium dematoideum* que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis ya que no permite la formación del anillo contráctil durante la telofase mitótica, originando células binucleadas (BN) que han sufrido una sola división (Figura. 3) [31].

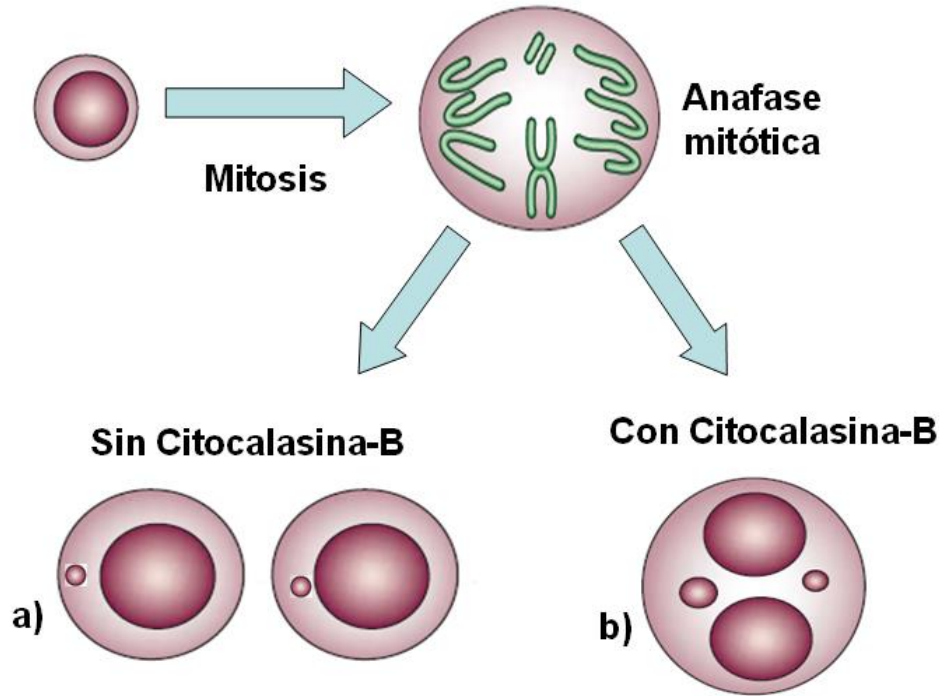


Figura 3. Formación de MN debido a la pérdida de un cromosoma entero y fragmentos cromosómicos de tipo acrocéntrico en anafase mitótica. a) Células mononucleadas con MN sin citocalasina B y b) Célula binucleada con MN en presencia de citocalasina-B. Tomado y modificado de Fenech M, 2007 [32].

El bloqueo de la citocinesis permite distinguir fácilmente entre células mononucleadas (Mo) las cuales no se han dividido y las células BN o polinucleadas (PN), las cuales han completado dos o más divisiones celulares (Figura. 4) [32]. Esto permite identificar los MN en células que únicamente se han dividido una sola vez.

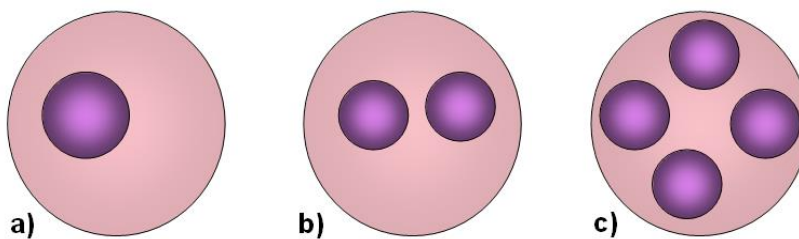


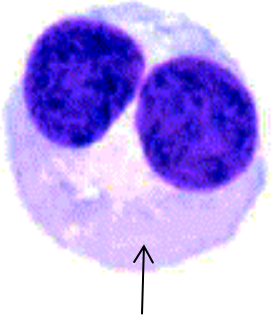
Figura 4. Divisiones celulares observadas en el ensayo de MN: a) Célula mononucleada, b) Célula binucleada y c) célula polinucleada. Tomado y modificado de Fenech M. 2007 [32].

Existen diversos factores que pueden influir en la frecuencia basal de MN: la edad, el género (las mujeres presentan una frecuencia basal superior a la de los

hombres), la entrada en la menopausia, el desarrollo de osteoporosis el tabaquismo, la deficiencia de ácido fólico y la de vitamina B12 [24].

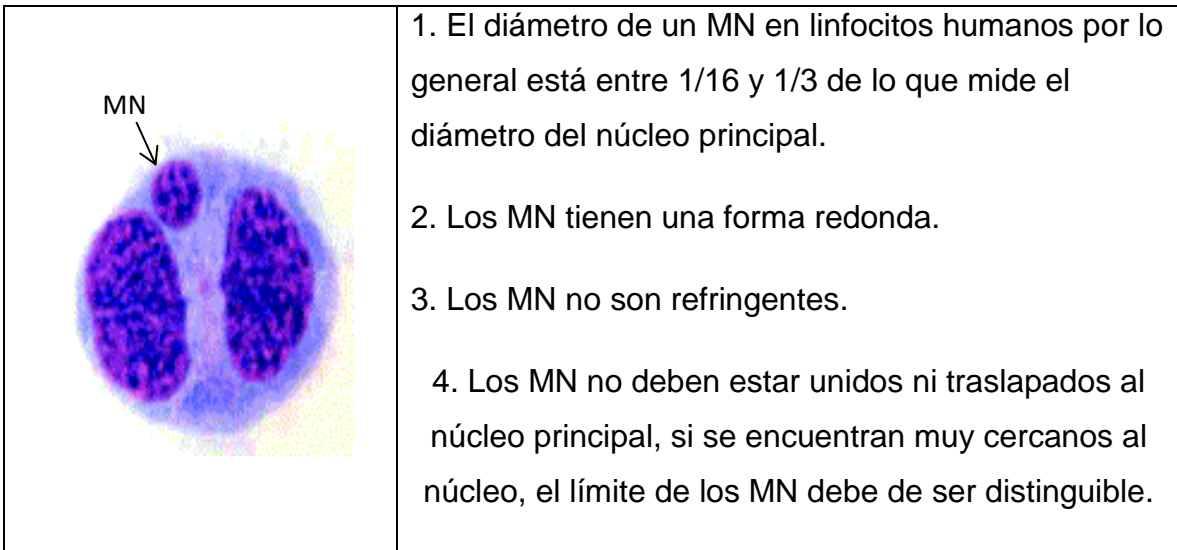
Criterios para evaluar células binucleadas.

Las células BN en las cuales se evalúa la frecuencia de MN deben tener las siguientes características [33]:

 <p>Célula BN</p>	<ol style="list-style-type: none">1. Células binucleadas (solo con una división).2. Los límites de la membrana de la célula BN deben estar claramente distinguibles e intactos (sin rasgaduras o rompimientos).3. Los núcleos de la célula BN, deben tener su membrana nuclear intacta y dentro del citoplasma.4. Los dos núcleos deben tener el mismo tamaño aproximadamente y con la misma tinción.5. Ambos núcleos de la célula BN pueden tocarse pero no sobrelaparse entre ellos.
---	--

Criterios para determinar micronúcleos.

Los MN deben ser morfológicamente idénticos y más pequeños que los núcleos principales y deben tener las siguientes características [33]:



ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL O ENSAYO COMETA.

La electroforesis unicelular en gel es un método ampliamente utilizado en ensayos *in vitro* e *in vivo* para la detección de agentes con un potencial genotóxico [34].

Es una prueba sencilla, rápida y sensible que nos permite evidenciar el daño al ADN por rupturas de cadena doble, cadena sencilla y sitios álcali-lábiles en un pequeño número de células, ocasionado por diferentes agentes físicos, químicos y/o biológicos [35,36,37,38].

El método consiste en embeber células en un gel de agarosa, las cuales se lisan y se someten a una electroforesis. Durante la electroforesis, el daño presente en el ADN migra fuera del núcleo celular hacia el ánodo y forman una cauda o cola cuyo tamaño corresponde al daño al ADN de la célula [35,36,39].

La magnitud del daño se evalúa de acuerdo a la longitud de la cola y a la intensidad de la fluorescencia de los fragmentos. Con algunas modificaciones, esta técnica puede usarse para evaluar si hay alteración de los mecanismos de reparación (ensayo cometa con “reto”) [35,39,40].

Su uso ha aumentado en los últimos años. Este amplio uso se debe principalmente a que es muy versátil, en donde prácticamente cualquier tipo de tejido puede ser empleado y sólo se requiere de un bajo número de células. Dadas estas ventajas, se ha convertido en una prueba ideal en comparación a otros [41].

