

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

TERATOGENESIS Y MUTAGENESIS POR METRONIDAZOL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO BIOLOGO

PRESENTA

GRACIELA MARGARITA ALVAREZ RAMIREZ

DIRECTORA DE TESIS

BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.

M. EN C. MA. GUADALUPE GARCIA ALCOGER

QUERETARO, QRO.

AGOSTO DE 1991
5 1991



No. Eng H53658

TS

Class. 575.292

A473+

7
R
4

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	
1. Metronidazol	4
2. Aborto	13
3. Teratología	16
4. Mutación	19
III. JUSTIFICACION	23
IV. OBJETIVOS	24
V. MATERIAL Y METODOS	
1. Teratología	25
2. Mutación	33
VI. RESULTADOS	42
VII. DISCUSION	77
VIII. CONCLUSIONES	78
IX. BIBLIOGRAFIA.	79

I. RESUMEN

La amibiasis constituye al momento actual, una de las parasitosis con más alta frecuencia en el estado de Querétaro, afectando sobre todo a la población infantil, y prolongándose muchas veces a la edad adulta.

La terapia más efectiva elegida para la erradicación de esta enfermedad ha sido el Metronidazol. Este medicamento se utiliza también para combatir a otros parásitos como son la *Giardia lamblia*, *Tricomona vaginalis* y Bacterias Gram negativas, motivos por los cuales ha sido utilizado preferentemente.

En México se ha estudiado poco el nivel de alteración genética que pudiera presentar el Metronidazol. Durante el proceso de reproducción, el ser vivo es más sensible al efecto tóxico de algunos factores físicos y químicos, que puedan causar daño al producto, dado a que es el momento donde la proliferación celular se efectúa con mayor rapidez, (1)

1. Urrusti S. J.: El microambiente como condicionador de defectos al nacimiento, GEN, México, 1983, pp. 69.

por lo que se eligió este periodo para detectar el grado de alteración que pudiera producirse al administrar el fármaco, en este caso el metronidazol. Los resultados de las alteraciones al material genético que se estudian en el presente trabajo son malformaciones congénitas, aborto y mutación. Este se realiza con sistemas in vivo, uno de ellos, ratones de la cepa CD-1, en el cual se observó la actividad teratógena y la cantidad de abortos espontáneos resultantes de la administración del Metronidazol, en estado de gestación.

Aquí se observaron diversas anormalidades en los fetos extraídos de las hembras tratadas con Metronidazol, como fueron diversas malformaciones en algunos de los productos, mismas que no se observaron en los productos del grupo control. Con este hecho, pudiera considerarse que el Metronidazol tiene un efecto de potencial actividad teratógena, motivo por el cual debería administrarse con mayor precaución a pacientes que se encuentran embarazadas, o que lo toman sin saber que lo están.

Como estudio complementario se realizó en el Sistema de Células Meióticas de Tradescantia llevándose a cabo una curva dosis respuesta para determinar la

sensibilidad de dicho sistema al medicamento. La respuesta presentada por el sistema para una dosis baja, no superó la incidencia de micronúcleos en el control negativo, y en dosis más altas existió citotoxicidad, por lo cual, es probable que el sistema de Tradescantia no sea el adecuado para demostrar la mutagenicidad del metronidazol o bien se requiera probar con otras dosis.

II. INTRODUCCION

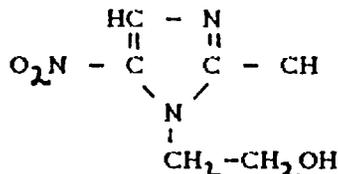
1. METRONIDAZOL

El estudio sistemático de los nitroimidazoles condujo al descubrimiento en 1959 de la acción anti-tricomonas del 5-nitroimidazol (Metronidazol). El compuesto ha resultado un antiparasitario y antimicrobiano de espectro amplio, tanto sobre bacterias gram positivas como gram negativas, aunque restringido a bacterias microaerofilicas.

1-(β-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol

METRONIDAZOL

Peso molecular : 171.



A la parasitosis por tricomonas siguieron las indicaciones de la giardiasis en 1961, de la angina de Vincent (2) en 1962, de la amibiasis en 1965-1966, de la dracunculiasis (3) en 1970 y de efectos radiosensibilizantes en 1976. (4)

2. Afección difteroiide de la garganta, con inflamación y ulceración de las amígdalas y a veces de la mucosa de la boca y faringe, producido por el *Bacillus fusiformis* o de Vincent, asociado generalmente con un espirilo. En: Mascaró J.M.: Op. Cit., pp.55

3. Es un estado producido por la infestación con parásitos del género *Dracunculus* los cuales son parásitos nemátodos de cuerpo largo y en forma de hilo. En: Mascaró J. M.: Op. Cit. pp. 301

4 . Kumate J.: ANTIBIOTICOS Y QUIMIOTERAPEUTICOS, Méndez Cervantes, 2a. Edición, México 1981, pp.327.

El efecto antiambiano fué descrito desde 1961 en los modelos animales de la enfermedad a nivel intestinal en ratas y hepática en hamster. En 1965 se demostró el efecto *in vitro* sobre los trofozoitos en cultivo y los ensayos clínicos se comunicaron en 1966 por Power, Mc.Leod y Wilmot en amibiasis intestinal y hepática. (5)

La característica común de los microorganismos sensibles es que son anaerobios y poseen proteínas para transporte de electrones con potencial de oxidorreducción bajo (semejantes a ferridoxina y a flavodoxina).

Estas proteínas pueden reducir el radical nitro del metronidazol por una reacción química no enzimática. La reducción tiene papel doble, a saber: disminuye la concentración intracelular del fármaco no modificado y de esta manera conserva un gradiente que fomenta la captación y genera compuestos tóxicos para la célula. La toxicidad no es mediada por los productos últimos de la reducción, sino por compuestos intermedios inestables o por radicales libres. Los datos disponibles indican que los productos tóxicos pasajeros se conjugan al DNA e inhiben la síntesis del mismo, la cual origina muerte celular. (6)

El metronidazol tiene efecto amebicida rápido *in vivo* y es el fármaco de elección para la amibiasis. Para la infección intestinal, el absceso hepático u otras formas de amibiasis extraintestinal, es aconsejable la dosis oral de 1500 mg por día 3 veces al día durante 5 a 10 días (7).

5. Kumate J. Op. Cit. pp. 327.

6. Molavi A.; CLINICAS MEDICAS DE NORTEAMERICA, México 1982, 3;121.

7. Rosenstein E. DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS, 36a. Ed., PLM, México, 1990. pp. 396.

Este régimen brinda cifras de cura de 92% en la disenteria amibiana y casi 100% en abscesos hepáticos amibianos. (8)

El metronidazol se absorbe bien en general después de su administración por vía oral. (9)

Una dosis de 250 mg administrada por vía oral a adultos produce una espiga de concentración sérica de 5.1µg a 13µg por mililitro. Las concentraciones séricas disminuyen lentamente y son en promedio de 0.65 y 1.36µg/ml 25 horas después de una dosis de 250 mg de 500 mg respectivamente. La farmacocinética de dosis únicas no depende de la dosis. La concentración sérica máxima varía casi linealmente con la dosis: 19.6µg después de 2 gr. La semivida sérica ha variado en distintos estudios de 7 a 8.7 horas.

La absorción del metronidazol no disminuye de manera importante por la ingestión simultánea de alimentos. Las concentraciones séricas máximas son iguales cuando se administra el fármaco en ayunas o después de alimentos, sin embargo puede existir un aumento notable en cuanto al tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima. (10)

El metronidazol en concentración de 8µg/ml presenta conjugación de 1% a proteínas plasmáticas, estimada por ultrafiltración. (11)

8. Molavi A. Op. Cit., pp. 124

9. Goodman G.A.; LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA, 6a. Ed, Médica Panamericana, México 1981, pp. 47.

10. Molavi A.; Op. Cit. pp. 125.

11. Molavi A.; Op. Cit. pp. 126

El que no haya conjugación importante a las proteínas y la pequeñez de la molécula facilitan la distribución adecuada en tejidos y líquidos corporales. El fármaco tiene volumen de distribución aparentemente grande, equivalente a 70 - 94.4% del peso corporal.

Si las meninges son normales, la concentración en el líquido cefalorraquídeo es de aproximadamente 50% de la sérica simultánea. El fármaco se introduce fácilmente en abscesos cerebrales, donde alcanza concentraciones semejantes a las del suero. (12, 13)

12. Molavi A.; Op. Cit. pp. 126.

13. BARRERA HEMATOENCEFALICA: Es un mecanismo localizado en el sistema nervioso central capaz de excluir muchas sustancias transportadas por la sangre. Esta barrera no es absoluta, en realidad representa una diferencia cuantitativa más que cualitativa con otros tejidos en cuanto a permeabilidad capilar. La principal característica estructural que está a la base de la permeabilidad relativamente pequeña de la mayor parte de los capilares encefálicos es la estrecha aplicación de los astrocitos (14) a la membrana basal de los capilares. Por lo tanto, una sustancia que penetre en el líquido intersticial que rodea a las neuronas de la sangre capilar tiene que atravesar las membranas de los astrocitos así como del endotelio capilar, En: Bowman W.C.; FARMACOLOGIA, BASES BIOQUIMICAS Y PATOLOGICAS, 6a. Ed. Interamericana, México 1984, pp. 6:11.

14. ASTROCITO: Célula en forma de estrella, especialmente célula de la neuroglia, que pertenece al sistema nervioso. En: Mascaró J.M.; Op. Cit. pp. 115.

En pacientes de vías biliares normales, el metronidazol llega a la bilis en cantidades semejantes a las del suero y es concentrado en la vesícula biliar. En pacientes de cálculos vesiculares y vesícula no funcional o excluida, la concentración en la bilis es bastante menor que la sérica.

Solo 15% de una dosis bucal de metronidazol se excreta sin modificación por la orina. La concentración en ésta durante las 12 primeras horas es, en promedio, de 88 y 35 $\mu\text{g/ml}$ para dosis de 500 y 250 mg respectivamente.

La mayor parte del metronidazol administrado se metaboliza en el hígado. Los metabolitos, que se excretan por la orina incluyen diversos productos de oxidación y conjugados con ácido glucurónico. Alrededor de 25% de las dosis administradas se presentan en la orina en forma del metabolito hiroxilado 1-(β -hidroximetil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol y 14% como conjugado del metronidazol y su metabolito hidroxilado. Algunos de sus metabolitos de oxidación tienen actividad antibacteriana; poseen 30% de la actividad del compuesto original contra especies de clostridios.

Alrededor de 14% de una dosis oral de metronidazol se excreta por las heces. (15)

Los efectos secundarios son rara vez lo bastante severos como para requerir la suspensión de la droga. (16)

Pueden aparecer infecciones sobreañadidas en

15. Molavi A.; Op. Cit. pp. 127

16. Goodman G.A.; Op. Cit. pp. 47.

En pacientes de vías biliares normales, el metronidazol llega a la bilis en cantidades semejantes a las del suero y es concentrado en la vesícula biliar. En pacientes de cálculos vesiculares y vesícula no funcional o excluída, la concentración en la bilis es bastante menor que la sérica.

Solo 15% de una dosis bucal de metronidazol se excreta sin modificación por la orina. La concentración en ésta durante las 12 primeras horas es, en promedio, de 88 y 35 $\mu\text{g/ml}$ para dosis de 500 y 250 mg respectivamente.

La mayor parte del metronidazol administrado se metaboliza en el hígado. Los metabolitos, que se excretan por la orina incluyen diversos productos de oxidación y conjugados con ácido glucurónico. Alrededor de 25% de las dosis administradas se presentan en la orina en forma del metabolito hiroxilado 1-(β -hidroximetil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol y 14% como conjugado del metronidazol y su metabolito hidroxilado. Algunos de sus metabolitos de oxidación tienen actividad antibacteriana; poseen 30% de la actividad del compuesto original contra especies de clostridios.

Alrededor de 14% de una dosis oral de metronidazol se excreta por las heces. (15)

Los efectos secundarios son rara vez lo bastante severos como para requerir la suspensión de la droga. (16)

Pueden aparecer infecciones sobreañadidas en

15. Molavi A.; Op. Cit. pp. 127

16. Goodman G.A.; Op. Cit. pp. 47.

Estos metabolitos producidos por la flora fueron descritos en los laboratorios Bueding. Este grupo llegó a la conclusión de que los metabolitos se encuentran reducidos lo cual posibilita la reacción mutagénica.

