

ARTICULOS ORIGINALES

EFFECTO GENOTÓXICO DE LA GLIBENCLAMIDA, METFORMINA Y TERAPIA COMBINADA EN LA LÍNEA CELULAR DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO CRICETULUS GRISEUS CHO-K-1

MORALES ALVARADO Jair, MURGA VALDEZ Miguel, MORENO LUJÁN Joan, LÓPEZ DEZA D¹

INTRODUCCIÓN:

Actualmente, el efecto genotóxico de los antidiabéticos orales es desconocido, motivo por el cual es necesario investigar el tema.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Modelo experimental, para evaluar el efecto genotóxico de los antidiabéticos orales mediante el Test de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) y el Test de Micronúcleos (MN). Se empleó como material células de la línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1) *Cricetulus griseus* y tabletas de glibenclamida y metformina. Las células de la línea celular fueron cultivadas en Ham's F10 suplementado con 2 % estreptomycina-penicilina, 0,5 % L-glutamina y 10 % suero bovino fetal (PBS) 20. Las células fueron agrupadas y tratadas con Glibenclamida 5 mg, Metformina 850 mg, Glibenclamida + Metformina 5/850 mg y el grupo control. Los resultados se valoraron en base al Test de Evaluación Genotóxica.

RESULTADOS:

Se observó un incremento significativo de ICH ($p < 0.05$) en el grupo de la terapia combinada (8.03 ± 0.17) con respecto al grupo control y a la metformina (6.91 ± 0.19 ; 6.94 ± 0.45) respectivamente; además se observó un incremento significativo de MN en el grupo de la terapia combinada de glibenclamida con metformina (14.44 ± 0.93), glibenclamida sola (10.18 ± 0.93) y metformina sola (7.10 ± 1.04) con respecto al grupo control (3.93 ± 0.46).

CONCLUSIÓN:

La glibenclamida más metformina produce efecto genotóxico evidenciado por medio de las pruebas ICH y el Test de MN.

Palabras clave: genotoxicidad, glibenclamida, metformina, línea celular.

¹Estudiantes del 7mo año de medicina de la UNT

GENOTOXIC EFFECT OF GLIBENCLAMIDE, METFORMIN AND COMBINATED THERAPY ON CHINESE HAMSTER'S OVARY CELL LINE CRICETULUS GRISEUS CHO-K-1

ABSTRACT

INTRODUCTION:

Actually, the genotoxic effect of the oral anti-diabetics is unknown, so its important to investigate about it. MATERIAL AND METHODS: We used the experimental design, in order to evaluate the existence of genotoxic effect of the oral antidiabetics by using Sister Chromatid Exchanges (SCE) and Micronucleus assays (MN) techniques. The material was chinese hamster's ovaryan cell line *Cricetulus griseus* and pills of glibenclamide and metformin. The chinese hamster's ovaryan cell line was grown in Ham's F10 supplemented with streptomycin penicillin 2 %, L glutamina 0.5 % and bovine fetal serum 10 % (PBS) 20. Cells were grouped and treated with Glibenclamide 5 mg, Metformin 850 mg, Glibenclamide + Metformine 5/850 mg and the group control. The results were evaluated with the test of Genotoxic assessment.

RESULTS:

We observed a significant increase ($8,03 \pm 0,17$) in the treatment with the combined therapy regarding the group control and to the metformin respectively (6.91 ± 0.19 ; 6.94 ± 0.45), also there were a significant increase of micronucleas in the therapy combined of glibenclamide with metformin (14.44 ± 0.93), glibenclamide alone (10.18 ± 0.93) and metformin alone (7.10 ± 1.04) regarding to the group control (3.93 ± 0.46).

CONCLUSION:

There is genotoxic effect in the group of combined therapy (Glibenclamide + Metformine) demonstrated using the of Sister Chromatid Exchanges (SCE) and Micronucleus assays (MN) techniques.