Ensayo de cometa en la evaluación de la capacidad de reparación del ADN

Los mecanismos de reparación del ADN constituyen un sistema de defensa contra los efectos de los agentes genotóxicos. En las células en proliferación la mayoría del daño es eliminado antes de que entren en el proceso de replicación, sin embargo, en algunos casos este daño no se repara y se puede fijar como mutaciones en el ADN. Es evidente que la capacidad de reparación puede influir en el riesgo de cáncer [42].

Mediante el ensayo cometa se puede evaluar la eficiencia de la reparación [43]. Consiste en exponer a las células dañadas con un agente inductor de daño (H_2O_2), dejar incubar por un tiempo determinado, lavar para eliminar el compuesto, dejar en recuperación durante intervalos de tiempo establecidos y finalmente someter a las células a electroforesis unicelular en gel para evaluar el daño remanente [34].

Se ha observado que aproximadamente el 50% del daño se repara en los primeros 15 minutos y la reparación total se efectúa en una o dos horas posteriores al tratamiento [43].

ANTECEDENTES.

La actividad genotóxica del MTZ ha sido estudiada por medio de diferentes ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

El MTZ ha demostrado ser mutágeno en sistemas bacterianos, induciendo sustituciones de pares de bases [2, 44]. En células de la línea CHO y médula ósea de ratón ha sido capaz de inducir un incremento de AC y anafases anormales [45]. Asimismo, se ha observado un incremento de AC y MN, infertilidad en machos y la inducción de dominantes letales en estudios realizados en ratones. Asimismo, ha producido tumores en ratas y ratones de manera género-selectiva, ya que se ha observado un incremento en la formación de tumores testiculares y de pituitaria en ratas macho, así como hepatomas y tumores mamarios en ratas hembra. También se ha reportado la inducción de tumores pulmonares en ratones machos y linfomas en ratones hembras [2, 15].

En un estudio realizado en nueve ovejas tratadas con dosis terapéuticas humanas de MTZ (1 g por día durante 10 días) mediante el ensayo HPRT, no se encontró la inducción de mutaciones importantes como grupo, pero sí una relación entre la concentración del medicamento en plasma y la frecuencia de mutaciones en linfocitos. Así que aquellos animales que presentaron las tasas más lentas de eliminación de MTZ fueron los que tenían las mayores tasas de mutación [2,46].

Los resultados observados en poblaciones humanas expuestas terapéuticamente al compuesto son controversiales. Se ha observado que el MTZ y su MH tienen la capacidad de inducir rompimientos de cadena sencilla y AC [2]. En linfocitos de sangre periférica de 15 pacientes con la enfermedad de Crohns tratados con MTZ por varios meses, se observó un incremento significativo en AC [4]. Reitz y colaboradores estudiaron a 10 pacientes femeninas con *Trichomonas vaginalis*, a las que se les trató con 3 dosis de 400 mg por día durante 4 días, encontrando un incremento significativo en rompimientos de cadena sencilla de ADN [47]. Menéndez y colaboradores (2001) evaluaron el efecto genotóxico en 10 sujetos sanos tratados con 3 dosis de 500 mg por día de MTZ durante 10 días. Los

resultados mostraron un incremento significativo en 2 de los 10 sujetos al analizar AC, MN y rompimientos de cadena sencilla. Otro hallazgo fue que las concentraciones del MTZ en plasma correlacionaron inversamente con el daño al ADN. Así los sujetos con altas concentraciones del fármaco tenían el menor daño [48]. Estos autores sugieren que el daño al ADN puede ser generado por los metabolitos oxidados antes que por el mismo compuesto parental. Sin embargo, Salamanca y colaboradores encontraron resultados negativos al determinar AC en medula ósea de infantes tratados con este fármaco [49].

Los datos sobre la carcinogénesis del MTZ para los seres humanos son ambiguos. Los datos disponibles de estudios epidemiológicos son insuficientes para evaluar la relación entre la exposición humana al MTZ y el cáncer. Se ha encontrado que causa un incremento en la incidencia de cáncer de cuello uterino y cáncer de pulmón en estudios de mujeres tratadas por infecciones causadas por *Trichomonas vaginalis*. Sin embargo se ha dicho que la tricomoniasis es un factor de riesgo para cáncer de cuello uterino y el incremento en cáncer de pulmón se atribuye al hábito de fumar, deslindando así al MTZ como posible inductor [49].

A la fecha, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) lo considera carcinógeno en animales, pero sin suficiente evidencia para serlo en humanos (grupo IIB) [50].

3. JUSTIFICACIÓN.

El metronidazol es un compuesto ampliamente utilizado en la terapia antiparasitaria a nivel mundial y está considerado como un medicamento inocuo. Sin embargo, presenta un efecto genotóxico en diferentes modelos experimentales, aunque este efecto en humanos es controvertido. Por este motivo es necesario ver si estas diferencias en el daño al ADN son debidas a una susceptibilidad individual.

4. HIPÓTESIS.

El tratamiento con metronidazol en humanos producirá daño al ADN, lo que se reflejará en un aumento en la frecuencia de micronúcleos así como en rompimientos de la cadena del ADN. Este daño será dependiente de la susceptibilidad individual y podría estar relacionado con la disminución en la capacidad de reparación de las células.

5. OBJETIVO.

Evaluar el efecto genotóxico del metronidazol en linfocitos de sangre periférica de individuos tratados con dosis terapéuticas para parasitosis intestinal.

Objetivos particulares.

Evaluar el efecto del metronidazol en la proliferación celular mediante el índice de división nuclear.

Evaluar el daño al ADN causado por el metronidazol mediante el ensayo de micronúcleos.

Evaluar el daño al ADN causado por el metronidazol mediante el ensayo cometa.

Determinar la capacidad de reparación de las células por la exposición al metronidazol mediante el ensayo cometa con reto.

Correlacionar la frecuencia de micronúcleos con la capacidad de reparación celular.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

Sujetos de estudio.

Participaron en el estudio 19 donadores aparentemente sanos, entre 19 y 23 años de edad, interesados en un tratamiento para desparasitarse. Se les pidió llenar un cuestionario y firmar un consentimiento informado.

Tratamiento.

Antes del tratamiento con MTZ se obtuvo de los individuos participantes sangre periférica (aproximadamente 10 mL) en tubos vacutainer con heparina. Se les trató con MTZ (Flagil, Laboratorios Sanofi) 3 dosis de 500 mg por día durante 8 días. Al término, se procedió a la toma de la segunda muestra sanguínea la cual se llevó a cabo 8 h después de la última toma de medicamento.

Aislamiento de linfocitos.

Previo a la separación de linfocitos, se apartaron 150 μ L de sangre completa para el ensayo cometa.

La separación de los linfocitos de la sangre completa se llevó a cabo mediante un gradiente por densidad. Se utilizaron tubos cónicos de 15 mL conteniendo 5 mL de Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO), e igual volumen de sangre completa, el cual se deposita por estratificación. Se centrifuga durante 20 min a 1600 rpm. De esta manera se obtiene un anillo de células blancas, el cual se recupera cuidadosamente. Se lavaron con 10 mL de medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) y se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min. Se retiró el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en 1 mL de medio RPMI-1640 para el conteo de linfocitos para el ensayo de MN.

Conteo celular.

En un tubo eppendorf se colocaron 900 μ L de medio RPMI-1640, 80 μ L de azul tripano (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) y 20 μ L de las células resuspendidas. Para el recuento de linfocitos, se utilizan los cuatro cuadrantes externos de una cámara de Neubauer. El número de células se determina con la fórmula:

$$\mathbf{N_o\ cel/mL = N_o\ células\ contadas/4 \times 50 \times 10000.}$$

Ensayo de Micronúcleos.

En 5ml de medio RPMI-1640 suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich, St. Louis MO), 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) y 10% de suero fetal bovino (PAA) se sembraron 1×10^6 linfocitos. La proliferación de los linfocitos se estimuló mediante la adición al cultivo de 150 μ L de Fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich, St. Louis MO) como mitogéno, las células se incubaron a 37°C. La Citocalasina B (6 μ g/mL CytB, Sigma-Aldrich, St. Louis MO) se aplicó durante las últimas 24 h del cultivo y la cosecha celular se realizó a las 72 h.