Los metabolitos descritos indican que existe una reducción del metronidazol. Existen diversas posibilidades en la reducción. Uno de estos intermedios puede formarse en la flora y entrar a los tejidos de los mamíferos. El otro como metronidazol, es metabolizado en el humano hasta acetamida, el cual es un carcinógeno de alto riesgo. (28)

El metronidazol es mutágeno en bacterias, especialmente si se usa el ensayo de pares de bases y las nitroreductasas bacterianas están presentes. Los niveles en el suero del hombre después de la administración de esta droga, son suficientes para causar mutaciones en bacterias. Además la interacción y enlace al DNA ocurre en condiciones anaeróbicas. Se determinó por medio del ensayo de pares de bases extrañas la mutagenicidad del metronidazol. Por lo tanto con referencia a dicho ensayo, estos compuestos (los nitroimidazoles) son mutágenos. En hongos, algunos compuestos (e.g. ZK26173 y azatioprina) son mutágenos potentes y quizá con una mayor investigación a los nitroimidazoles puedan demostrar que presenta una débil o no tener actividad mutagénica. (29)

28. Golodman P. Idem.

29. Voogd, C.E.; On the Mutation of the nitroimidazole, MUTATION RESEARCH, Mayo 1981, 86(3), pp. 243-277.

Algunas observaciones similares se han hecho con ensayos, en: *Drosófila melanogaster*, en la prueba para mutaciones genéticas, en células de mamíferos, con el ensayo de micronúcleos, en la prueba citogénica y la prueba letal dominante. Los productos de reducción del metronidazol, misonidazol y 1-metil-2-nitro, 5-vinilimidazol causan daños al DNA, si los grupos nitro son reducidos en presencia del mismo. Los productos de reducción son formados por los microbios en el intestino o por células de mamíferos sobre condiciones anaeróbicas. No se ha observado que haya efectos teratológicos debido al metronidazol o demás nitroimidazoles.(30)

30. Voogd G.E.: Idem.

2. ABORTO

Es la terminación de un embarazo antes de que el feto sea viable. La organización Mundial de la Salud considera como abortos los embarazos hasta la semana veinte y que el feto expulsado pese menos de 500g.(31)

Generalmente un feto es viable al alcanzar la edad de 23 a 24 semanas, cuando pesa algo más de 600 g. Aproximadamente 75% de los abortos ocurren antes de la decimosexta semana, y la mayor parte de ellos se presentan antes de la octava semana de gestación.

La frecuencia del aborto es mayor al principio de la edad adulta, precisamente antes de la menopausia. Al menos 12% de todos los embarazos terminan en aborto espontáneo. (32)

Un estudio de Hertig y Livingstone de los productos de la concepción expulsados en 1000 abortos espontáneos, reveló defectos o anomalías del huevo en 61.7%. Si el producto no se desarrolla adecuadamente y muere, actúa como cuerpo extraño dentro del útero y estimula las contracciones de la matriz en cuanto desaparece la regulación hormonal normal. Poco después que el epitelio coriónico deja de producir hormonas, el huevo defectuoso se expulsará.(33)

31. Núñez M.E.: GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA, 3a. Ed., Mendez Oteo, México, 1987, 20:239.

32. Benson R.: MANUAL DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA, 7a. Ed, Manual Moderno, México, 1985, 11:258.

33. Stewart T.E.: OBSTETRICIA DE BECK, 10a. Ed, Interamericana, México, 1981, 24: 344-346.

Los estudios citogénicos de Carr hechos en tejidos obtenidos de abortos espontáneos, han demostrado frecuencia de 22% de anomalías cromosómicas que ocurren con mayor frecuencia en abortos espontáneos del primer trimestre. (34)

Existen diversos factores los cuales pueden ser la causa de la producción de un aborto. Estos son:

10. Factores ovulares y fetales: La estructuración de un concepto incipiente puede ser defectuosa, aun cuando el lugar de la nidación sea favorable. Entonces sobreviene el aborto.

Cuando el producto es expulsado dentro del primer trimestre aproximadamente el 60% de ellos muestran anomalías anatómicas, pero muchos son expulsados tan precosmente o están tan degenerados que resulta imposible reconocer con precisión los defectos. Las fallas de segmentación del huevo, la ausencia de la cavidad coriónica y la hipoplasia (35) del trofoblasto (36) son principios ocasionales. Las anomalías cromosómicas son frecuentes: en estudios realizados en fetos con éstas, que fueron abortados espontáneamente la trisomía se presentó más o menos en la mitad de los casos. (37)

34. Stewart T. E.; Op Cit. pp 345

35. Disminución de la actividad formadora o productora, desarrollo incompleto o defectuoso. En: Mascaró J. M. DICCIONARIO TERMINOLOGICO DE CIENCIAS MEDICAS, 11a. Ed, México, 1982. pag.497

36. Capa celular extraembrionaria que fija el embrión a la pared uterina y lo nutre; la capa celular primitiva se denomina citotrofoblasto, y luego se convierte en sincitio, llamado sintrofoblasto, plasmoditrofoblasto o espongiotrofoblasto. En: Mascaró J. M. Op. Cit. pag. 1011

37. Benson R.: Op Cit, pp. 259

La implantación superficial de la placenta circunvalada y la sífilis, son entre otras, las causas fetales principales del aborto durante el segundo trimerstre. La eritroblastosis y otras anomalías fetales son responsables con menor frecuencia.

2o. Factores maternos que no son defectos genéticos:

En estos se incluyen a las enfermedades en general, como pueden ser infecciones, enfermedades endócrinas, cardíacas o hipertensivas graves. La desnutrición es un factor muy importante que puede provocar muchos abortos.

Otras causas son: Enfermedades inmunológicas, factores tóxicos, defectos uterinos y cervicales y traumatismos. (38)

38. Benson R.: Op. Cit. pp. 259

3. TERATOLOGIA

Los trabajos a nivel experimental sobre teratología se iniciaron en 1940 cuando Warkany y Nelson, Warkany y Schrofenger (1944) y Wilson (1953), demostraron que algunos factores ambientales como las deficiencias nutricionales en la rata preñada ocasionaban alteraciones en el patrón del desarrollo embrionario. (39)

La teratogénesis se manifiesta principalmente en malformaciones congénitas (40) que se definen como defectos estructurales macroscópicos presentes en el neonato. (41,42)

Existen 5 principios fundamentales que explican la participación importante que tienen los factores ambientales en el desarrollo normal o anormal del embrión. Estos fueron establecidos por Wilson, Nischimura, Beck, Lloyd y son:

1. La acción teratogena de un agente depende del estado en que se encuentra el embrión en un momento determinado.

La susceptibilidad de las diferentes estructuras de las nuevas células hacia los factores ambientales es mayor durante la fase de diferenciación activa (43)

39. Guzmán T.R.; MEDIO AMBIENTE Y DEFECTOS CONGENITOS,

1a. Ed, Trillas, México 1986, pp. 2:43.

40. Bowman W.C.; FARMACOLOGIA, Op. Cit., pp. 48

41. Langman J.; EMBRIOLOGIA MEDICA, 4a. Ed., Panamericana, México, 1981, 8:107.

42. Un teratógeno es cualquier agente susceptible de provocar o aumentar la frecuencia de malformaciones congénitas, En Moore K.L.; EMBRIOLOGIA CLINICA, 3a Ed., Interamericana, México, 1985, 8:149.

43. Guzmán T.R.; Op. Cit., pp. 43.

en los mamíferos esta se inicia poco tiempo después de la concepción, cuando el cigoto sufre modificaciones en sus estructuras morfológica y química, indispensables en las diferentes funciones de órganos y tejidos. Comúnmente los teratógenos producen cambios una vez iniciada la diferenciación. Sin embargo, algunos trabajos recientes han demostrado que aún en la fase de preimplantación, pueden producirse alteraciones enzimáticas o proteínicas por errores en la duplicación del DNA, transcripción de la síntesis de proteínas y falta total de enzimas a nivel de organización celular. Por otra parte, cuando la organogénesis ha terminado, el efecto que pueden tener los teratógenos se reduce bastante y en ocasiones la única alteración evidente es alguna anomalía.

2. El efecto de un simple teratógeno puede variar en las especies o en las diferentes clases de la misma. La constitución de la madre y del feto varían mucho; esto se traduce como susceptibilidad genética.

3. En ocasiones las anomalías congénitas que producen los teratógenos no pueden distinguirse de los que presentan las condiciones hereditarias, por ser verdaderas fenocopias.

4. En otros casos, cuando varía la dosis del teratógeno, en tiempo y el período sensitivo del feto, pueden presentarse o no, defectos o anomalías congénitas, pero si ocurrir su muerte.

5. Los teratógenos, cuando no ocasionan defectos congénitos o muerte intrauterina pueden ser responsables de bajo peso al nacimiento.(44)

44. Guzmán T.R.; Op. Cit., pp. 48.

El período más crítico del desarrollo de un embrión, o del crecimiento de un tejido, es aquél en el cual la división celular se produce con mayor rapidéz.

La etapa sensible para el crecimiento del encéfalo y para el desarrollo del mismo se extiende hasta la infancia. (2 años). El desarrollo del embrión se perturba más fácilmente en el período de organogénesis. (45)

Algunas estructuras se forman en exceso y después son destruidas totalmente por reabsorción. (46)

En algunas circunstancias, la acción del agente teratógeno puede verse modificada por la influencia ambiental, de modo que el embrión o feto sobreviven, pero se puede ver afectados algunos sistemas orgánicos. Ello puede originar retardo en el crecimiento parcial o total transtorno funcional de la índole de retardo mental. (47, 48)

45. Moore K.L.; Op. Cit., pp. 152-153.

46. Una reabsorción puede considerarse como un proceso morfogenético, e igual que el crecimiento, mismo que puede producirse en exceso o en defecto, en Patten B.M.; EMBRIOLOGIA HUMANA, 5a. Ed., Interamericana, México, 1969, 9:186.

47. Langman J.; Op. Cit., pp. 111.

48. Retardo mental. Pérdida o menoscabo de la memoria, especialmente para sucesos recientes, la dificultad para concentrarse, deterioro de la capacidad para comprender los conceptos abstractos y sintetizar ideas, menoscabo de la capacidad de aprender y dificultad para resolver problemas aritméticos simples, En: Alpers B.J.; LO ESENCIAL DE LA EXPLORACION NEUROLOGICA, 1a. Ed., El Manual Moderno, México, 1975, 2:39.

4. MUTACION

Es uno de los fenómenos que han hecho posible la evolución y por lo tanto la diversidad de especies en los seres vivientes.(49)

Una mutación es un proceso mediante el cual un gene (50) sufre un cambio en la estructura (51) del ácido desoxirribonucleico (DNA), molécula en la cual se encuentran codificadas todas las restantes que forman las células y que por tanto dan las características que bajo la influencia del ambiente, constituyen las propiedades y rasgos finales de un organismo. Estas características del organismo, como son talla, peso, color de piel, etc, constituyen el fenotipo del organismo. El genotipo esta formado por toda la información almacenada en el DNA, o sea los millones de pares de bases que forman los genes, con sus regiones que se traducen en secuencia de aminoácidos (exones) y las regiones que no se traducen (intrones).

Las mutaciones se clasifican de acuerdo al modo como se originan en: mutaciones punto y mutaciones fuera de fase.(52)

49. Guizar V. J.: GENETICA CLINICA, 1a. Ed, Manual Moderno, México, 1988, 3:35

50. GEN: Es la unidad de transmisión hereditaria; ocupa un sitio determinado en los cromosomas llamado locus. Cada gen está compuesto, en promedio por varios miles miles de pares de bases, por lo que cada uno tiene miles de oportunidades para cambiar por mutación, en: Guizar V. J. Op. Cit, pp 510.