Keywords: Genotoxicity, glibenclamide, metformin, cellular line.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente se considera a la diabetes dentro de un grupo de trastornos metabólicos frecuentes que comparten el fenotipo de la hiperglicemia (1).

La diabetes tipo 2 tiene dos defectos fisiopatológicos básicos: resistencia a la insulina y disfunción secretora de células beta. Para tal fin se combinan fármacos que mejoran cada una de las dos alteraciones (2,3). Las sulfonilureas incrementan la secreción de insulina por el páncreas. Por su parte, la metformina disminuye la producción hepática de glucosa al incrementar notablemente la sensibilidad hepática a la insulina, y también influye positivamente, sobre la sensibilidad periférica a la insulina en músculo y adipocito (3, 4, 10).

A pesar del reconocimiento de la relación potencial entre la diabetes tipo 2 y cáncer, muy poco se conoce sobre el papel que las terapias antidiabéticas podrían tener sobre esta relación (5,6,7). Este rol es particularmente significativo porque hay tratamientos para la diabetes que incrementan los niveles circulantes de insulina así como tratamientos que reducen la resistencia a la insulina. La insulina es una hormona promotora del crecimiento con efectos mitogénicos. En diversos estudios animales complementados por estudios de casos en humanos, se demostró el rol crítico de la insulina como factor de crecimiento en todos los estadios del crecimiento en mamíferos. Estos estudios sugieren que la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina pueden promover la carcinogénesis (5,8,9).

Aunque no existe evidencia de carcinogenicidad en el tratamiento con metformina en ratas y ratones machos, ha habido una incidencia incrementada de pólipos uterinos estromales benignos en ratas hembras. Tampoco se ha encontrado evidencia de potencial mutagénico de metformina en pruebas *in vitro*. Ames test (*S. typhimurium*), test de mutación de genes (células de linfomas de ratón), o test de aberraciones cromosómicas (linfocitos humanos). Además los resultados con pruebas *in vivo* con pruebas de micronúcleos en ratones también fueron negativos (11).

No obstante aún no se han desarrollado estudios similares con respecto a la glibenclamida, siendo éste un fármaco que registra una gran cantidad de efectos adversos, además de la posibilidad del desarrollo de cáncer de una manera indirecta al estimular la secreción de insulina (5).

Actualmente se utilizan biomonitores, para detectar el daño genético, los cuales requieren ser altamente sensibles, capaces de medir diferentes tipos de eventos genéticos y ofrecer una respuesta rápida. Es así que la línea obtenida a partir de ovario de hámster chino CHO- K1, en 1973, por Puck y colaboradores (12), es uno de los biomonitores de mayor difusión en el estudio de daño genético al nivel cromosómico.

Esta línea celular CHO-K1 se caracteriza por ser aneuploide con un número modal cromosómico de 20-21, posee 10-13 marcadores cromosómicos bien definidos, su cariotipo no sólo tiene un número cromosómico moderado, sino que también es heteromórfico, por lo que se hace fácil la individualización de los tipos cromosómicos que lo integran. Como material de laboratorio es de fácil manejo, puede ser cultivada de diferentes formas y su mantenimiento es relativamente económico (13-14).

Los estudios encaminados a evaluar la posible acción genotóxica de los compuestos químicos, ocupan un lugar fundamental en la prevención de la mutagenicidad y carcinogenicidad en el hombre (15).

Existen trabajos como el reportado por Rodríguez-Ferreyro (2001) (12), quien ha demostrado la inducción de roturas en los cromosomas de leucocitos de ratón por efecto del tinidazol una droga antimicrobiana de la familia de los nitroimidazoles; asimismo, existen los trabajos de Sánchez-Lamar (1998) (13), quien demuestra el efecto genotóxico de *Phyllanthus orbicularis* utilizando el test de micronúcleos (MN). Los *Micronúcleos* (MN) son pequeños cuerpos citoplasmáticos de origen nuclear, estos se forman a partir de fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas completos que quedan rezagados durante la anafase en la división celular. Por lo tanto, su presencia es un reflejo de rompimientos cromosómicos durante la mitosis (14).