Al término de las 72 h de cultivo, las células se prefijaron añadiendo 1 mL de solución fijadora fresca Carnoy (metanol:ácido acético glacial 3:1), los tubos se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 1200 rpm por 10 min. Se les retiró el sobrenadante. Se fijaron y lavaron con 5 mL de fijador 3 veces más siguiendo el mismo procedimiento. Se prepararon las laminillas por duplicado y se codificaron. Se tiñeron con Hemacolor (Merck, Germany) por 8-12 segundos, para su evaluación al microscopio (Olympus BH-2).

Para determinar el efecto genotóxico del MTZ, se determinó la frecuencia de MN en 1000 linfocitos BN por laminilla.

La cinética de proliferación de linfocitos fue analizada en 200 células, determinando la frecuencia de células Mo, BN y PN (Figura 4). La proliferación

celular, se determinó mediante el índice nuclear (IN), utilizando la siguiente ecuación:

$$\mathbf{IN = [Mo + 2BN + 3PN]/200.}$$

En la Figura 5 se presenta el diagrama de flujo del procedimiento para el ensayo de MN y el IN.

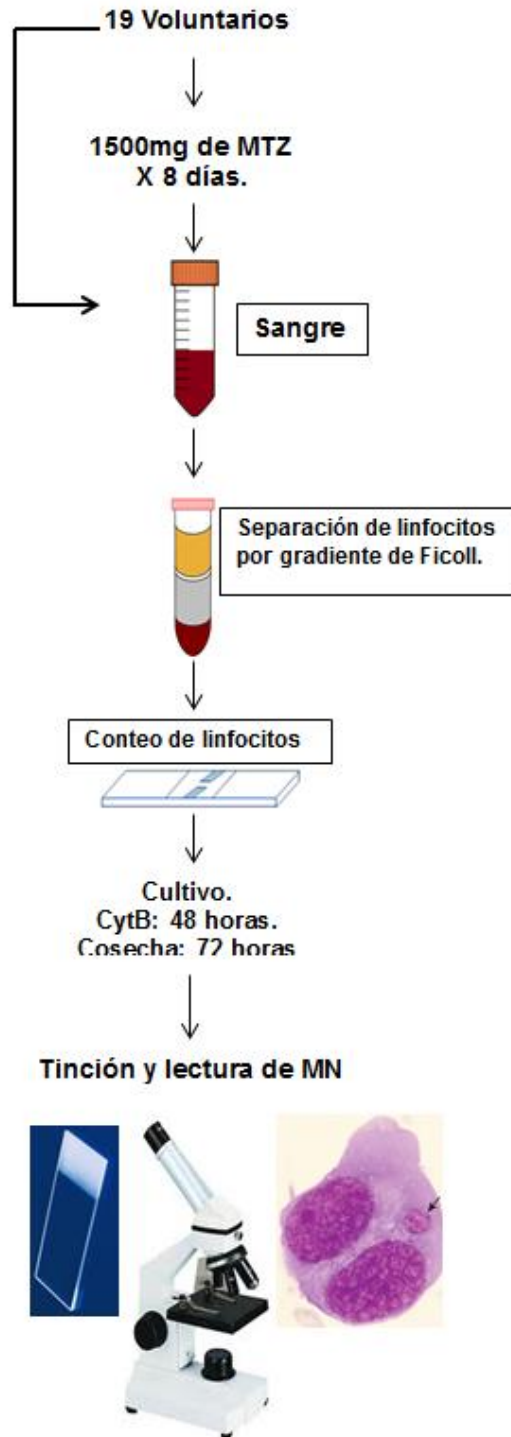


Figura 5. Diagrama de flujo del ensayo de micronúcleos e índice nuclear.

Ensayo Cometa con “reto”.

Se prepararon tubos eppendorf previamente etiquetados (C, T₀, T₃₀, T₆₀, NHU) conteniendo 1000µL de medio de cultivo RPMI-1640 por cada individuo. A todos, excepto al control (C) se les adicionaron 10µL de H₂O₂ (100 µM) como agente inductor de daño celular y al marcado como NHU, se le adicionaron 10 µl de n-hidroxiurea (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) como inhibidor de la reparación. A cada tubo se agregaron 20 µL de sangre periférica. Se dió un tiempo de exposición de 10 min. Trascurrido este tiempo, las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, se les retiró el sobrenadante y se les adicionó 1 mL de medio RPMI-1640. Se incubaron a 37°C durante 0 min el tubo (T₀), 30 min (T₃₀) y 60 min (T₆₀ y NHU).

Preparación de laminillas.

Se prepararon portaobjetos con 150 µL de agarosa de punto normal de fusión (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) al 0.5% extendida y secada a la estufa. Al transcurrir el tiempo de cada muestra, las células se resuspendieron en 150 µL de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF, Sigma-Aldrich, St. Louis MO) al 0.5% a 37°C. Se tomaron 75 µL y se colocaron en el portaobjetos, se dejó polimerizar la agarosa a 4°C por 5 min aproximadamente. Posteriormente se agregó una tercera capa de 75 µL ABPF y se dejó polimerizar por 5 min a 4°C. Las preparaciones se colocaron en la solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris; en fresco: Triton X-1% y DMSO 10%) por una noche a 4°C. Las laminillas se prepararon por duplicado para cada condición y se codificaron.

Desenrollamiento y Electroforesis.

Pasado el tiempo de lisis se colocaron las preparaciones en la cámara de electroforesis horizontal y se sumergieron en la solución amortiguadora de electroforesis (300 mM NaOH/1 mM EDTA, pH 13), durante 20 min para el desenrollamiento del ADN; pasado el tiempo, se inició la electroforesis a 25 voltios

(V) y 300 miliamperios (mA) por 20 min. Una vez terminado el proceso, los geles se enjuagaron con solución de neutralización (Tris 0.4 M, pH 7.5) 2 veces por 1 min, se escurrió el exceso de la solución y se enjuagaron 2 veces con etanol al 96 % por 1 min, para deshidratar la agarosa. Se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para su evaluación en el microscopio (Olympus BX-60), las laminillas se tiñeron con 20 μ L de bromuro de etidio (0.1 mg/mL) y se determinó el daño al ADN como el momento de la cola mediante el software Comet Assay 4. Se cuantificaron 25 núcleos por laminilla.

En la Figura. 6 se presenta el diagrama de flujo del procedimiento para el ensayo cometa con reto.

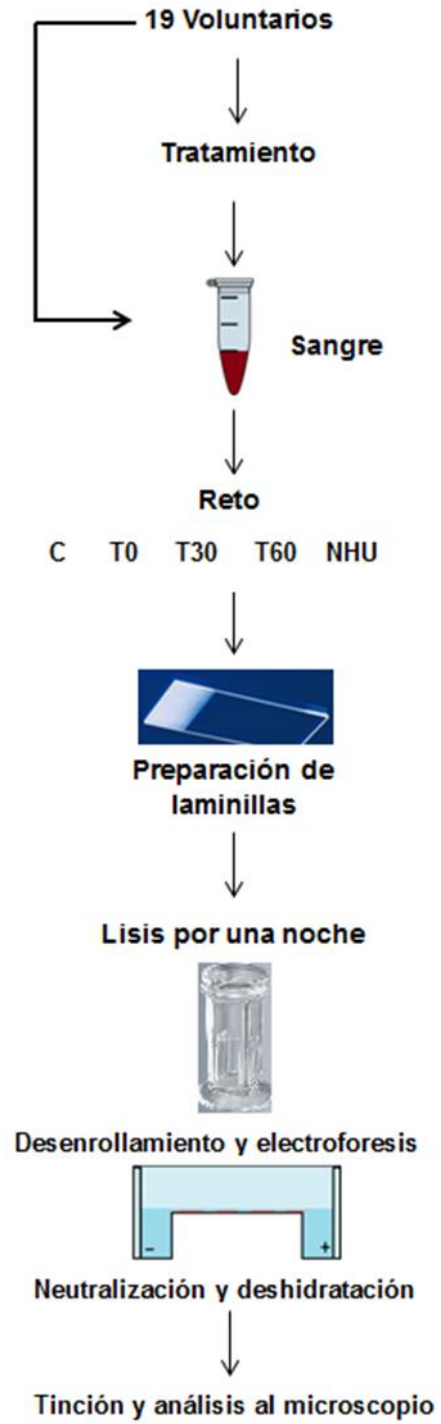


Figura 6. Diagrama de flujo del ensayo cometa con reto.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Graph Pad Prism 5.0. Todos los resultados por grupo (MN, IN y cometa) en este estudio se expresaron como promedios y desviación estándar mediante la prueba t de Student. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

Para realizar el análisis de los resultados del ensayo cometa con reto, se utilizó la prueba de ANOVA de una vía con la prueba de Dunns para comparación múltiple, utilizando graficas de distribución de cajas y bigotes. El nivel de significancia fue $p < 0.05$.