51. Gardner J.E.: PRINCIPIOS DE GENETICA, 5a. Ed., Limusa, México 1982, 8: 307-309.

52. Guizar V. J. Idem.

Las mutaciones punto pueden ser de dos clases:

1. Transiciones. Es cuando se produce el cambio de una base pirimídica por otra, o bien, una base púrica por otra. (53)

2. Transversiones. En esas, es el cambio de una base púrica por una pirimidínica o viceversa.

Las mutaciones fuera de fase pueden también subdividirse en deleciones o adiciones. En las primeras se suprime una, dos o más bases. Cuando se suprimen tres bases, se presenta la deleción de un aminoácido en la proteína, pero la trama o fase de lectura del DNA, que se realiza de tres bases en tres bases conocidas como tripletes, no se refleja por un efecto de fuera de fase. En cambio, en la adición de una o dos bases sí se presenta el fenómeno fuera de fase, originando a partir del sitio donde exista la adición el cambio de la secuencia de aminoácidos. Lo anterior también puede aplicarse a las adiciones de tres bases, añadiendo un aminoácido pero no alterando la fase de lectura del DNA, o bien en la adición de una o dos bases, alterando la fase y por lo tanto la secuencia de aminoácidos de la proteína. (54)

53. Las pirimidinas son la Citosina y la Timina y las purinas son la adenina y la guanina, en: Gardner J. E. Idem.

54. Guizar V. J. Op. Cit. pp. 36.

Una manera de detectar el daño del material genético es la utilización de la prueba de micronúcleos. Los micronúcleos se originan de cromatina que por diferentes razones se ha retrasado en anafase y que, en el curso de la telofase, queda incluida dentro de una u otra célula hija. Ahí puede fusionarse con el núcleo principal, o bien formar uno o varios núcleos secundarios que se ha denominado micronúcleos.

Este retraso puede ocurrir a través de dos mecanismos principales:

1. Rompimiento cromosómico, que se traduce en la formación de fragmentos acéntricos y de cromosomas di o multicéntricos o conectados por puentes.
2. Segregación cromosómica defectuosa, debida al mal funcionamiento mitótico que ocasiona el retraso de cromosomas completos.

La existencia de los micronúcleos ha sido reconocida desde hace muchos años; ya en 1937 se les relacionó con daño cromosómico en trabajos hechos con radiaciones. El primer intento serio para utilizar a los micronúcleos aparece reportado por Evans y colaboradores. a partir de entonces, ha sido aplicada esta técnica en diversos tejidos y tipos de organismos.

(55)

55. Jiménez Y I.: Comparación de la actividad genotóxica de ciclofosfamida y niclosamida en médula ósea del ratón, TESIS PROFESIONAL, Universidad Autónoma de México, México 1982.

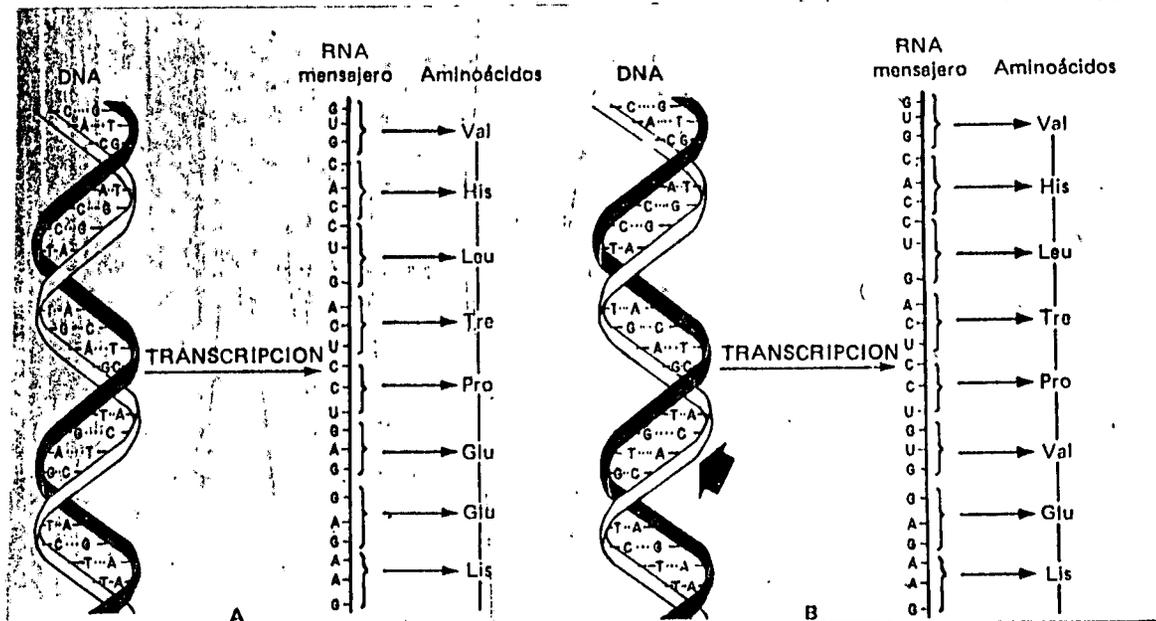


FIGURA 1

De una secuencia de bases específicas en la molécula de DNA, que en la figura aparece como banda clara, se copia por el proceso de transcripción una secuencia correspondiente en la molécula de RNA mensajero. De ésta, por el proceso de traducción se convierte en una secuencia de aminoácidos que forman la proteína. En este caso se muestran los primeros siete aminoácidos de la cadena beta de la globina. Aún cuando formalmente el primer aminoácido es metionina, éste es removido después de la iniciación de la síntesis de la proteína. B. Efecto de una mutación por transversión. En la región indicada por la flecha, aparece la mutación o cambio de una timina por adenina. Como consecuencia cambia el triplete correspondiente en el RNA mensajero y finalmente un aminoácido en la proteína.

III. JUSTIFICACION

El presente trabajo se realiza para determinar una posible correlación entre la alta incidencia de abortos de los últimos años (57), y la administración de metronidazol como terapia contra la amibiasis, puesto que no se ha encontrado una causa satisfactoria para este problema.

Para determinar la actividad mutagénica del metronidazol, en caso de presentarla, se realiza un trabajo en paralelo con el Sistema de Células Meióticas de Tradescantia clone # 4430.

57. De la Torre V.R; Mortalidad Perinatal, MEMORIAS DEL CONCYTEC México, 1989, pp. 26.

IV. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1o. Comprobar la posible actividad teratógena del Metronidazol mediante su administración a ratones hembra en período de gestación.

2o. Demostrar la frecuencia de abortos debidos a la administración de Metronidazol a ratones hembra durante el período de gestación.

3o. Determinar la actividad mutagénica del Metronidazol con el Sistema de Células Meióticas de Tradescantia.

V. MATERIAL Y METODOS.

1. TERATOLOGIA

El ratón es el animal más utilizado en la investigación por ser barato, de manejo fácil y de alta capacidad reproductora. Existen cepas muy uniformes genéticamente debida a muchas generaciones de cruza consanguíneas, la que reduce el número de animales necesario para dar resultados significativos.

Se utilizan ratones en investigaciones de virología, farmacología, teratología, etc. Existen muchas cepas especiales derivadas de cruza de animales con las características deseadas. La más comun es la albina o suiza.(58)

La reproducción en el ratón hembra maduro consiste de una serie de eventos hormonales y neurales interrelacionados, los cuales tienen la función de asegurar la satisfactoria producción de nuevos miembros de la especie.

Es fundamental en este proceso la interacción de las hormonas de la pituitaria anterior, placentarias y gonadales. También es básico el papel del sistema nervioso central, particularmente del hipotálamo, en la regulación de las hormonas liberadas por la pituitaria anterior y en su momento, de los efectos de las hormonas gonadales sobre el hipotálamo mismo.(59)

58. Varios autores, ANIMALES DE LABORATORIO, Instituto Mexicano del Seguro Social, Facultad de Veterinaria y Zootecnia, México, 1986, UNAM.

59. Coleman L.D., Dagg P.Ch., Kaliss N., Russel E., Fuller L.J.; BIOLOGY OF THE LABORATORY MOUSE, 2a. Ed., Dover Publications Inc., New York, 1975, 11:187-200.

La hormona folículo estimulante, una gonadotropina liberada por la pituitaria anterior, actúa primeramente para promover la gametogénesis en ambos sexos. La hormona luteinizante, otra gonadotropina, tiene como función primaria la promoción de la secreción de las hormonas gonadales; estrógenos y progesterona en la hembra y andrógenos en el macho. Una tercera parte de la producción de la pituitaria, la hormona prolactina, funciona en la lactancia y el desarrollo del ovario durante la gestación. Las hormonas gonadales y el sistema nervioso central tienen la responsabilidad de mantener las características sexuales secundarias y en condiciones óptimas el tracto reproductor para asegurar la satisfactoria maduración. La maduración sexual depende por lo general de un delicado y todavía no bien comprendidos serie de eventos interrelacionados de todos los componentes y de la maduración de cada uno de estos procesos en su momento.

La diferenciación sexual de la hipófisis se completa generalmente al sexto día en los machos y después del doceavo día en las hembras. El peso del ovario viene a ser responsabilidad de la hormona folículo estimulante exógena, entre el 6o. y 9o. día pero el tamaño del folículo no puede verse modificado por inyecciones de la misma hormona mucho antes de los doce a quince días de edad.

La formación normal del antrum comienza en algunos folículos alrededor del 12o. a 14o. día.

La ovulación ocurre en 40% de las hembras a los 13 o 14 días de edad.

La maduración sexual normalmente ocurre coincidentemente con la elevación de los títulos de gonadotropina circulante, después de las 4 semanas. Los primeros signos de la pubertad observables en las hembras son estrógeno dependientes: El introito y la mancha vaginal. Otros signos son la necesidad del apareamiento, la habilidad para concebir y que existen pequeños cambios de temperatura se utilizan como parámetros para determinar la maduración sexual.

En los ratones albinos de MacDowell Bagg, la ovulación usualmente tiene lugar entre las 24:00 hrs y las 3:00 hrs, mientras que el apareamiento ocurre más comunmente entre las 10:00 PM y la 1:00 AM.

En estos casos, el apareamiento precede a la ovulación con un rango de aproximadamente 2 horas. El intervalo varía considerablemente desde 1 hora hasta 3 $\frac{3}{4}$ horas .

Braden en 1957 estableció que el punto medio del periodo de ovulación ocurre alrededor de 3 $\frac{1}{2}$ hrs después del punto medio del período oscuro cuando los animales son sometidos a un ciclo de 10 horas de obscuridad contra 14 horas de luz.

La demora promedio es de 4 $\frac{3}{4}$ después del punto medio del periodo de obscuridad en animales a los que se les somete a un ciclo de 4 horas de obscuridad contra 20 horas de luz.

El apareamiento en ratones de laboratorio es detectado por la ocurrencia de un tapón vaginal. Estos tapones son formados por una mezcla de las secreciones de las glándulas vesiculares del macho, coagulándose y usualmente llenan la vagina desde el cérvix hasta la vulva. Ocasionalmente tapones pequeños y conspicuos son formados, lo cual es una condición muy común en un

apareamiento postparto.

Los tapones persisten por 16 a 24 horas y pueden llegar hasta 48 horas.

La eficiencia de la utilización de los tapones para la predicción de la pregnancy es usualmente alta. Snell reporta en 1941, que en dos experimentos con diferentes cepas 80 a 90% de las hembras maduras que mostraron tapón vaginal estuvieron preñadas. Se puede estimular a la hembra poniéndola junto al macho y esto es tan buen estímulo como el olor asociado a la orina del macho.

Esto actúa removiendo su ciclo y ha mostrado que más hembras pueden lograr tener un estro tres días antes de aparearlas.

El cuerpo lúteo (60) funcional no se establece en ratones hembras que no han tenido un apareamiento. El acto del apareamiento produce una activación diseminada del sistema nervioso incluyendo el hipotálamo, a través de la promoción de la liberación de hormona luteotrópica (LTH) por la pituitaria anterior. La administración de hormona luteinizante puede causar luteinización en el ovario del ratón hembra cuando no hay ovulación, pero el desarrollo del cuerpo lúteo funcional está bajo el control de la LTH. (La prolactina en el ratón).

Este es probablemente un bloqueo neural de la liberación de la LTH la cual previene la formación de un cuerpo lúteo funcional y consecuentemente, altos títulos de progesterona durante el ciclo estrogénico infértil.