El valor y sensibilidad de esta prueba para evaluar mutagénesis ha sido bien demostrado por décadas, y debido a que su formación involucra daño cromosómico, recientemente se ha estudiado como un marcador de riesgo para desarrollar cáncer (9).

Asimismo existe otra prueba que es utilizada para demostrar efectos mutagénicos, se trata del Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), los cuales son intercambios recíprocos entre cromátides de un mismo cromosoma. Estos se producen en

loci homólogos, involucrando rompimiento y reunión durante la replicación del DNA. Los ICH son el primer evento visible que refleja el efecto mutagénico a largo plazo, lo que la hace una prueba altamente sensible para la detección de daño cromosómico (15, 16, 17).

La relación entre frecuencias elevadas de ICH y predisposición a cáncer ha sido bien establecida en síndromes de inestabilidad cromosómica como la ataxia telangiectasia, el síndrome de Bloom en los que el sistema de reparación del DNA es defectuoso, y por lo tanto, presentan un alto riesgo de desarrollar tumores malignos como el cáncer de piel (18). Esta inestabilidad cromosómica también ha sido reportada en frecuencias más bajas en linfocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, y cáncer de ovario (19).

Teniendo en cuenta los estudios epidemiológicos ya mencionados entre el cáncer y la diabetes y debido a que fármacos como la glibenclamida o metformina son los más empleados para el tratamiento de la diabetes en nuestro medio, y la presencia de un mecanismo biológico plausible por el que la metformina pudiera incrementar el riesgo de cáncer en la gente con DM 2, decidimos realizar el presente estudio para determinar si: **¿Existe efecto genotóxico tras la administración de glibenclamida, metformina o la terapia combinada en la línea celular de ovario de hámster chino *Cricetulus griseus*?**

OBJETIVOS

GENERAL:

- Determinar la existencia del efecto genotóxico de glibenclamida, metformina y su combinación, en la línea celular de ovario de hámster chino *Cricetulus griseus* CHO-K-1 mediante la prueba de intercambio de cromátidas hermanas y test de micronúcleos.

ESPECÍFICOS:

- Determinar la existencia del efecto genotóxico de glibenclamida en la línea celular de ovario de hámster chino *Cricetulus griseus* CHO-K-1 mediante la prueba de intercambio de cromátidas hermanas y test de micronúcleos.
- Determinar la existencia del efecto genotóxico de metformina en la línea celular de ovario de hámster chino *Cricetulus griseus* CHO-K-1

mediante la prueba de intercambio de cromátidas hermanas y test de micronúcleos.

- Determinar la existencia del efecto genotóxico de la combinación de glibenclamida y metformina en la línea celular de ovario de hámster chino *Cricetulus griseus* CHO-K-1 mediante la prueba de intercambio de cromátidas hermanas y test de micronúcleos.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Los materiales de estudio estuvieron constituidos por células de la línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1) *Cricetulus griseus* y tabletas de glibenclamida y metformina. Esta línea celular se caracteriza por ser aneuploide, con un número modal cromosómico de 20-21, posee 10-13 marcadores cromosómicos bien definidos, su cariotipo no sólo tiene un número cromosómico moderado, sino que también es heteromórfico, por lo que se hace fácil la individualización de los tipos cromosómicos que lo integran. Como material de laboratorio es de fácil manejo, puede ser cultivada de diferentes formas y su mantenimiento es relativamente económico. (13,14)

Estas células fueron subdivididas y agrupadas en cuatro grupos:

- T1: Células que recibieron glibenclamida (5 mg)
- T2: Células que recibieron metformina (850 mg)
- T3: Células que recibieron glibenclamida (850 mg) y metformina (5 mg)
- T4: Células que no recibieron ningún tratamiento

MÉTODOS Y TÉCNICAS.

Cultivo celular.