La correlación entre frecuencia de MN y momento de la cola de los diferentes tiempos de reparación después del tratamiento con MTZ se realizó mediante la correlación de Spearman y regresión lineal.

Las determinaciones de todos los experimentos se realizaron por duplicado.

8. RESULTADOS.

Efecto del MTZ en la proliferación celular.

Se analizó el índice de proliferación nuclear antes y después del tratamiento con MTZ, los resultados observados muestran que el MTZ no modifica de manera significativa la proliferación celular (Figura 7).

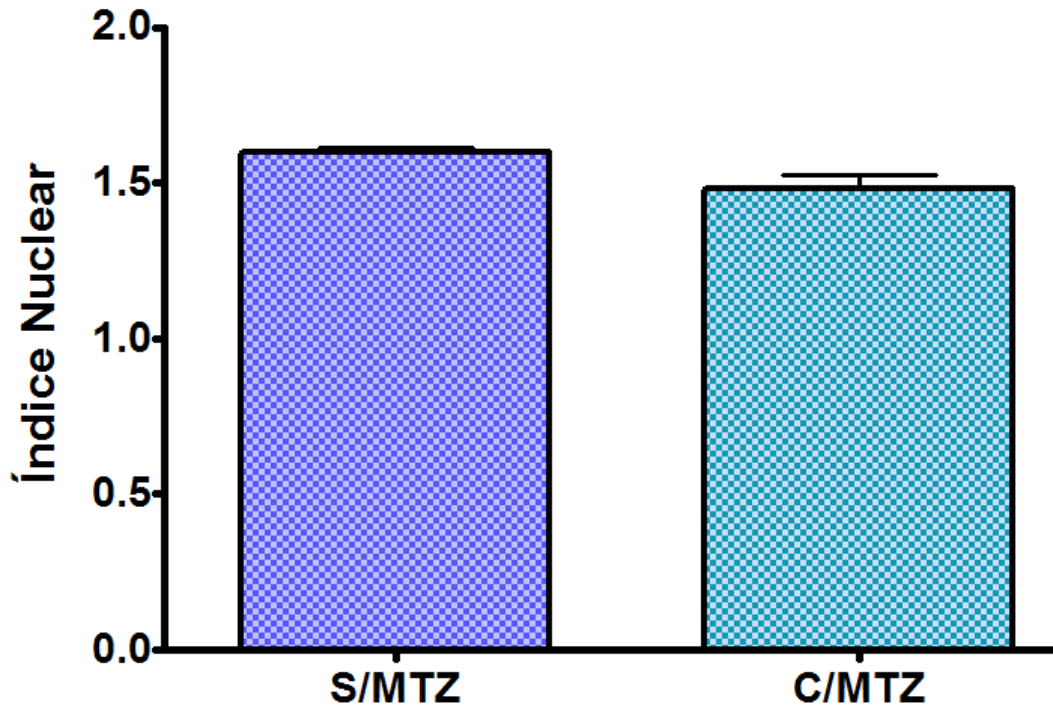


Figura 7. Efecto del MTZ en el índice nuclear. Los resultados corresponden a los promedios antes y después del tratamiento de 19 individuos. Prueba t de Student. $p=0.3229$.

Efecto genotóxico del MTZ por medio del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.

A los 19 voluntarios, se les tomó una muestra de sangre periférica antes y después del tratamiento con dosis terapéutica del fármaco.

Se evaluó la genotoxicidad que presenta el MTZ en los individuos participantes. Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo como grupo en la frecuencia de MN después del tratamiento, con una $p=0.002$ (Figura 8).

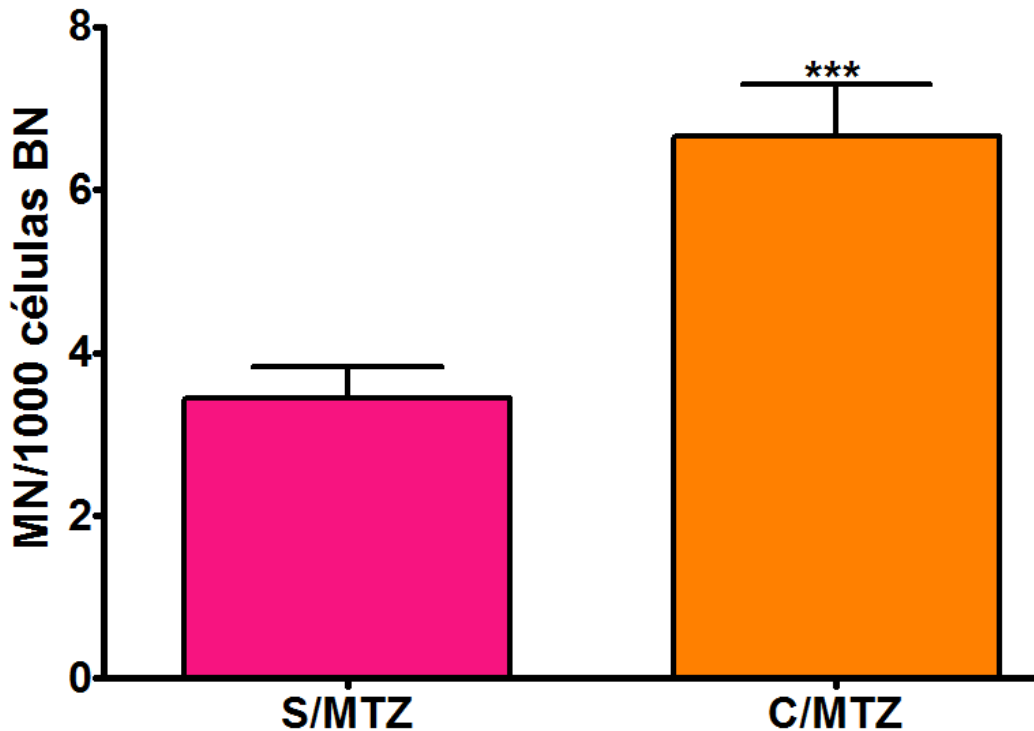


Figura 8. Efecto genotóxico del MTZ mediante el ensayo de micronúcleos. Los resultados corresponden a los promedios antes y después del tratamiento. Prueba t de Student. *** $p=0.002$

Al analizar los resultados, se observaron diferencias individuales en la frecuencia de MN (Figura 9), las cuales se agruparon en tres grupos de acuerdo al

incremento en el número de MN normalizados contra su valor basal antes del tratamiento (Figuras 10).