60. Masa amarilla celular de función glandular endócrina en el lugar ovisaco que se ha desembarazado de su óvulo, en: Mascaró J.M. Op. Cit. pp. 257

Si el apareamiento ocurre, el cuerpo lúteo funcional se desarrolla, el útero viene a estar bajo dominancia progestacional, y la ovulación y ciclos estrogénicos subsiguientes son inhibidos.

La implantación normalmente ocurre alrededor del 5o. día después de la inseminación coincidiendo con la elevación de los niveles de progesterona. La secreción de la hormona placentaria es de menor importancia en el mantenimiento de la pregnancy del ratón que en el de otras especies.

La gestación en el ratón normalmente es de 19 a 21 días. El grado de pérdida de embriones es alta en los estados tempranos de la pregnancy.

Hollander y Strong (1950) establecieron un promedio en el nivel de mortandad postimplantación de 15% en sus stocks. La mortandad se observó que existe en todos los estados de la vida del embrión pero en el 72% de los casos de muerte se observó que ocurre en los tres primeros días antes de la implantación. (61)

La pérdida de huevos después de la implantación puede disminuir bastante y realizarse la reproducción normalmente. Un factor no correlacionado con la pérdida intrauterina es la gran cantidad de embriones en el útero. Bowman y Roberts (1958) reportaron una pequeña correlación entre el número de blastocistos implantados y la cantidad de mortalidad intrauterina, pero nunca pudieron encontrar que la pérdida de los huevos se debiera al número existente implantados.

61. Fijación del huevo fecundado en la mucosa uterina, en Mascaró J.M. Op. Cit pp. 521

Las posibles causas para el descenso en el potencial de la reproducción son muchas y pueden inicialmente clasificarse como genéticas o ambientales. Muchos ratones del laboratorio son hijos de padres consanguíneos y esto se sabe que se acompaña de un grado de ineficiencia reproductiva.

El incremento de la demanda de un buen lugar de la hembra durante la pregnancy, hace que sea susceptible a muchos factores del medio ambiente. Biggers et. al. (1958) reportó un incremento en la mortalidad pre o post-implantacional en ambientes en los cuales hacia o mucho calor o mucho frío.

La pregnancy y la pseudopregnancia, al igual que otros aspectos de la reproducción del ratón hacen susceptible a la hembra, alterándola en su ambiente social.

El período de lactancia es crítico en término de desarrollo para la vida del ratón. Se ha estimado que la influencia materna cuenta alrededor del 72% de la varianza asociada con el peso corporal lo cual toma hasta el 12o. día. La duración normal de la lactancia en el ratón es alrededor de 4 semanas, pero esto es variable dependiendo de las circunstancias particulares de cada uno. La producción de la leche no es constante durante toda la lactancia. Se produce abundantemente durante los 10 primeros días y después decae hasta la supresión total. (62)

62. Colema L. D.; Op. Cit., pp. 187-200

Se utilizaron 45 hembras y 10 machos de ratón de la cepa CD-1 de 2 a 5 meses de edad con un peso de 25 a 35 g. Los animales se aparearon en una proporción de 5:1 por un periodo de tres días. Esta es la técnica usada por las autoras del presente método para repoblar su bioterio. El motivo de la modificación obedece principalmente a la baja proporción de apareamiento que hay durante media hora que es la metodología original, y además la pequeña población de ratones hembras disponibles.

Las hembras preñadas fueron distribuidas al azar en un grupo experimental y uno de control dejando que continuara la gestación normalmente hasta el sexto día, en el que inició el tratamiento que consistió en el primer caso de administrar por vía oral 0.75 mg/ml de metronidazol al día en tres dosis (63), durante 10 días y en el segundo fueron tratadas de la misma manera que las primeras recibiendo volúmenes iguales de agua.

En el decimosexto día de la gestación fueron sacrificadas y se realizó una extracción de cada uno de los fetos existentes, y debido a que se dejaron en apareamiento por un lapso de 3 días, existieron fetos de 15, 16, y 17 días. En éstos se observó la morfología externa y los abortos presentes. (64)

63. Dosificación: Adultos 1.5 g/70kg/24 horas durante 5 a 10 días. Se calculó realizando una correlación al peso promedio de los ratones. En: Rosenstein E. Idem.

64. Márquez M.C.: ACCION DEL DIAZEPAM SOBRE LA OSTEOGENESIS DE LA TIBIA FETAL DEL RATON. Boletín informativo de la Universidad Autónoma de México, México, 1982.

Para determinar el grado de significancia de la diferencia entre el grupo tratado y el control, se utiliza un análisis de varianza, para lo cual determinamos una hipótesis nula y una alterna las cuales son:

Hipótesis nula: La media de los tratamientos es igual a la media de los controles negativos.

Hipótesis alterna: La media de los tratamientos es diferente de la media del grupo control.

Se utiliza el estadístico F para determinar si la hipótesis nula se acepta o se rechaza, donde :

$F = \text{CMT} / \text{CME}$, y F está basada en $v_1 = (p - 1)$ y $v_2 = (n - p)$ grados de libertad. La región de rechazo se presenta en donde $F > F_{\alpha}$ donde F_{α} se encuentra en el extremo superior de la distribución F (con $v_1 = p - 1$ y $v_2 = n - p$) y satisface la relación $P(F > F_{\alpha}) = \alpha$

$$\text{CMT} = \text{SCT} / p - 1$$

$$\text{CME} = \text{SCE} / n - p$$

$\text{SCT} = (\text{Suma de cuadrados de los totales de los tratamientos con cada cuadrado dividido entre el número de observaciones en dicho total}) - \text{CM}$

$$\text{SCE} = \text{SC Total} - \text{SCT}$$

$$\text{SC Total} = (\text{Suma de cuadrados de todas las } y) - \text{CM}$$

$$\text{CM} = (\text{Suma de todas las observaciones})^2 / n$$

donde:

CMT = Cuadrado medio de los tratamientos

CME = Cuadrado medio del error.

p = Número de tratamientos

n = Número de observaciones. (65)

65. Mendenhall W.: INTRODUCCION A LA PROBABILIDAD Y ESTADISTICA, 1a. Ed., Wadsworth, Inc., 1982, 13:442.

2. MUTACION

Generalmente una muestra típica para el bioensayo de MCN en Tradescantia, se compone de inflorescencias jóvenes (16 a 18 botones en un racimo) en un brazo de 6-8 cm de largo (10-15 cm si se usa el clon #4430). Muestras con tallo más largo y más hojas tienen mejor capacidad de absorción de agentes líquidos. Estas se deben coleccionar al azar, suspenderse en una taza o vaso con cubierta de aluminio perforada e iluminarse con luz artificial en condiciones controladas de laboratorio. Aunque el agua de la llave es adecuada para tratamientos cortos, se recomienda solución de Hoagland para el mantenimiento de los cortes de planta. Los cortes se deben sumergir en la solución.

Para el tratamiento con agentes líquidos, se disuelve una cantidad conocida del agente químico (molaridad o porcentaje) en la solución y el pH se ajusta a un límite tolerable (5.5-8.5). Se requiere constante aereación (burbujeo) para proporcionar oxígeno y mantener bien mezclada la solución. Agentes insolubles en agua se pueden disolver en un solvente primario que se pueda mezclar con agua. En este último caso, se debe usar un blanco con el solvente puro como control. El tratamiento con agentes líquidos muy volátiles se debe hacer en una campana y se debe tener un blanco para poder diferenciar el efecto del líquido solo, del efecto combinado de líquido y vapores.

66. Ma T.H.: Prueba de Micronúcleos en Tradescantia (MCN-TRAD) para clastógenos ambientales., PRUEBAS DE TOXICIDAD IN VITRO PARA AGENTES AMBIENTALES, Parte A,

Debido a las diferencias en la sensibilidad de las etapas de la meiosis y a profase temprana que es la de máxima sensibilidad, el tiempo de recuperación, mejor referido como tiempo meiótico, se debe permitir que transcurra antes de la fijación.

El tiempo de recuperación es en realidad la duración necesaria para que los cromosomas dañados en la profase temprana, lleguen a la etapa de las tétradas tempranas, que es cuando se cuentan los micronúcleos. En este caso, de acuerdo con las etapas de duración determinadas por Taylor (1950), un tiempo meiótico generalmente adecuado es de 24 a 30 horas. Durante el período de recuperación, las muestras tratadas se regresan a la solución limpia o aire limpio. Es muy común que el agente usado en el tratamiento interfiera con el proceso meiótico normal especialmente cuando se usa una sobredosis, lo cual causará un retardo de horas o incluso días en la meiosis. Al final del tiempo de recuperación, las muestras se pueden fijar en un vial con una mezcla de etanol-ácido acético (en una razón de 3:1) y preparado justo antes de usarse) durante un tiempo de 24 a 48 horas. Las muestras de los viales pueden ser almacenadas en el refrigerador por meses e incluso por años. Si es el caso de que se van a preservar por un largo período de tiempo, la solución de etanol se debe cambiar de vez en cuando para preservar la muestra y obtener una mejor tinción.

Para hacer micropreparaciones el equipo básico requerido es: una lente amplificador iluminado (1.5-2X), un par de agujas de disección, un microscopio con una capacidad de amplificación de 100X y 250X y un mecanismo para mover la preparación (mechanical stage), portaobjetos limpios con cantos esmerilados para poder identificarlos y cubreobjetos No. 1 (22X33mm).

Se requiere de colorante de acetocarmina y ácido acético para poder teñir y destañar respectivamente. Se requiere de una mesa de laboratorio de preferencia con superficie oscura, para poder contrastar la imagen de las anteras y botones antes de la tinción y también de una tira de papel blanco para tener un fondo (background) para las células madres de polen después que se han teñido con carmina.

El procedimiento de la preparación está basado en el método de aplastamiento (squash) de la acetocarmina para cromosomas de planta. Lo difícil de esta técnica, es la selección del botón adecuado en la etapa de tétradas tempranas, partiendo de todos los botones en la inflorescencia. Cuando se disectan los botones más pequeños y las células madre de polen son separadas de la antera, lo que se encuentra usualmente son profases temprana I, paquíteno o diplóteno. En esta etapa no se pueden observar en un microscopio de luz los cromosomas rotos. Los botones se siguen en tamaño, pueden contener ya sea metafase I, como anafase I en la misma preparación ya que la duración de estas etapas es muy corta. Los cromosomas rotos son observados como fragmentos fuera del plato de la metafase o como cromosomas retardados (laggards) entre la configuración de la anafase. El siguiente par de botones más largo puede contener telofases I y diadas (etapa de dos células), y los micronúcleos se forman usualmente fuera de lo que es propiamente el núcleo. El séptimo u octavo par de botones a partir de la punta de la pirámide, generalmente contiene tétradas.

La etapa de tétradas en Tradescantia es relativamente larga y puede ser dividida en tres subetapas: tétradas tempranas, medias y tardías. Con

el fin de asegurar la más alta frecuencia de micronúcleos, se deben usar solamente tétradas tempranas de acuerdo con el programa de tiempo meiótico de 24 a 30 horas. Una característica que distingue a las tétradas tempranas, es la posesión de una cubierta intacta alrededor de las cuatro células de la tétrada, lo cual hace posible que las células permanezcan juntas durante el tratamiento de calentado y presión a la hora de hacer las preparaciones. Las tétradas medias tienen el núcleo alargado y cromosomas desarrollados, lo que dificulta distinguir el micronúcleo ya que los fragmentos de cromosoma en forma de micronúcleo también se encuentran desenrollados durante esta etapa (a esta etapa también se le conoce como etapa oscura). Las tétradas tardías tienen un núcleo más pequeño, similar al de las tétradas tempranas, pero la desaparición de la cubierta tiende a hacer que las tétradas se separen y se conviertan en células libres de forma semicircular.

Generalmente solo un botón en toda la inflorescencia contiene tétradas tempranas o incluso puede no haber ninguno, siendo la probabilidad de que exista en una inflorescencia normal de 30 a 50%.

Para encontrar un botón en la etapa adecuada es necesario disectar el botón, exponer las células madres depolen presentes en las anteras y teñir con acetocarmina para hacer una primera observación usando una amplificación de 100X.

Tan pronto como se encuentra la etapa de tétradas tempranas, se deben macerar aún más las anteras para asegurarse que la mayoría de las tétradas son liberadas. Para mantener las tétradas (no se debe permitir que la punta del gotero toque las células).