Las células de la línea celular fueron cultivadas en Ham's F10 suplementado con 2 % estreptomycin-penicilina, 0,5 % L-glutamina y 10 % suero bovino fetal (PBS) 20.

Tratamientos

Las células fueron tratadas según el método utilizado por Degraasi (1988)¹⁶ como sigue:

Tratamientos mg	T1 Glibenclamida 5 mg	T2 Metformina 850 mg	T3 Glib. + Met. 5/850 mg	T4 Control
Tiempo de Exposición (horas)				
12	5	850	5/850	0
24	5	850	5/850	0
36	5	850	5/850	0

Las células de la línea CHO-K1 fueron tratadas durante 03 días en los intervalos de tiempo y dosis indicados en el cuadro.

Evaluación genotóxica.

Se utilizó el test de micronúcleos Hogstedt, (1984) y la prueba de Intercambio de Cromátides propuesta por Salamanca, (1990) que consisten en:

A. Test de micronúcleos de Hogstedt:

1. Fijación:

Inmediatamente después de hacer el frotís se sumergieron los preparados citológicos en una batería de coloración que contenía el fijador (alcohol: éter).

2. Hidrólisis:

Las láminas después de fijadas se dejaron secar y luego se sumergieron en HCl 1N a 60 grados en baño María durante 10 minutos, al cabo de los cuales se enjuagó con agua de caño y se puso a secar en una estufa a 37 grados.

3. Coloración:

Las láminas se sumergieron en un recipiente con reactivo de Schiff 60 minutos en oscuridad.

4. Lavado:

Cumplido el tiempo de coloración, se lavaron las láminas durante dos minutos con agua sulfurosa por dos veces consecutivas. Finalmente se lavó con agua destilada.

5. Lectura:

Se observó las láminas al microscopio a mayor aumento, utilizando para la identificación de micronúcleos el siguiente criterio: localización dentro del citoplasma, con contorno liso, no refractario, teñido con la misma intensidad que el núcleo principal, y más pequeño que el núcleo.

B. Prueba de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) Salamanca, (1990)¹⁵

- A las 24h de la siembra del cultivo celular, se adicionó Bromo de oxi Uridina a una concentración final de 20 μ g/ml.

- Se cosechó a las 72h de siembra y después de haber sido tratadas, se colocó en colchicina al 0,075M durante 45 minutos y se realizó los preparados citológicos.

- Se coloreó las preparaciones con el colorante 33258 (bis-benzimidazol) de Hoescht, preparado en agua bidestilada a una concentración de 1 μ g/ml en oscuridad durante 30 a 60 minutos.

- Se lavó con agua corriente, luego se colocó en amortiguador de fosfatos a pH 6.8 y se expuso a ultravioletas durante 1 a 2 horas.

- Se lavó con agua corriente y se dejó por 24h luego se colocó en Giemsa a pH 6.8 durante 6 a 10 minutos.

- Se observó y luego se determinó las frecuencias de intercambios de cromátides hermanas en 10 placas metafásicas por tratamiento. Los ICH fueron cuantificados en 10 metafases en segunda división celular por un observador

Todas las observaciones que evidenciaron daño se fotografiaron.

Análisis Estadístico.

Los datos se procesaron mediante las pruebas Chi cuadrado, la prueba de ajuste y distribución binomial, además del empleo de Test no paramétricos como la prueba de Comparación múltiple (ANOVA) y el Test Duncan ($p < 0.05$)¹⁷.

Ética

Se siguieron los aspectos éticos de la declaración de Helsinki para la realización de trabajos de investigación.

III. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo revelaron lo siguiente:

Test de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH)

Las frecuencias de ICH por metafase (media \pm error estándar) obtenidas en las células de ovario de hámster chino tratadas con glibenclamida, metformina y terapia combinada se aprecian en la Tabla 1. Se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en el tratamiento de la terapia combinada (8.03 ± 0.17) en comparación con el grupo control, no así en la terapia

única con la glibenclamida (7.29 ± 0.52) ni con metformina (6.91 ± 0.19 ; 6.94 ± 0.45). (Figura 1)

Micronúcleos (MN).