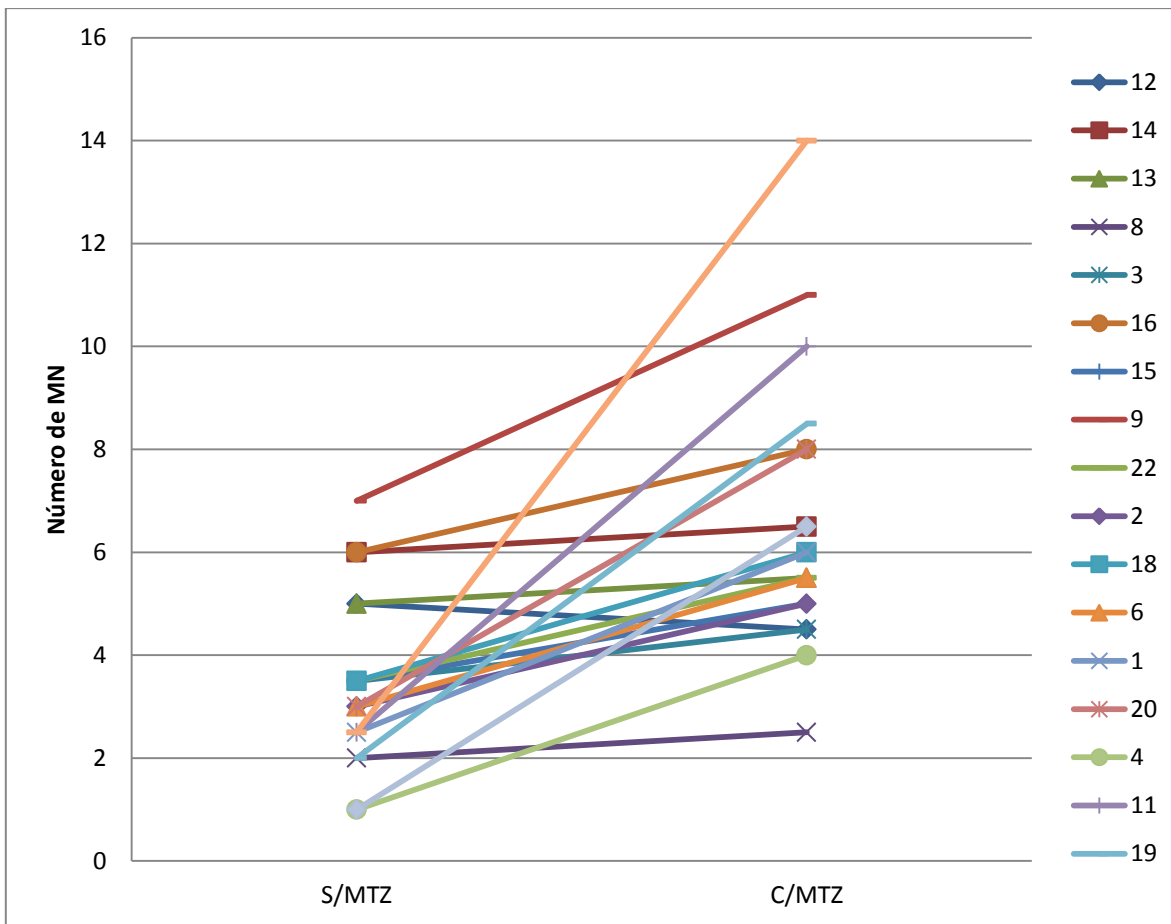


Figura 9. Diferencias en la frecuencia de MN antes y después del tratamiento.

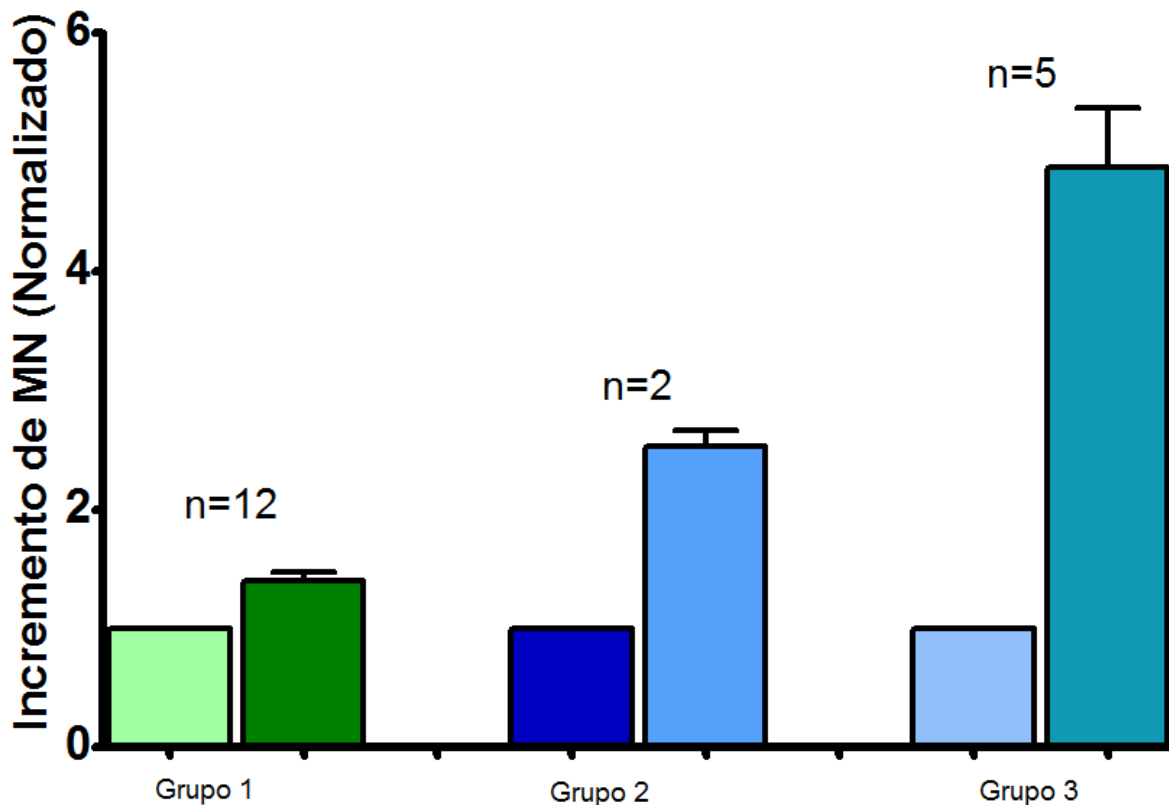


Figura 10. Frecuencia de MN normalizada antes y después del tratamiento. Grupo 1) Individuos con incremento menor al doble de su valor inicial; Grupo 2) Individuos con incremento mayor al doble pero menor a cuatro veces su valor inicial y Grupo 3) Individuos con incremento mayor a cuatro veces el valor inicial.

Daño al ADN y efecto en los mecanismos de reparación inducidos por MTZ mediante el ensayo cometa.

Se analizó el efecto del MTZ a través del ensayo cometa para determinar rompimientos de una cadena del ADN. Se compararon de manera grupal las lecturas basales del momento de la cola antes y después del tratamiento con MTZ. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el daño al ADN causado por el MTZ en los individuos participantes después del tratamiento (Figura 10).

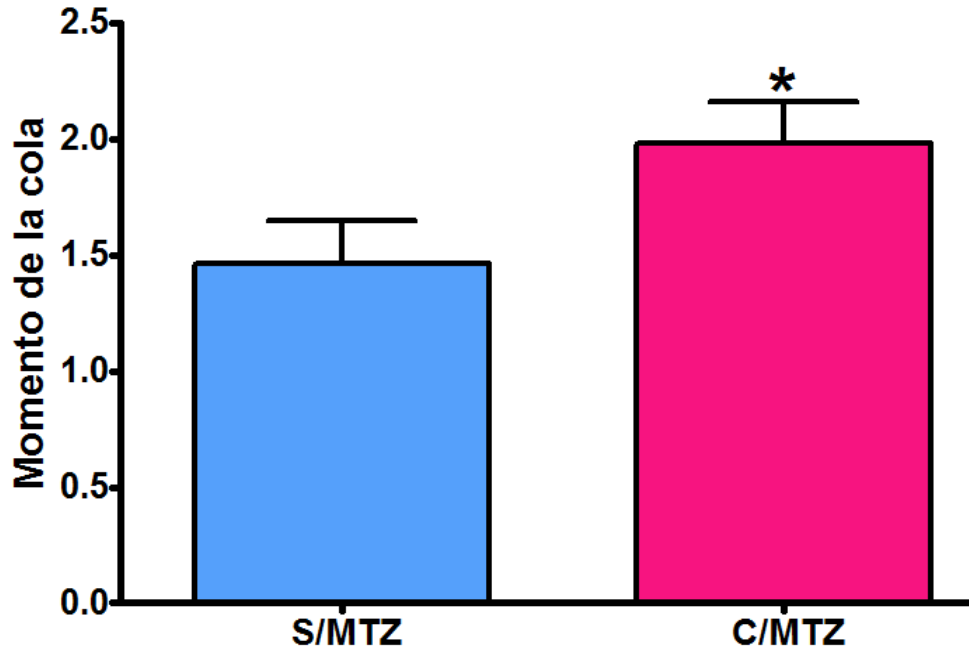


Figura 11. Efecto genotóxico del MTZ mediante el ensayo cometa. Los resultados corresponden a los promedios antes y después del tratamiento. Prueba t de Student. * $p < 0.05$

El ensayo del reto consistió en exponer las muestras sanguíneas a un agente inductor de daño (H_2O_2) durante 10 min, después de los cuales, las células se lavaron por centrifugación y se dejaron durante 30 y 60 min para permitir la reparación del daño al ADN.

Los resultados muestran que la sangre de los individuos antes del tratamiento con MTZ, comenzó a reparar desde los 30 min, alcanzando los niveles basales a los 60 minutos (Figura. 11a). La sangre de los individuos después del tratamiento con MTZ, mostró diferencias significativas en los tiempos 30 y 60 minutos de reparación con respecto a su basal (Figura. 11b).