Si se añade mucho colorante, puede hacer muy difícil la disección y limpiado de las impurezas (debris). Una vez que la mayoría de las tétradas han sido separadas de la antera, se deben remover los fragmentos de la pared de la antera e impurezas fuera del portaobjetos y se pone un cubreobjetos cuidadosamente para evitar desordenar a las tétradas. Si se tiene suficiente colorante bajo el cubreobjetos puede ayudar a que las células se dispersen homogéneamente y no haya amontonamiento. El siguiente paso es calentar a una temperatura de 80 C en un plato caliente o en la flama de una lámpara de alcohol. Las preparaciones se deben poner y quitar en el plato caliente o la flama de tres a cuatro veces repetidamente y en seguida se presiona suavemente con la mano bajo muchas capas de papel absorbente.

El desteñido se puede llevar a cabo adicionando una o dos gotas de ácido en el cubreobjetos con una tira de papel absorbente en el lado opuesto de éste. Después de que los núcleos de las células están bien diferenciados, se procede a contar. Si este se realiza dentro de 8 horas, no es necesario sellar el cubreobjetos.

Las preparaciones temporales se pueden hacer sellando el cubreobjetos con Euparal, pigmento para uñas o cera. Estas preparaciones se deben contar dentro 48 horas antes que el colorante cristalice y aparezcan puntos o manchas de colorante que se confundan con los micronúcleos. Si se quita el cubreobjetos después del desteñido usando una técnica de congelación rápida en hielo seco (Conger y Fairchild, 1953), se pueden obtener preparaciones permanentes.

La técnica de congelamiento rápido se lleva a cabo simplemente dejando la preparación en una

superficie plana del hielo seco o en la superficie fría del plato durante 10 a 15 minutos y después usar una hoja de rasurar para separar el cubreobjetos sin dañar las células en las preparaciones. Si se usa hielo seco, la preparación sin el cubreobjetos puede ser deshidratada pasándola por alcohol al 70% y 95% (15 minutos en cada una) y montándola en Euparal. Si se usa plato frío las preparaciones se deben secar al aire durante la noche, destañir en ácido acético al 45% y deshidratar pasando por las soluciones de etanol.

Un bioensayo estándar para un agente dado normalmente, se compone de varios grupos de tratamiento en los que se incrementa la dosis y un grupo control. Las preparaciones de los diferentes grupos experimentales, se deben hacer simultáneamente y se deben marcar correctamente con un lápiz 3H. El canto esmerilado marcado, se debe cubrir tanto la parte de abajo como la de arriba con masking tape de color oscuro y luego se le asigna una clave asumida con un marcador de cera de color claro, de tal forma que las preparaciones se cuenten sin saber a que experimento pertenecen.

Si se observan las preparaciones con un aumento de 100X, se pueden ver en el campo observado alrededor de 50-100 tétradas, y se pueden contar los micronúcleos de diferente tamaño o diferente número en cada célula. Sin embargo no se recomienda hacer el conteo en ésta amplificación tan baja, a menos que se utilice una red ocular (grid). Si el conteo se hace en una amplificación baja, se puede incrementar la eficiencia del conteo pero disminuir mucho el muestreo al azar. Generalmente el conteo se lleva a cabo haciendo un barrido de la preparación de un lado a otro y enfocando en un lugar seleccionando al azar, bajo

una amplificación de 250X, para contar las tétradas normales y tétradas con 1,2,3,4 o 5 ó más micronúcleos.

Los datos se deben registrar en las columnas apropiadas de la hoja de conteo. Los datos se deben considerar como el número total de micronúcleos en el número total de tétradas contadas. El número total de micronúcleos es la suma de 1,2,3,4 y 5 ó más micronúcleos contenidos en una sola célula multiplicados por cada una de las frecuencias registradas en la hora de conteo. El número total de tétradas es usado para dividirse entre el número total de micronúcleos. La fracción final multiplicada por 100 es el número de micronúcleos por 100 tétradas.

Cuando se ha terminado el conteo de todas las preparaciones de un experimento dado, se quita el masking tape para poder registrar los datos con las claves originales. Una muestra de la población está constituida de unas 300 tétradas por preparación. Los valores de los números de micronúcleos por 100 tétradas de 5 a 10 muestras de una población se almacenan juntos para calcular los valores de la media, desviación estándar y error estándar.

La prueba de T student o la prueba de Dunnet, se pueden usar para evaluar el grado de significancia de la diferencia entre el grupo tratado y el grupo control". (67)

Las pruebas estadísticas empleadas para analizar los resultados fueron las siguientes:

1. Media y su desviación standart. (68)

67. Ma T. H., Idem

68. Walpole E. R., PROBABILIDAD Y ESTADISTICA PARA INGENIEROS, 2a. Ed., Interamericana, México 1986, pp.

$$S = \sqrt{(X - \bar{X})^2 / N - 1}$$

S = Desviación Standard

2. Error estándar de la diferencia de medias, con una distribución t de Student.

$$s_d = \sqrt{\frac{S_A^2}{N} + \frac{S_B^2}{N}}$$

s_d = Error estándar

S_A^2 = Error estándar del grupo de tratamiento.

S_B^2 = Error estándar del grupo control.

N = Número de muestras.

$t_d = \bar{d} - U / S_d$.

\bar{d} = Diferencia de medias.

$U_d = H_0$; Valores de tratamientos = Valores del gpo. control.

$U_d = H_1$; Valores de tratamientos \neq Valores del gpo. control.

3. Diferencia media de Dunnett (DMD)

$$DMD = D \ S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}$$

$$S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = \sqrt{2CME/C}$$

CME = Cuadrado medio del error.

C = Número de repeticiones.

4. Modelo de regresión lineal múltiple (SPSS/PC the Statistical Package for IBM PC "Multiple regression")

$$R^2 = SCR/SCT$$

SCR = Suma de los cuadrados de la regresión.

SCT = Suma total de los cuadrados.

f = Indica la significancia del modelo explicado por la regresión (f = 0.01)

$$f = \frac{SCR / k}{S^2}$$

SCR = suma de los cuadrados de la regresión.

K = No. de variables independientes.

n = No. de muestras:

$$S^2 = SCE / (n-k-1)$$

SCE = Suma de los cuadrados del error. (69)

La aplicación de éste método se hizo con el programa computarizado SPSS/PC The Statistical Package for IBM PC "Multiple regression".

69. Walpole E. R. ; Idem.

VI. RESULTADOS

Se realizó un trabajo preliminar en el que se obtuvieron la misma proporción de puntos hemorrágicos y reabsorciones de las hembras controles y tratadas. No se observaron diferencias morfológicas en los productos observados. Al incrementar la población estudiada, aparecieron diferencias claras entre los dos grupos, como fueron incremento de puntos hemorrágicos (Fig. 3) y reabsorciones, (Fig. 4).

Los resultados se muestran en la tabla No. I, y II con los que se realizó un análisis de varianza, obteniendo como resultado una igualdad de medias poblacionales. (Tabla No. III y siguientes).

Con estos resultados se decide aceptar la hipótesis nula de igualdad de medias de fetos, puntos hemorrágicos y reabsorciones. Esto orienta a suponer que la cantidad de abortos espontáneos permanece constante en ambos grupos.

El análisis cualitativo macroscópico de los productos muestra algunos fetos con reabsorción de extremidades tanto anteriores como posteriores (Fig. 5 y 6) y se presentó destrucción encefálica (Fig. 7 y 8). Como observación, cabe mencionar que en ningún caso este tipo de anomalías se presentaron en el grupo control,

Se realizaron los histogramas de frecuencia para cada caso, del número de fetos, número de puntos hemorrágicos y reabsorciones observándose que existe una tendencia a la normalidad, que se pudiera corroborarse con un incremento en el número de ratones tanto en el grupo de tratamiento como en el de control.

TABLA NO. I

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL TRATAMIENTO DE
METRONIDAZOL POR VIA ORAL (0.75 MG POR DIA
DURANTE 10 DIAS)

	No de FETOS	REABSORCIONES	PUNTOS HEMORRAGICOS
1.	10	2	0
2.	10	2	0
3.	7	1	0
4.	12	2	0
5.	9	1	0
6.	10	3	0
7.	15	2	0
8.	13	0	0
9.	9	2	3
10.	15	0	2 *
11.	13	0	1
12.	12	1	0
13.	16	0	0
14.	13	1	0
15.	13	0	1
16.	13	2	3
17.	13	0	1
18.	19	2	0 *
19.	13	0	0 *
20.	13	0	4
21.	10	0	1
22.	14	0	0
23.	13	0	1
24.	12	0	0
25.	17	0	1
26.	15	2	0

CONT. TABLA I

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL TRATAMIENTO DE
METRONIDAZOL POR VIA ORAL (0.75 MG POR DIA
DURANTE 10 DIAS).

	No. de FETOS	REABSORCIONES	PUNTOS HEMORRAGICOS
27.	16	2	0
28.	11	2	1
29.	5	2	0
30.	7	0	3
31.	11	0	1
32.	12	2	0
33.	6	0	1

* Se observaron anomalías en los fetos, tales como falta de dedos, de la parte inferior del brazo y destrucción encefálica.

TABLA No. II

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL TRATAMIENTO DE
METRONIDAZOL. CONTROLES NEGATIVOS

No.	DE FETOS	REABSORCIONES	PUNTOS HEMORRAGICOS
1.	10	2	0
2.	10	2	0
3.	12	1	0
4.	12	0	0
5.	5	0	4
6.	10	0	0
7.	12	0	0
8.	15	0	0
9.	12	0	0
10.	15	2	0
11.	6	1	2
12.	9	0	1



FIGURA No. 2
FOTOGRAFIA DE UNA GESTACION NORMAL.



FIGURA No. 3
PUNTO HEMORRAGICO LOCALIZADO ENTRE UTEROS NORMALES.



FIGURA No. 4
ILUSTRACION DE UNA REABSORCION



FIGURA NO. 5
SE OBSERVA LA FALTA DE LA PARTE INFERIOR DE LA
EXTREMIDAD ANTERIOR.



FIGURA NO. 6
SE OBSERVA QUE EXISTE FALTA DE LA PARTE INFERIOR DE LA
EXTREMIDAD POSTERIOR.

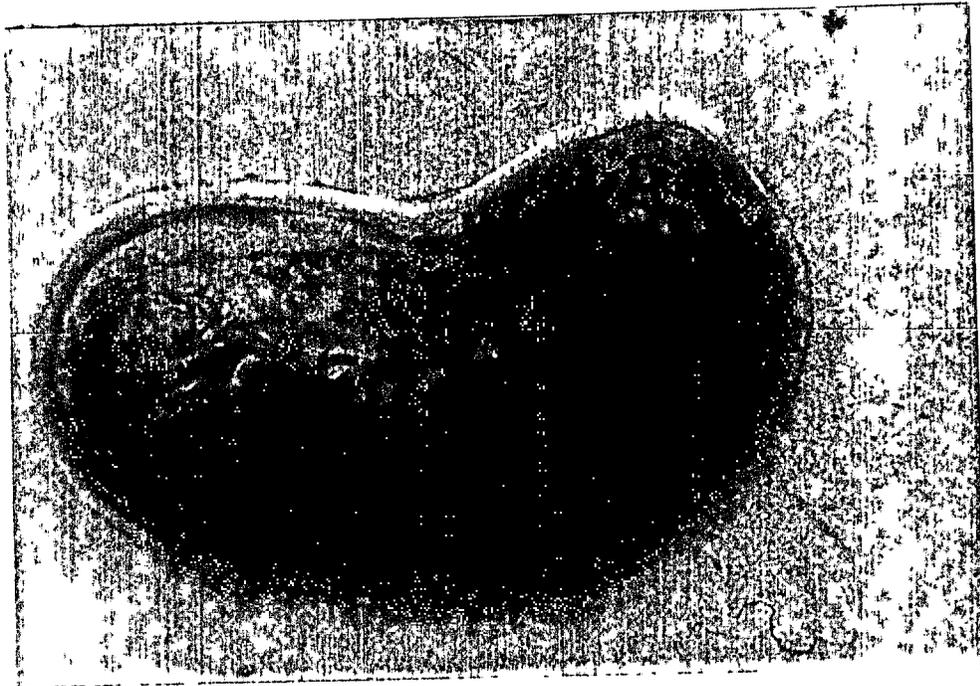


FIGURA No. 7

ILUSTRACION DE UN FETO CON ALTERACION ENCEFALICA



FIGURA No. 8

COMPARACION DE UN FETO NORMAL Y EL QUE PRESENTA
ALTERACION CRANEANA

TABLA NO. III

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE VARIANZA PARA EL
NUMERO DE FETOS.