Los valores promedios (media \pm error estándar) de cambios en micronúcleos pueden ser apreciados en la Tabla 2. Se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) para los tres tipos de terapias, tanto para la combinación de glibenclamida con metformina (14.44 ± 0.93), sólo glibenclamida (10.18 ± 0.93) o metformina únicamente (7.10 ± 1.04) en comparación con el grupo control (3.43 ± 0.46) (Figura 2)

IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten demostrar e inducir el potencial efecto genotóxico de los tratamientos con los principales antidiabéticos orales como son la glibenclamida y metformina, además de incrementar la genotoxicidad cuando estos fármacos se combinan.

El mecanismo molecular que involucra la formación y el incremento de ICH en este tipo de lesiones no es conocido, sin embargo los datos de este trabajo apoyan la hipótesis que la inestabilidad cromosómica puede estar asociada con la progresión de células anormales (18,19). Altos niveles de ICH han sido reportados sugiriendo que las células malignas pueden producir factores «solubles» que incrementen la inestabilidad de los cromosomas (19), nuestros resultados mostraron un incremento gradual de ICH (tabla 1). Estos datos se corroboran con el estudio por Yokata *et al*, que reporta un incremento de ICH de acuerdo al desarrollo neoplásico; sin embargo, existen discrepancias con otros estudios, y además la alta variabilidad de la prueba indica que este parámetro citogenético no es útil como marcador preclínico (19).

Asimismo, los resultados presentados en este trabajo indican un incremento de MN en el tratamiento de la terapia combinada, seguido de la terapia con glibenclamida y luego con metformina; todos estos tratamientos tuvieron diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo control. Estos resultados son apoyados por lo reportado por Chakrabarti *et al* y Cerqueira *et al* que sugieren que los altos niveles de MN presentes en pacientes con lesiones precancerosas y cancerosas reflejan la producción y liberación de una sustancia mutagénica que causa rompimiento cromosómico «clastogénico»,

con lo cual existe un riesgo de desarrollar tumores secundarios debido a la inestabilidad cromosómica de estas células anormales (19). Por consiguiente, en nuestro estudio los fármacos utilizados, tanto individualmente como en su combinación, estarían induciendo la producción de esta sustancia, la cual produciría rompimientos cromosómicos y generarían lesiones precancerosas a nivel celular.

Los incrementos significativos y la correlación positiva de MN en la línea celular de CHO sugieren que esta prueba puede ser de gran utilidad en la detección de sustancias que ocasionan genotoxicidad; ya que la presencia de MN es ampliamente aceptado por diversas investigaciones como productos de eventos tempranos en procesos carcinogénicos en humanos (20) (Tabla 2).

Existe muy poca evidencia con respecto a los posibles potenciales efectos genotóxicos de cualquier esquema farmacológico para la diabetes mellitus. En el estudio piloto por Ibarra – Costilla *et al*, concluyen que existe un daño a nivel de ADN en los pacientes diabéticos tipo 2 con tratamiento farmacológico (insulina, glibenclamida y metformina), mediante la técnica de ensayo cometa que evalúa el estrés oxidativo a nivel celular (21). Además, los resultados obtenidos por Martínez *et al* confirman el daño en el DNA mediante el uso de MN en todos aquellos pacientes con DM2, que llevaban algún tratamiento farmacológico (principalmente el grupo con insulina más metformina) (22).

V. CONCLUSIONES

- Existe efecto genotóxico producido por la terapia combinada con glibenclamida y metformina en la línea celular ovario de hámster chino *Cricetulus griseus*, mediante la prueba de ICH.
- Existe efecto genotóxico producido por la glibenclamida en la línea celular ovario de hámster chino *Cricetulus griseus*, el Test de Micronucleos.
- Existe efecto genotóxico producido por la metformina en la línea celular ovario de hámster chino *Cricetulus griseus*, el Test de Micronúcleos.