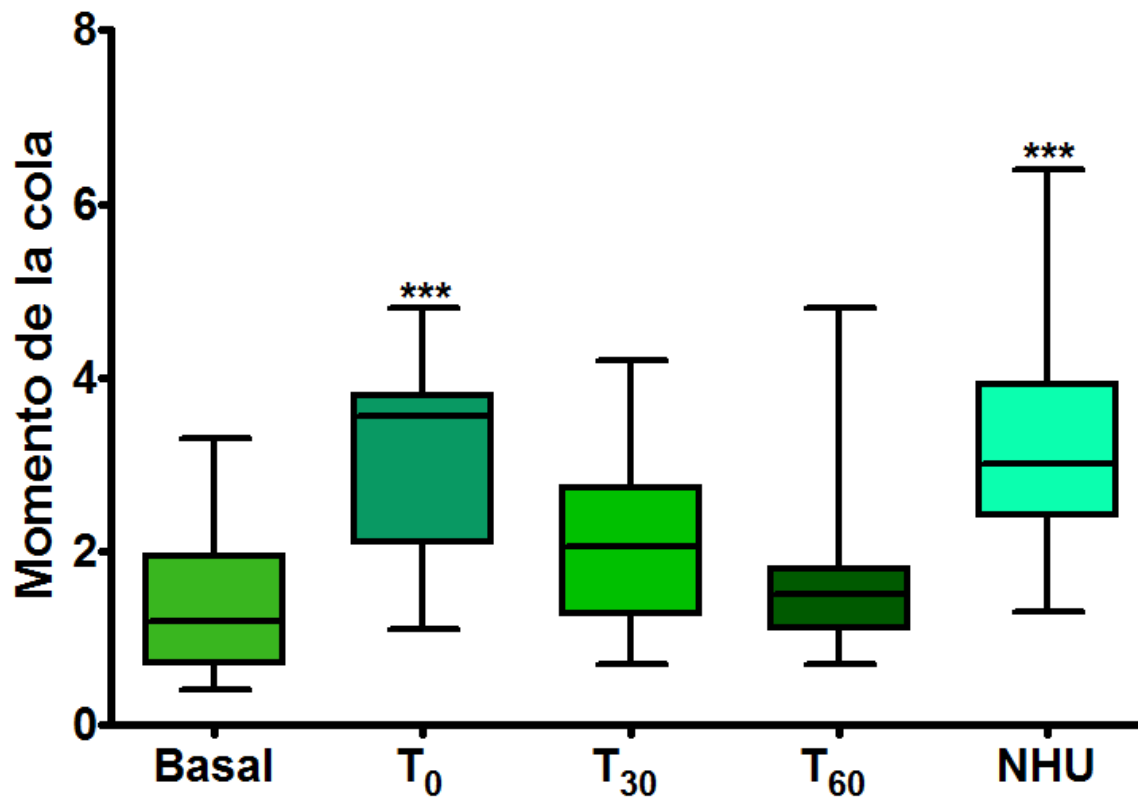


Figura 12a. Reparación celular mediante el ensayo cometa con reto, antes del tratamiento con MTZ. ANOVA de una vía con la prueba de Dunns para comparación múltiple. *** $p < 0.0001$ con respecto al valor basal.

Las muestras después del tratamiento con MTZ, no alcanzaron los niveles basales aún después de los 60 minutos de reparación, por lo que se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la basal en el T₀, T₃₀, T₆₀ y NHU (Figura. 11b).

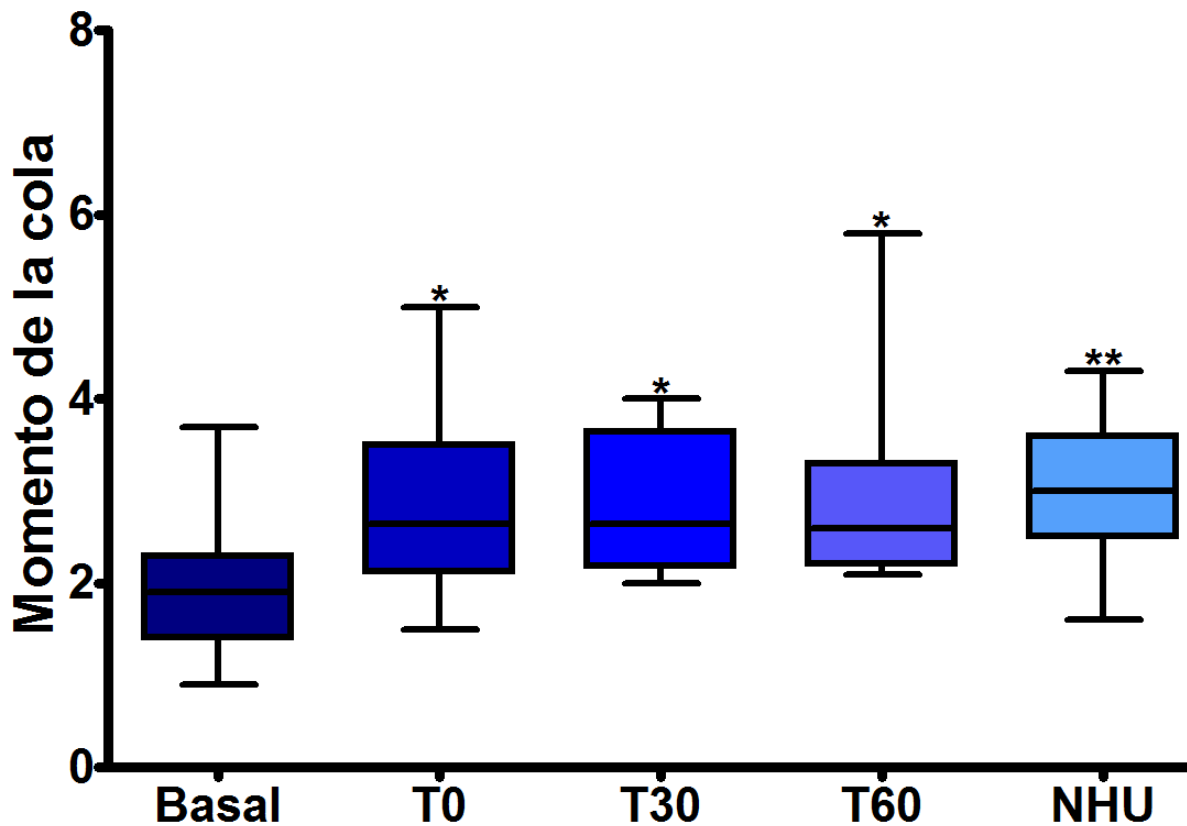


Figura 12b. Reparación celular mediante el ensayo cometa después del tratamiento con MTZ. ANOVA de una vía con la prueba de Dunns para comparación múltiple. * $p < 0.05$ con respecto al valor basal.

Correlación entre la frecuencia de MN y momento de la cola de los tiempos de reparación después del tratamiento con MTZ.

Con el fin de determinar si el incremento en el número de MN ocasionado por el tratamiento con MTZ pudiera estar asociado al retardo en la reparación, se realizaron las correlaciones y las regresiones lineales entre la frecuencia de MN y el momento de la cola en las condiciones basales y a los tiempos 30 (T_{30}) y 60 (T_{60}) minutos de reparación (Figura. 12). Al comparar la frecuencia de MN con el momento de la cola después del tratamiento, no se encontró una correlación significativa del daño al ADN con el grupo basal y el T_{30} (Figura. 12a y b). Sin embargo, entre la frecuencia de MN y el T_{60} de reparación, se encontró una

correlación significativa ($p < 0.05$), a pesar de tener un $r^2 = 0.4150$. Esto sugiere que los individuos que no alcanzan a recuperar los niveles basales de daño aun después de 60 minutos de reparación, pudieran tener alguna alteración en sus mecanismos de reparación que estuviera ocasionando una mayor frecuencia de MN (Figura. 12c).