GRUPO	SUMA DE CUADRADOS	F OBTENIDA	F CALCULADA
TRATAMIENTO	397	1.67	4.08
CONTROL	128		

TABLA NO. IV

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL ANALISIS DE VARIANZA PARA EL NUMERO DE REABSORCIONES.

GRUPO	SUMA DE CUADRADOS	F OBTENIDA	F CALCULADA
TRATAMIENTO	31	0.68	4.08
CONTROL	12		

TABLA NO.V

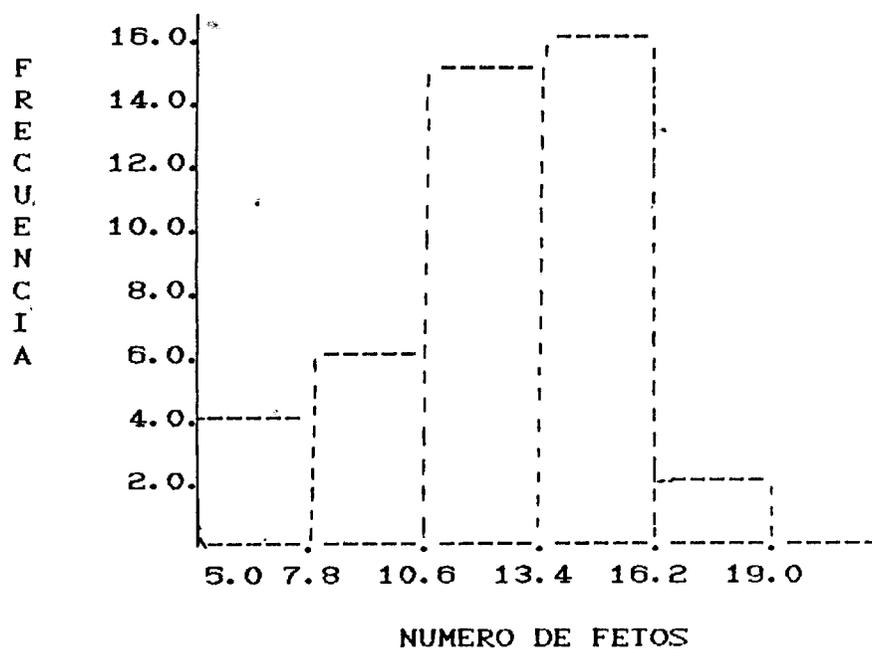
RESULTADOS OBTENIDOS CON EL ANALISIS DE VARIANZA PARA
LOS PUNTOS HEMORRAGICOS

GRUPO	SUMA DE CUADRADOS	F OBTENIDA	F CALCULADA
TRATAMIENTO	33	0.14	4.08
CONTROL	12		

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA PARA EL

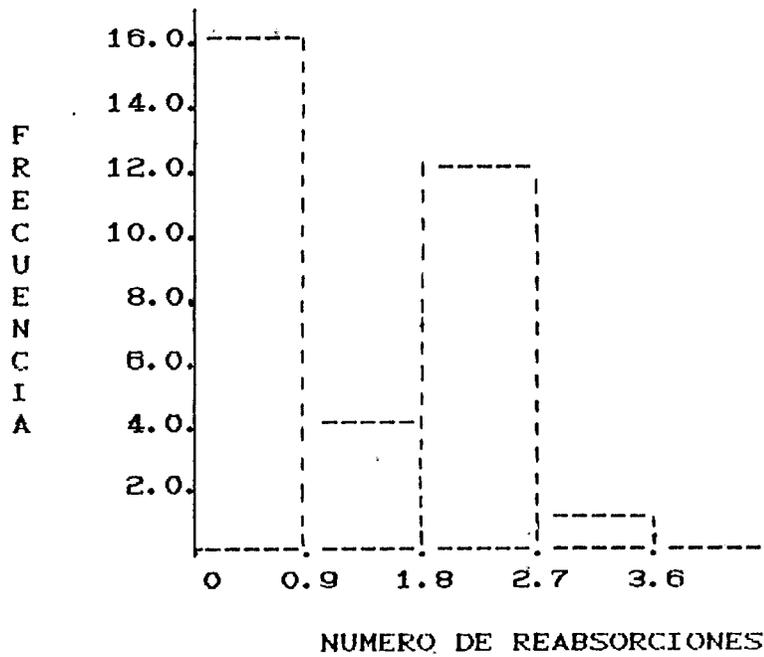
NUMERO DE FETOS

GRUPO DE TRATAMIENTO



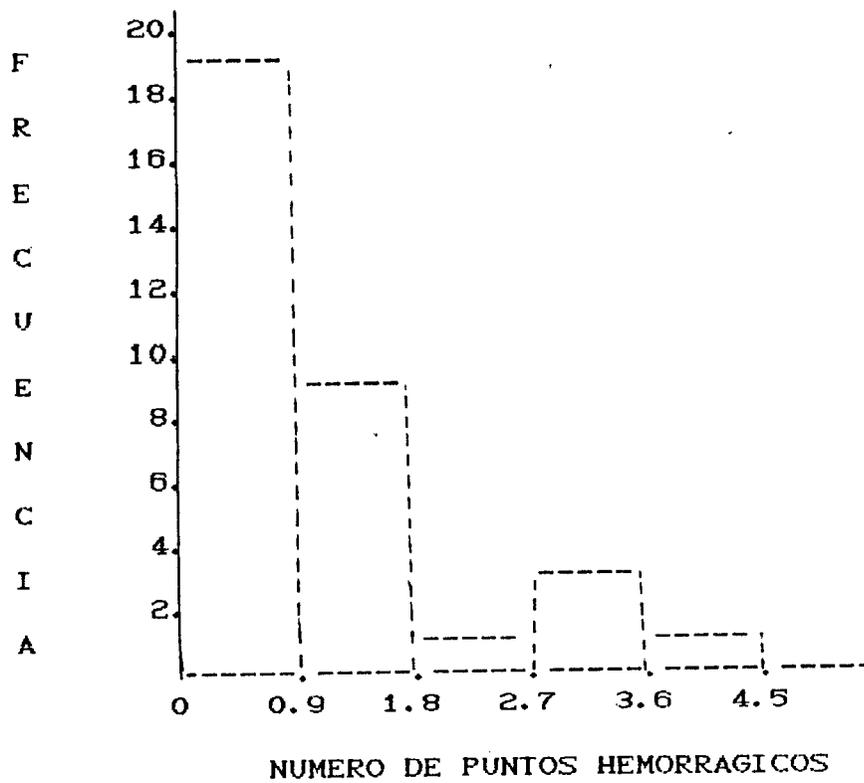
GRAFICA No. I

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA PARA EL No. DE
REABSORCIONES
GRUPO DE TRATAMIENTO



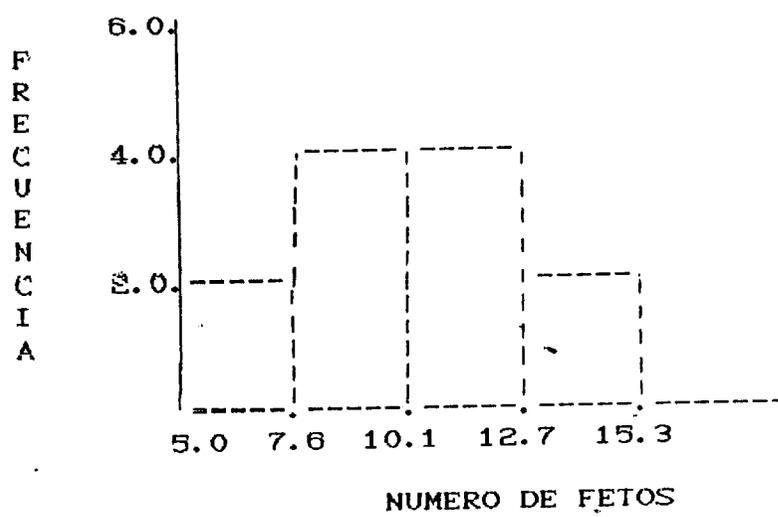
GRAFICA No. 2

HISTOGRAMA DE FRECUENCIAS PARA EL
No. DE PUNTOS HEMORRAGICOS.
GRUPO DE TRATAMIENTO



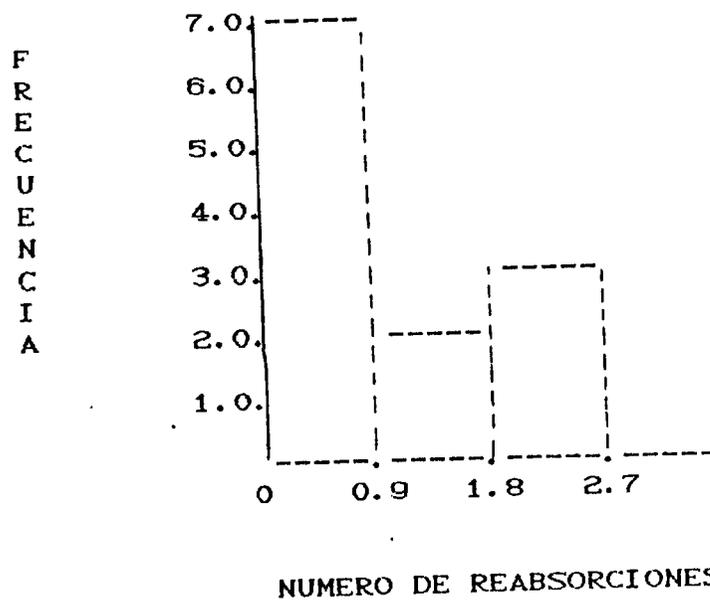
GRAFICA No. 3

HISTOGRAMA DE FRECUENCIAS DE
NUMERO DE FETOS.
GRUPO CONTROL.



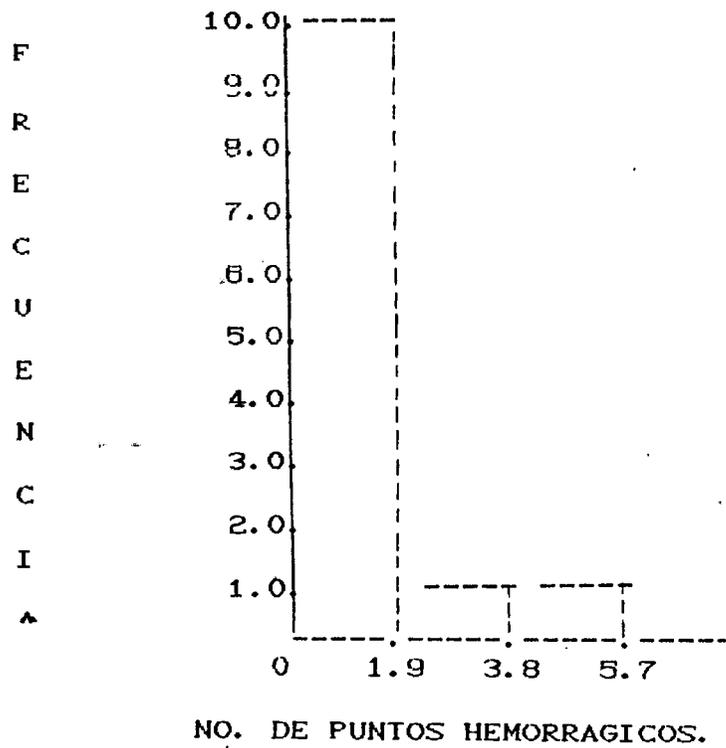
GRAFICA No. 4

HISTOGRAMA DE FRECUENCIAS PARA
EL No. DE REABSORCIONES
GRUPO CONTROL



GRAFICA No. 5

HISTOGRAMA DE FRECUENCIAS PARA EL
No. DE PUNTOS HEMORRAGICOS.
GRUPO CONTROL



GRAFICA No. 6

Con el sistema de Tradescantia Clone # 4430, se obtuvieron los resultados presentados en las tablas VI y siguientes. Este sistema presenta toxicidad al aplicar la concentración de 0.5 mg/100 ml que se manifiesta por la falta de tinción de las células meióticas. Esto pudiera explicarse por alguna interferencia del Metronidazol en el ciclo germinal del sistema de Tradescantia, de manera que no puede ser determinada la acción mutágena del mismo mediante este sistema. Se observa mediante la prueba estadística de la diferencia media de Dunnet, que existe diferencia significativa entre la concentración de 0.2 mg/100 ml y las demás incluyendo el grupo control, pero la media poblacional no supera el 5% requerido para poder afirmar que pudiera tener actividad mutagénica.