única con la glibenclamida (7.29 ± 0.52) ni con metformina (6.91 ± 0.19 ; 6.94 ± 0.45). (Figura 1)

Micronúcleos (MN).

Los valores promedios (media \pm error estándar) de cambios en micronúcleos pueden ser apreciados en la Tabla 2. Se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) para los tres tipos de terapias, tanto para la combinación de glibenclamida con metformina (14.44 ± 0.93), sólo glibenclamida (10.18 ± 0.93) o metformina únicamente (7.10 ± 1.04) en comparación con el grupo control (3.43 ± 0.46) (Figura 2)

IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten demostrar e inducir el potencial efecto genotóxico de los tratamientos con los principales antidiabéticos orales como son la glibenclamida y metformina, además de incrementar la genotoxicidad cuando estos fármacos se combinan.

El mecanismo molecular que involucra la formación y el incremento de ICH en este tipo de lesiones no es conocido, sin embargo los datos de este trabajo apoyan la hipótesis que la inestabilidad cromosómica puede estar asociada con la progresión de células anormales (18,19). Altos niveles de ICH han sido reportados sugiriendo que las células malignas pueden producir factores «solubles» que incrementen la inestabilidad de los cromosomas (19), nuestros resultados mostraron un incremento gradual de ICH (tabla 1). Estos datos se corroboran con el estudio por Yokata *et al*, que reporta un incremento de ICH de acuerdo al desarrollo neoplásico; sin embargo, existen discrepancias con otros estudios, y además la alta variabilidad de la prueba indica que este parámetro citogenético no es útil como marcador preclínico (19).

Asimismo, los resultados presentados en este trabajo indican un incremento de MN en el tratamiento de la terapia combinada, seguido de la terapia con glibenclamida y luego con metformina; todos estos tratamientos tuvieron diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo control. Estos resultados son apoyados por lo reportado por Chakrabarti *et al* y Cerqueira *et al* que sugieren que los altos niveles de MN presentes en pacientes con lesiones precancerosas y cancerosas reflejan la producción y liberación de una sustancia mutagénica que causa rompimiento cromosómico «clastogénico»,

con lo cual existe un riesgo de desarrollar tumores secundarios debido a la inestabilidad cromosómica de estas células anormales (19). Por consiguiente, en nuestro estudio los fármacos utilizados, tanto individualmente como en su combinación, estarían induciendo la producción de esta sustancia, la cual produciría rompimientos cromosómicos y generarían lesiones precancerosas a nivel celular.

Los incrementos significativos y la correlación positiva de MN en la línea celular de CHO sugieren que esta prueba puede ser de gran utilidad en la detección de sustancias que ocasionan genotoxicidad; ya que la presencia de MN es ampliamente aceptado por diversas investigaciones como productos de eventos tempranos en procesos carcinogénicos en humanos (20) (Tabla 2).

Existe muy poca evidencia con respecto a los posibles potenciales efectos genotóxicos de cualquier esquema farmacológico para la diabetes mellitus. En el estudio piloto por Ibarra – Costilla *et al*, concluyen que existe un daño a nivel de ADN en los pacientes diabéticos tipo 2 con tratamiento farmacológico (insulina, glibenclamida y metformina), mediante la técnica de ensayo cometa que evalúa el estrés oxidativo a nivel celular (21). Además, los resultados obtenidos por Martínez *et al* confirman el daño en el DNA mediante el uso de MN en todos aquellos pacientes con DM2, que llevaban algún tratamiento farmacológico (principalmente el grupo con insulina más metformina) (22).