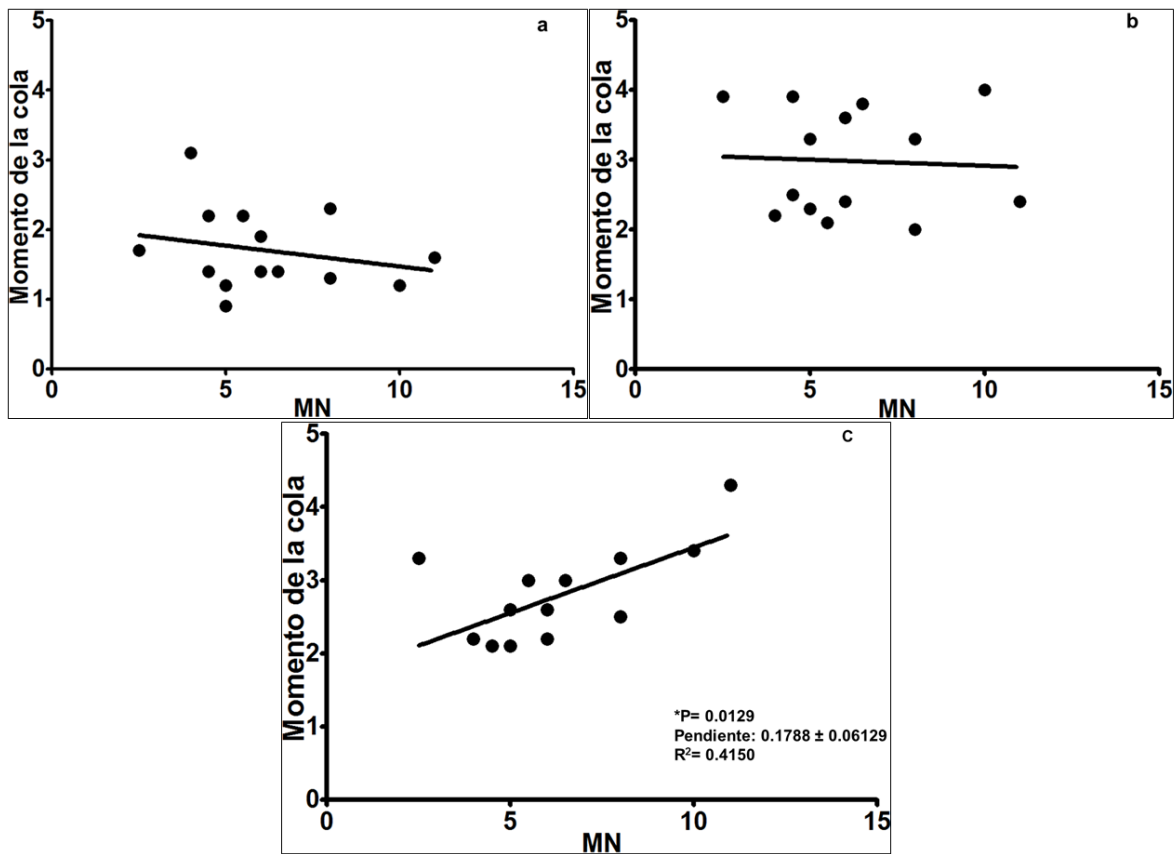


Figura 13. Correlación entre frecuencia de MN y momento de la cola después del reto con H_2O_2 en linfocitos de los individuos tratados con MTZ. a) Momento de la cola basal; b) Momento de la cola después de 30 minutos de reparación; c) Momento de la cola después de 60 minutos de reparación. Se analizaron las muestras de 14 individuos que contaban con los ensayos completos. Análisis estadístico: correlación de Spearman y regresión lineal.

10. DISCUSIÓN.

El MTZ es uno de los medicamentos más ampliamente utilizados en todo el mundo para el tratamiento de parasitosis, sin embargo, la capacidad que éste presenta para inducir un efecto genotóxico en células humanas es un tema controversial [1].

En este estudio se evaluó el efecto genotóxico del MTZ, el cual se realizó en 19 voluntarios tratados con dosis terapéuticas de MTZ. Los resultados indican que el MTZ fue capaz de producir un incremento en la frecuencia de micronúcleos, así como en el daño al ADN determinado mediante el ensayo cometa.

Es importante señalar que en este estudio se encontraron diferencias individuales en el efecto genotóxico del MTZ. Se observó un incremento de MN con respecto a las muestras tomadas previas al tratamiento. Dicho incremento se pudo categorizar en tres grupos: 1) un grupo de 12 individuos con un incremento menor al doble; 2) un grupo de 2 individuos con un incremento mayor al doble, pero menor que el cuádruple; y 3) 5 individuos que presentaron un incremento mayor de cuatro veces su frecuencia antes del tratamiento. Un comportamiento similar se había observado en un estudio previo realizado en este laboratorio, en el que se analizó la frecuencia de AC en 10 individuos tratados con MTZ, las AC se incrementaron significativamente. Sin embargo, dos individuos mostraron un menor incremento de daño al ADN, mientras que en el resto de los individuos el incremento fue de al menos el 100% después de la administración de MTZ [15]. Estas diferencias en la respuesta pueden estar dadas por genes relacionados con el metabolismo del MTZ [51]. Se ha propuesto que el MTZ es metabolizado por enzimas de la familia del citocromo P450, produciendo dos metabolitos principales el MH y el MAA, siendo el primero más mutagénico que el mismo MTZ [44]. De esta manera, en el laboratorio se propone que los individuos que metabolicen el MTZ produciendo una mayor cantidad del MH, serán los que tendrán un mayor efecto genotóxico. Esta correlación será necesaria realizarla obteniendo el perfil metabólico de cada individuo.

Por otro lado, se ha observado *in vitro* que el MTZ activa al gen *p53* (gen supresor de tumores), el cual está considerado como el “guardián del genoma” por su capacidad de detectar daño al ADN y enviar señales a la célula para que de acuerdo al grado de daño, ésta se repare o se active la vía de apoptosis. Menéndez y col ^[13], demostraron que el MH fue capaz de inducir MN en las líneas celulares (RKO y HeLa) con *p53* funcional y que tanto el MTZ como el MH indujeron MN en líneas celulares deficientes de la función de *p53* (RKO-E6, C33-A y Jurkat). Además, los niveles de la proteína de P53 también se incrementaron en las células, sugiriendo que probablemente esto se deba a una disminución del MTZ relacionada principalmente con la producción de MH.

En relación a los rompimientos de cadena sencilla del ADN, Reitz y colaboradores ^[47] encontraron en pacientes con *Trichomonas vaginalis*, aumento significativo de éstos, inmediatamente después del tratamiento con MTZ, mismo que regresó a sus valores basales después de 7 días. En contraste, Lambert B. y colaboradores en 1979 ^[52] no encontraron efectos genotóxicos *in vitro* debido al MTZ y sus dos principales metabolitos, al analizar la frecuencia de AC, ICH y la inducción de la síntesis de reparación del ADN en linfocitos humanos. Sin embargo, en otro estudio en el que se evaluó el efecto genotóxico del MTZ en 10 individuos utilizando el ensayo cometa, se observaron niveles significativos de daño al ADN un día después del término del tratamiento en 9 de los 10 individuos, encontrando una correlación inversa entre el daño al ADN y las concentraciones plasmáticas de MTZ; así, los sujetos con las concentraciones más altas de MTZ fueron los que presentaron menor daño al ADN. Los autores sugieren que los rompimientos del ADN podrían haberse generado por el MH más que por el MTZ y que las diferencias individuales en la concentración del fármaco en plasma correlacionan con el efecto genotóxico ^[48]. En otro estudio realizado en 13 individuos a los que se les administró MTZ en dosis terapéutica, no se encontraron diferencias significativas en los valores de migración del ADN determinado en linfocitos mediante el ensayo cometa. Las muestras fueron tomadas 2 h después del tratamiento, la concentración de MTZ en plasma se midió mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas, encontrando valores superiores a 25 µg/mL

de MTZ. Con esto, los autores concluyen que el MTZ no es genotóxico ni carcinogénico [53]. En contraste, en nuestro trabajo se encontraron diferencias significativas en el daño al ADN medido mediante el ensayo cometa. Cabe señalar que las muestras de sangre fueron tomadas después de 8 h de la última toma del medicamento. Este es el tiempo de vida media del MTZ, con lo cual se puede asegurar la presencia de los metabolitos en el plasma y con ello la posibilidad de causar daño al ADN de los linfocitos. El incremento de daño al ADN como grupo y las diferencias individuales encontradas en este estudio, indican una posible asociación con el metabolismo de este fármaco.

En el presente trabajo también se estudió si la capacidad de reparación de las células es afectada por el tratamiento con MTZ. Los resultados obtenidos mostraron que los leucocitos de la sangre obtenida después del tratamiento con MTZ, al recibir una segunda exposición con un agente inductor de daño como el H₂O₂, fueron incapaces de reparar dicho daño, aún después de 60 minutos. Esto podría deberse a un retraso en los mecanismos de reparación

Con el fin de determinar si hay una asociación entre la capacidad de reparación de las células y la genotoxicidad inducida por el MTZ, se realizó una correlación con la frecuencia de MN y los tiempos de reparación. Se observó que los individuos que presentaron un mayor incremento en la frecuencia de MN, no alcanzaron a reparar el daño aún después de 60 min. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en el estudio realizado por Menéndez y colaboradores en el 2001 observando que el daño al ADN en 2 de 10 individuos, permanecía 15 días después del tratamiento con MTZ mientras que los niveles de rompimientos de ADN tendieron a disminuir en la mayoría de los voluntarios. Los autores sugieren que podría deberse a diferencias en la capacidad de reparación dependiente de la funcionalidad de *p53* por efecto del MTZ o sus metabolitos [48].