TABLA NO. VI

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL SISTEMA DE TRADESCANTIA
CLONÉ # 4430 CON EL TRATAMIENTO DE METRONIDAZOL EN
DOSIS DE 0.05, 0.1, 0.2, Y 0.5 MG/100 ML .

METRONIDAZOL 0.05 mg/100 ml				METRONIDAZOL 0.1 mg/100 ml		
No. de Células	MCN	%	No. de células	MCN	%	
1.	300	10	3.33	300	12	4.0
2.	300	11	3.66	300	14	4.66
3.	300	10	3.33	300	9	3.0
4.	300	6	2.0	300	14	4.66
5.	300	8	2.66	300	8	2.66
6.	300	5	1.66	300	5	1.66
7.	300	5	1.66	300	10	3.33
8.	300	5	1.66	300	11	3.66
9.	300	6	2.0	300	9	3.0
10.	300	6	2.0	300	13	4.33
2.4 MCN/100 TETRADAS			3.07 MCN/100 TETRADAS			

METRONIDAZOL 0.2 mg/100 ml			METRONIDAZOL 0.5 mg/100 ml			
No. de Células	MCN	%	No. de Células	MCN	%	
1.	300	13	4.33	300	4	1.33
2.	300	5	1.66	300	10	3.33
3.	300	10	3.33	300	9	3.0
4.	300	19	6.33	300	19	6.33
5.	300	4	1.33	300	9	3.0
6.	300	55	18.33	300	14	4.66
7.	300	17	5.66	300	18	6.0
8.	300	9	3.0	300	15	5.0
9.	300	12	4.0	300	5	1.66
10.	300	15	5.0	300	11	3.66
5.3 MCN/100 TETRADAS			3.8 MCN/100 TETRADAS			

TABLA NO. VII.

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL SISTEMA DE TRADESCANTIA CLONE
4430 CON EL GRUPO CONTROL NEGATIVO

	No. de Células	MCN	%
1.	300	4	1.33
2.	300	5	1.66
3.	300	6	2.0
4.	300	9	3.0
5.	300	3	1.0
6.	300	6	2.0
7.	300	2	0.66
8.	300	7	2.33
9.	300	6	2.0
10.	300	5	1.66

1.767 MCN/100 TETRADAS.

TABLA NO. VIII

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL SISTEMA DE TRADESCANTIA CLONE 4430 CON EL TRATAMIENTO DE METRONIDAZOL EN DOSIS DE 0.05, 0.1, 0.2 Y 0.5 MG/ 100 ML. (2ª REPETICION)

METRONIDAZOL 0.05				METRONIDAZOL 0.1		
mg/100 ml				mg/100 ml		
No. de Células	MCN	%		No. de Células	MCN	%
1.	300	27	9.0	300	16	5.33
2.	100	6	6.0	300	11	3.66
3.	300	11	3.66	300	7	2.33
4.	300	11	3.66	300	2	0.66
5.	300	7	2.33	300	7	2.33
6.	300	14	4.66	300	15	5.0
7.	200	4	2.0	300	4	1.33
8.	300	4	1.33	300	5	1.66
9.	300	6	2.0	300	28	9.33
10.	300	1	0.33	300	15	5.0
3.37 MCN/100 TETRADAS				3.66 MCN/100 TETRADAS		

METRONIDAZOL 0.2				METRONIDAZOL 0.5		
mg/100 ml				mg/100 ml		
No. de Células	MCN	%		No. de Células	MCN	%
1.	300	9	3.0	300	3	1.0
2.	300	17	5.66	300	12	4.0
3.	300	22	7.33	300	6	2.0
4.	300	8	2.66	300	6	2.0
5.	300	20	6.66	300	6	2.0
6.	300	5	1.66	300	9	3.0
7.	205	7	3.41	300	4	1.33
8.	300	19	6.33	300	6	2.0
9.	300	2	0.66	300	4	1.33
10.	300	14	4.66	300	5	1.66
4.23 MCN/100 TETRADAS				2.03 MCN/100 TETRADAS		

TABLA NO. IX

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL SISTEMA DE TRADESCANTIA CLONE
4430 CON EL GRUPO CONTROL NEGATIVO

	No. de Células	MCN	%
1.	300	7	2.33
2.	300	7	2.33
3.	300	6	2.0
4.	300	52	17.33
5.	300	14	4.66
6.	300	4	1.33
7.	300	11	3.66
8.	300	11	3.66
9.	300	3	1.0
10.	200	6	3.0

4.17 MCN/100 TETRADAS

TABLA NO. X

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL SISTEMA DE TRADESCANTIA CLONE # 4430 CON EL TRATAMIENTO DE METRONIDAZOL EN DOSIS DE 0.05, 0.1, 0.2, Y 0.5 MG / 100 ML. 3A REPETICION

METRONIDAZOL 0.05				METRONIDAZOL 0.1		
mg/100 ml				mg/ 100 ml		
No. de Células	MCN	%		No. de Células	MCN	%
1.	300	4	1.33	300		41.33
2.	300	3	1.0	150	0	0.0
3.	300	3	1.0	300	3	1.0
4.	100	0	0.0	300	12	4.0
5.	276	38	12.66	300	4	1.33
6.	300	6	2.0	200	6	3.0
7.	235	17	7.24	100	7	7.0
8.	300	4	1.33	300	10	3.33
9.	300	3	1.0	300	4	1.33
10.	300	2	0.66	300	8	2.66
2.95 MCN/100 TETRADAS				2.12 MCN/100 TETRADAS		

METRONIDAZOL 0.2				METRONIDAZOL 0.5		
mg / 100 ml				mg/100 ml		
No. de Células	MCN	%		No. de Células	MCN	%
1.	300	6	2.0	300	7	2.33
2.	100	5	5.0	300	4	1.33
3.	100	8	8.0	200	4	2.0
4.	100	6	6.0	100	6	6.0
5.	100	8	8.0	100	2	2.0
6.	300	14	4.66	100	0	0.0
7.	300	8	2.66	300	17	5.66
8.	300	8	2.66	300	5	1.66
3.94 MCN/100 TETRADAS				2.65 MCN/100 TETRADAS		

TABLA NO. XI

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL SISTEMA DE TRADESCANTIA CLONE
4430 GRUPO CONTROL NEGATIVO (3A REPETICION)

	No. de Células	MCN	%
1.	300	13	4.33
2.	300	6	2.0
3.	200	15	7.5
4.	300	4	1.33
5.	56	0	0.0
6.	300	14	4.66
7.	170	0	0.0
8.	300	6	2.0

3.01 MCN/100 TETRADAS

TABLA NO. XII

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE LOS TRATAMIENTOS CON
RESPECTO AL CONTROL NEGATIVO $t_{0.05} = 1.71$

TRATAMIENTO EN MG/100 ML	Sd	t	Significancia.
0.05	0.1961	0.5946	NS
0.1	0.1841	1.3748	NS
0.2	0.2109	0.0948	NS
0.5	0.1830	1.5765	NS

NS = No significativa

* = Significativa

TABLA NO. XIII

Σ DIFERENCIA MEDIA DE DUNNET PARA UN CONTROL NEGATIVO Y
TRATAMIENTOS CON METRONIDAZOL

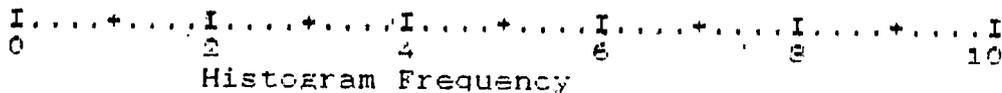
TRATAMIENTO EN MG/100 ML DE METRONIDAZOL.	$X_t - X_c$	DMD = 2.58
0.05	0.1791	NS
0.1	1.72	NS
0.2	9.477	*
0.5	0.2728	NS

NS = No significativa.

* = Significativa.

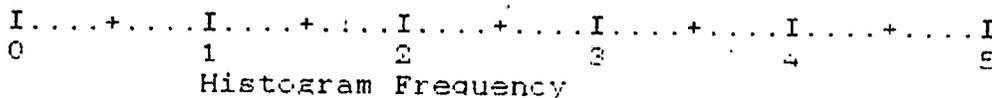
Count	% de mon	Midpoint
1		.10
1		.35
1		.60
0		.85
3		1.10
3		1.35
3		1.60
0		1.85
6		2.10
1		2.35
1		2.60
0		2.85
0		3.10
2		3.35
3		3.60
0		3.85
0		4.10
0		4.35
1		4.60
0		4.85
0		5.10
0		5.35
0		5.60
0		5.85
1		6.10
0		6.35
0		6.60
0		6.85
0		7.10
1		7.35
0		7.60
0		7.85
0		8.10
0		8.35
0		8.60
0		8.85
1		9.10
0		9.35
0		9.60
0		9.85
0		10.10
0		10.35
0		10.60
0		10.85
0		11.10
0		11.35
0		11.60
0		11.85
0		12.10
0		12.35
1		12.60

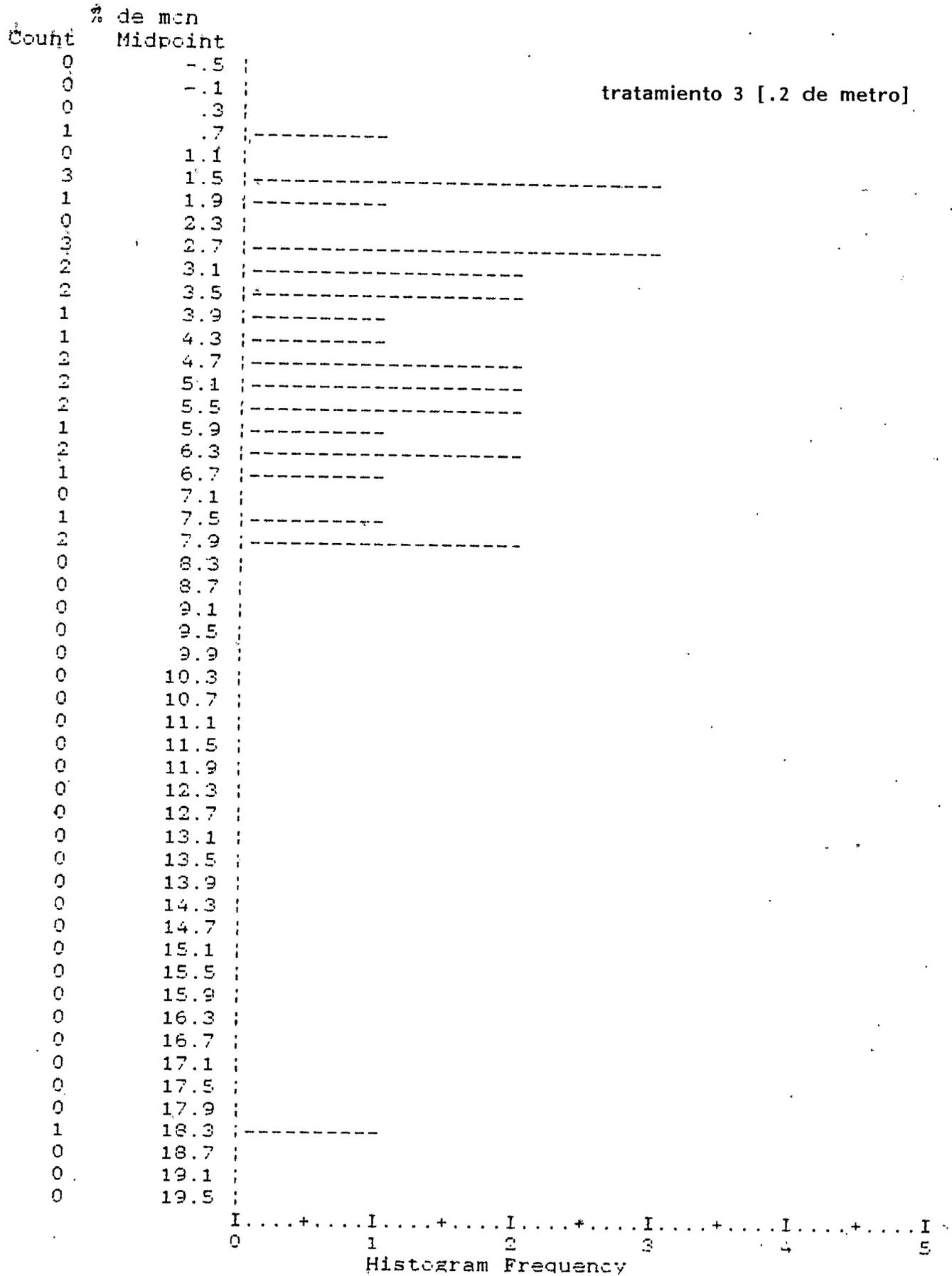
TRATAMIENTO 1 [.05 metro]