V. CONCLUSIONES

- Existe efecto genotóxico producido por la terapia combinada con glibenclamida y metformina en la línea celular ovario de hámster chino *Cricetulus griseus*, mediante la prueba de ICH.
- Existe efecto genotóxico producido por la glibenclamida en la línea celular ovario de hámster chino *Cricetulus griseus*, el Test de Micronúcleos.
- Existe efecto genotóxico producido por la metformina en la línea celular ovario de hámster chino *Cricetulus griseus*, el Test de Micronúcleos.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Powers AC, Diabetes Mellitus. In: MD Braunwald E, MD Fauci AS, MD Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson LJ. Harrison Principios de Medicina Interna. McGraw-Hill Medical Publishing Division Ed. 2004. 2; 2467-500
2. Cabezas Cerratoa J., Cabezas Agrícola J.M.. Tratamiento no farmacológico y farmacológico de la diabetes mellitus. *Medicine* 2004; 9(16): 1000-1007
3. Lebovitz HE. Oral therapies for diabetic hyperglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;909-33.
4. DeFronzo RA. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1999; 281-303.
5. BOWKER S. Increased Cancer-Related Mortality for Patients With Type 2 Diabetes Who Use Sulfonylureas or Insulin. *Rev Diabetes Care* 2006; 29:254–258.
6. Steven S. Coughlin Diabetes Mellitus as a Predictor of Cancer Mortality in a Large Cohort of US Adults. *Rev Am J Epidemiol* 2004; 159:1160-1167.
7. Hans-Olov Adami, Joseph McLaughlin Cancer risk in patients with diabetes mellitus. *Rev Cancer Causes and Control* 1991; 2: 307-314
8. Rosenfeld RG: Insulin-like growth factors and the basis of growth. *N Engl J Med* 349: 218–216, 2003
9. Schneider MB. Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. *Gastroenterology*. 2001 Apr; 120(5): 1263-70
10. Bristol-Myers Squibb Company. GLUCOPHAGE®. Princeton NJ 08543. USA. Revised June 2001
11. Kao F, Puck T.1968. Genetics of somatic mammalian cells VII. *Proc Natl Acad Sci USA*; 60:1275-81.
12. Sánchez-Lamar A. 1999. Utilización de la línea celular CHO en los ensayos de genotoxicidad. *Rev Cubana Invest Bioméd*, Vol.18, no.1, p.19-21. ISSN 0864-0300.
13. Armstrong M, Bean C, Galloway M. 1992. A quantitative assesment of the citotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese Hamster ovary cells. *Mutat Res*; 265: 45-60.
14. Solan X, Hernández M. 2003. Control biológico de la exposición a genotóxicos: técnicas citogenéticas. NTP 358. instituto Nacional de Seguridad e Higiene. España. URL disponible en: www.mtas.es.com
15. Rodríguez-Ferreiro G. 2001. Tinidazol: una droga antimicrobiana con actividad genotóxica. *Rev Cubana Invest Biomed* 20(1):54-8
16. Steel, R., Torrie, J. 1980. Bioestadística. Editorial Mc. Graw-Hill, Latinoamericana S.A. Bogotá.
17. Wagner, Karl-Heinz; Juerb, Alice; Zarembach, Beate, et al. Impact of antiseptics on radical metabolism, antioxidant status and genotoxic stress in blood cells: povidone-iodine versus octenidine dihydrochloride *Toxicology In Vitro* 18 (4) : 411-418 August 2004
18. Spitz, M.R. and M.L. Bondy 1993. Genetic susceptibility to cancer. *Cancer* 72: 991-995
19. Cortez E. et al. Estudio de la Inestabilidad Cromosómica y de la Actividad Transcripcional (18s y 28s) en Pacientes con Cáncer Cervicouterino. *Revista de Salud Pública y Nutrición*. Vol 1 No.2 Abril-Junio 2000. Versión html disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/i/2/articulos/cancer.html>
20. Ramirez, Andréa; Henrique Saldanha, Pedro. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Rev. Genet. Mol. Res.* 2002;1 (3): 246-260.
21. Ibarra – Costilla, Emma et al. ¿Es el esquema de tratamiento un posible factor causal de estrés oxidativo en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2?. *Resúmenes Rev Invest Clin* 2004; 56(6): 817-818.
22. Martínez PL, Cerda FL, Cerda CE, Dávila RM, Gaspar BJ, Velásquez MV et al. Evaluación de la Mutagenicidad de diferentes tratamientos utilizados en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2. *Revista de Salud Pública y Nutrición [on line]* 2004 Febrero [citado 25 Septiembre 2007];4. Disponible en: URL: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-4-2004/41.htm#top>