En resumen, nuestros resultados indican que dosis terapéuticas de MTZ son capaces de producir daño genotóxico dependiente de la susceptibilidad individual y que esta susceptibilidad podría depender del metabolismo del fármaco, así como de la capacidad de reparación de cada individuo. Es necesario realizar estudios

que asocien la genotoxicidad del MTZ con el perfil metabólico individual, que permitan demostrar que la susceptibilidad individual está dada por el MH, así como llevar a cabo estudios que analicen la participación de genes de reparación.

CONCLUSIONES.

El MTZ no generó modificaciones en la proliferación celular.

Dosis terapéuticas de MTZ produjeron efecto genotóxico, encontrándose diferencias en la frecuencia de MN producidos por acción del fármaco, lo que indica susceptibilidad individual.

El tratamiento con MTZ produjo un incremento significativo de rompimientos de cadena sencilla del ADN.

Las células de los individuos después del tratamiento con MTZ, al recibir una segunda exposición o reto (H_2O_2), no fueron capaces de reparar el daño, aún después de 60 minutos.

Se observó una correlación inversa entre el incremento en la frecuencia de MN y la capacidad de reparación celular.

12. REFERENCIAS.

1. Bendesky A, Menéndez D. Metronidazol: una visión integral. Monografía Rev Fac Med UNAM, 2001; 44: 255-259.
2. Bendesky A, Menéndez D, Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic?. *Mutat Res*, 2002; 11: 133-144.
3. Catálogo Universal de Servicios de Salud. Secretaria de Salud. 2008. Ciudad de México; P: 188.
4. Dobiás L, Cerná M, Rössner P. Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutat Res*, 1994; 317: 177-194.
5. Turgut E, Özyazici M. Bioavailability File: Metronidazole. *J Pharm Sci*, 2004; 29: 39-49.
6. Vicente D y Pérez-Trallero E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2010; 28: 122–130.
7. Raether W, Hanel H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol Res*. 2003; 90: 19–39.
8. Loft S, Otton SV, Lennard MS, Tucker GT, Poulsen HE. Characterization of metronidazole metabolism by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 1991; 41: 1127-34.
9. Loft S. Metronidazole and antipyrine as probes for the study of foreign compound metabolism. *Pharmacol Toxicol*, 1990; 66:1-31.
10. Lamp K, Freeman C, Klutman N y Lacy M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clin Pharmacokinet*, 1999; 36: 353-373.
11. Rediguieri CF, Porta V, G Nunes DS, Nunes TM, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, Barends DM. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: metronidazole. *J Pharm Sci*. 2011 May; 100: 1618-27.
12. Cheol H, Taek G, Bum Y, Joon B, Hyeon T, Cheoul H, Cho E-Y, Metronidazole-induced encephalopathy in a patient with liver cirrhosis. *The Korean Journal of Hepatology*, 2011; 17: 157-160
13. Menéndez D, Bendesky A, Rojas E, Salamanca F, Ostrosky-Wegman P. Role of P53 function in the genotoxicity of metronidazole and its hydroxi metabolite. *Mutat Res*, 2002; 501: 57-67.
14. Trinh S, Reysset G. Mutagenic action of 5-nitroimidazoles: in vivo induction of GCAECG transversion in two *Bacteroides fragilis* reporter genes. *Mutat Res*, 1998; 398: 55-65.

15. Rustia M, Shubik P. Experimental induction of hepatomas, mammary tumors and other tumors with metronidazole in noninbred Sas:MRC/W1/BR rats, *J. Natl. Cancer Inst*, 1979; 63:863–867.
16. Casarett y Doull. *Manual de Toxicología*. Editorial Mc Graw Hill, quinta edición. México, 2001: 215-214.
17. Rodríguez R. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. Serie: La ciencia para todos. Fondo de Cultura Económica: ILCE. V3. Libros Electrónicos, 1995, (visitado en Junio del 2013).
<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/124/html/toxinas.html>.
18. Verhoeven D, Verhagen R, Goldbohm R, van den Brandt P, van Poppel G. A review of mechanisms underlying antiarcinogenicity by Brassica vegetables. *Chem-Biol. Interac*, 1997; 103:79-129.
19. Garte S y Bonassi S. Linking toxicology to epidemiology: biomarkers and new technologies-special issue overview. *Mutat Res*, 2005. 592: 3-5.
20. Moller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol*, 2006. 98: 336- 345.
21. Gil F. El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. *Revista de Toxicología*, 2000; 17: 19-26
22. Ostrosky P. y Gonsebatt M.E. El Tejido Linfocitario en la Evaluación de Biomarcadores de Efecto, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, 2006.
23. Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Cebulska-Wasilewska A, Marcos R. Micronuclei in Pheripheral Blood Lymphocytes and Buccal Epithelial Cells of Polish Farmers Exposed To Pesticides, *Mutat Res*, 2001. 495:147- 156.
24. Zalacain M, Sierrasesúmaga L., Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos, *Anales Sis San Navarra*, 2005. 28: 227-236.
25. Castillo E, Guevara-Fujita M, Fujita R. Optimización del test de micronúcleos en linfocitos cultivados usando una metodología de gradiente y frotis. *Rev. Peru Biol*, 2011; 18: .261-263.
26. Abrevaya X.C, Carballo M.A, Mudry M.D. The bone marrow micronucleus test and metronidazole genotoxicity in different strains of mice (*Mus musculus*) *Genet Mol Biol*, 2007; 30: 1139-
27. Rigger M. G. *Glossary of Genetics Classical and Molecular*. Alemania, Springer Verlag, 1981; 335-339.

28. Fenech M, Holland N, Chang W, Zeiger E, Bonassi S. The HUman MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res*, 1999; 428: 272-283.
29. Hodgson E. *A Textbook of Modern Toxicology*. Tercera edición. Estados Unidos de América, 2004; 390-392
30. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res*. 2006, 30; 600: 58-66.
31. Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985; 147: 29-36
32. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*, 2007; 2: 1084-1104.
33. Fenech M, Chang W.P., Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUman Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*, 2003; 534: 65-75.
34. Rojas E, López M, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999; 722: 225-254.
35. Fairbairn D, Olive P, O'Neill K. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, 1995; 339: 37-59.
36. Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 2004; 26: 249-261.
37. Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988; 175: 184-191.
38. Dusinská M, Collins A. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 2008; 23: 191-205.
39. Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki Y. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 2000; 35: 206-221.
40. Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W, Mueller L. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*, 2004; 19: 51-59.
41. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice R. 4th International Comet Assay

Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 2003; 18: 45-51.

42. Soterios A. Variability in DNA Repair and Individual Susceptibility to Genotoxins. *Clin.Chem*, 1995; 41: 1848-1853.

43. Collins A, Horváthová E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Trans*, 2001; 29: 337-341.

44. Connor T.H, Stoeckel M, Evrad J, Legator M.S. The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans and mice, *Cancer Res*. 1977; 37: 629–633.

45. Mudry M, Carballo M, Labal de vinuesa M, Larripa I. Mutagenic bioassays of certain pharmacological drugs: III Metronidazole (MTZ). *Mutat Res*, 1994; 305: 127-132.

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

47. Reitz M, Rumpf M, Knitza R. Metronidazole induces DNA strand-breaks in cultures of human lymphocytes and phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes, *Drug Res*.1991; 41: 65–69.

48. Menéndez D, Rojas E, Herrera L, López M, Sordo M, Elizondo G, Ostrosky-Wegman P. DNA breakage due to metronidazole treatment. *Mutat Res*, 2001; 478: 153-158.

49. Salamanca F, Castañeda G, Farfán J, Santillán M.C, Muñoz O. Armendares S. Chromosome studies of bone marrow cells from metronidazole treated patients, *Ann. Genet*. 1980; 23: 63–64.

50. IARC. Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.1987; 7: 250–251.

51. Elizondo G, Gonsebat M, Salazar A, Lares I, Santiago P, Herrera J, Hong E, Ostrosky-Wegman P. Genotoxic effects of metronidazole. *Mutat Res*, 1996; 370: 75-80.

52. Lambert B, Lindblad A, Ringbarg V. Absence of genotoxic effects of metronidazole and two of its urinary metabolites on human lymphocytes in vitro. *Mutat Res*, 1979; 67: 281-287.

53. Fahrig R, Engelke M. Reinvestigation of in vivo genotoxicity studies in man. I. No induction of DNA strand breaks in peripheral lymphocytes after metronidazole therapy. *Mutat Res*, 1997; 395: 215-221.