ANEXOS

TABLA 1

NÚMERO PROMEDIO DE ICH POR METAFASE EN CÉLULAS DE LA LÍNEA CELULAR DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO *Cricetulus griseus* TRATADOS CON GLIBENCLAMIDA, METFORMINA, TERAPIA COMBINADA Y CONTROL

Tratamientos	Nº de Células Estudiadas	ICH X ± ES
Glibenclamida	10	7.29 ± 0.52
Metformina	10	6.94 ± 0.45
Terapia combinada	10	8.03 ± 0.17 ^a
Control	10	6.91 ± 0.19

X= Media, ES = Error estándar, ^a = Diferente al control, P < 0.05

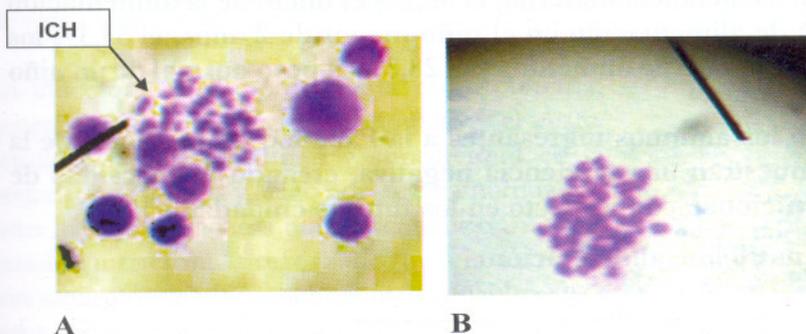


Fig. 1. A.

Intercambio de cromátidas hermanas en metafase de la línea celular de ovario de hámster chino *Cricetulus griseus* por efecto del tratamiento con glibenclamida.

B Control. La flecha muestra los intercambios de cromátidas hermanas.

TABLA 2

NÚMERO PROMEDIO DE MN EN CÉLULAS DE LA LÍNEA CELULAR DE OVARIO DE HÁMSTER CHINO *Cricetulus griseus* TRATADAS CON GLIBENCLAMIDA, METFORMINA, TERAPIA COMBINADA Y CONTROL

Tratamientos	Frecuencia de MN	
	Nº de Células Estudiadas	Células Epiteliales (X ± ES)
Glibenclamida	10	10.18 ± 0.93 ^{a,b}
Metformina	10	7.10 ± 1.04 ^{a,b}
Terapia combinada	10	14.44 ± 0.93 ^{a,b}
Control	10	3.93 ± 0.46

a,b: El dato estadístico refleja un grado de significancia al 0.05 %

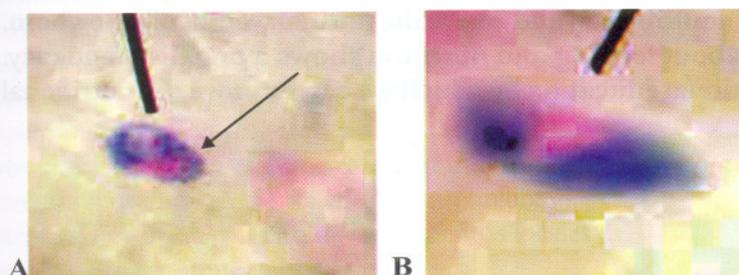


Fig.2. A Micronúcleos en células de ovario de hámster chino *Cricetulus griseus* tratados con glibenclamida.

B Control. La flecha indica el micronúcleo