N	% de mcu	Midpoint
0		-.3
0		-.1
1		.1
0		.3
0		.5
1		.7
0		.9
1		1.1
4		1.3
0		1.5
2		1.7
0		1.9
0		2.1
2		2.3
0		2.5
2		2.7
0		2.9
3		3.1
2		3.3
0		3.5
2		3.7
0		3.9
2		4.1
1		4.3
0		4.5
2		4.7
0		4.9
2		5.1
1		5.3
0		5.5
0		5.7
0		5.9
0		6.1
0		6.3
0		6.5
0		6.7
0		6.9
1		7.1
0		7.3
0		7.5
0		7.7
0		7.9
0		8.1
0		8.3
0		8.5
0		8.7
0		8.9
0		9.1
1		9.3
0		9.5
0		9.7

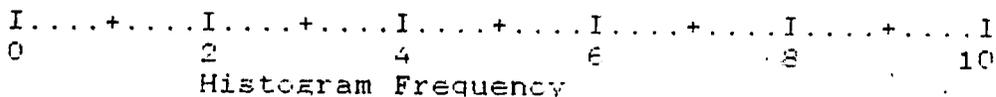
tratamiento 2 [.1 de metro]





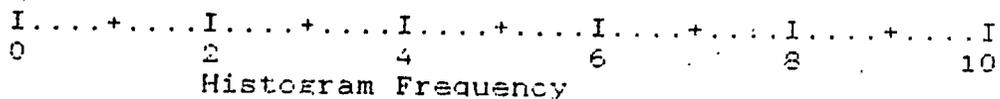
Count	% de mën	Midpoint
0		.60
0		.45
0		.30
0		.15
1		.00
0		.15
0		.30
0		.45
0		.60
0		.75
0		.90
1		1.05
0		1.20
4		1.35
0		1.50
3		1.65
0		1.80
6		1.95
0		2.10
0		2.25
1		2.40
0		2.55
0		2.70
0		2.85
3		3.00
0		3.15
1		3.30
0		3.45
1		3.60
0		3.75
0		3.90
1		4.05
0		4.20
0		4.35
0		4.50
1		4.65
0		4.80
1		4.95
0		5.10
0		5.25
0		5.40
0		5.55
1		5.70
0		5.85
2		6.00
0		6.15
1		6.30
0		6.45
0		6.60
0		6.75
0		6.90

tratamiento 4 [.5 de metro]

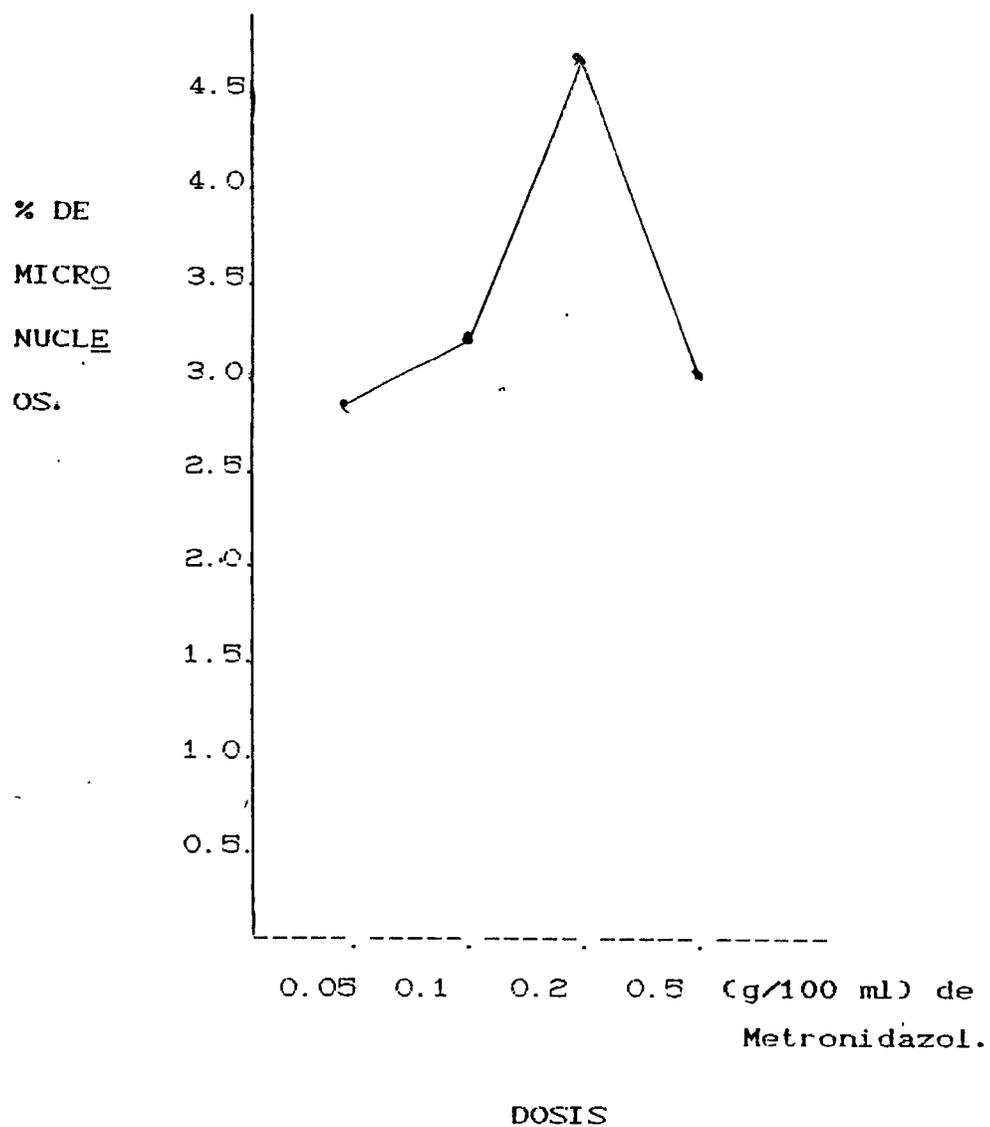


Count	% de men	Midpoint
0		-1.3
0		-.9
0		-.5
2		-.1
0		.3
1		.7
2		1.1
5		1.5
5		1.9
2		2.3
0		2.7
2		3.1
2		3.5
0		3.9
1		4.3
2		4.7
0		5.1
0		5.5
0		5.9
0		6.3
0		6.7
0		7.1
1		7.5
0		7.9
0		8.3
0		8.7
0		9.1
0		9.5
0		9.9
0		10.3
0		10.7
0		11.1
0		11.5
0		11.9
0		12.3
0		12.7
0		13.1
0		13.5
0		13.9
0		14.3
0		14.7
0		15.1
0		15.5
0		15.9
0		16.3
0		16.7
0		17.1
1		17.5
0		17.9
0		18.3
0		18.7

control



CURVA DOSIS RESPUESTA DEL METRONIDAZOL



GRAFICA NO. 12

DISCUSION

Al realizar el análisis estadístico de los datos, se observó igualdad de medias poblacionales entre el grupo de tratamiento y el de control, lo cual puede atribuirse a:

1. Que los daños ocurridos en el material genético por efecto del fármaco podrían manifestar posteriores al al nacimiento o en generaciones subsiguientes.
2. Que la cantidad de fármaco administrado pudo haber sido insuficiente para causar daño a los ratones.
3. Un solo tratamiento puede no hacer manifiesto el daño.

Por otra parte, es posible que exista una alteración fisiológica (como por ejemplo un daño al sistema nervioso central, o musculo-esquelético), que no es posible detectar, dada la temprana edad de los productos y, al poco tiempo de supervivencia que presentan. Para determinar este tipo de daños, se sugiere, que los productos completen su período gestacional, y sean observados y estudiados con pruebas específicas. Es posible obtener una gran cantidad de información de estos datos.

Lo más relevante en el estudio de la actividad teratógena del metronidazol, es que se encontraron malformaciones en fetos cuyas madres estuvieron recibiendo tratamiento con metronidazol, mientras que en el grupo control, éste no se presentó. Cabe destacar que según Bowan W.C., (70), la teratogénesis solo la

70. Bowman W.C.; FARMACOLOGIA. BASES BIOQUIMICAS Y PATOLOGICAS, 6a. Ed., Interamericana, México, 1984, 20: 43.

manifiesta el producto cuando se administra el fármaco en dosis superiores al umbral para el efecto, pero inferior a la dosis mortal para la madre, y en este caso el tratamiento administrado fué el equivalente a la dosis terapéutica, en humanos. Esto indica que es muy probable que al aumentar la dosis del medicamento, la respuesta sea, y con mucho, mayor a la obtenida, determinándose previamente la dosis letal media de la población.

Del presente estudio, pueden surgir trabajos posteriores, en donde se observe el efecto del fármaco por su aplicación en diferentes estados de vida del ratón, para determinar si existe la capacidad de daño a nivel de generaciones subsiguientes.

Con respecto a la actividad mutagénica del metronidazol, con el Sistema de Tradescantia Clone # 4430, la curva dosis-respuesta no presenta la linealidad esperada. Esto fué debido a que al aplicarse el tratamiento con 0.5 mg/100 ml, de metronidazol, se presenta falta de tinción de las células meióticas (citotoxicidad), lo cual pudiera explicar que el índice de micronúcleos fuera menor. La citotoxicidad puede orientar a que éste sistema no es el adecuado para determinar la mutagenicidad del metronidazol, dado que es posible que se interfiriera en algún proceso de formación de pared celular lo que imposibilite la tinción celular, por lo que se recomienda otro sistema para determinar la actividad mutagénica del metronidazol.

Para posteriores estudios, sería más adecuado comenzar primeramente determinando la actividad mutagénica del medicamento, con sistemas que ya se haya determinado, sean los adecuados para ello.

Las ventajas que presenta el trabajo realizado, es que se puede obtener una información rápida, dado que el ciclo vital de los seres vivos utilizados es muy corto, además del relativo bajo costo que tiene el mantenimiento de estas especies.

CONCLUSIONES

De los objetivos planteados en el inicio del trabajo, se desprende lo siguiente:

1. Al administrar la dosis terapéutica de metronidazol, durante el período de gestación aumenta la cantidad de malformaciones congénitas en los ratones hembra de la cepa CD-1.

No se puede asegurar que el mismo efecto se presente en los seres humanos, dado la diferencia de especies, pero es recomendable un estudio profundo de los hijos de madres que durante el inicio de la gestación tomaron Metronidazol por diferentes causas.

2. La cantidad de puntos hemorrágicos y reabsorciones no se ve incrementada de manera significativa, al aplicar la misma dosis, durante este período. Esto orienta a que la cantidad de abortos no se ve incrementada por su administración de manera significativa, en un primer tratamiento. Con esto, no se puede descartar la idea de un posible daño con tratamientos repetitivos de Metronidazol antes y después de la gestación.

3. El metronidazol no presenta una respuesta progresiva con la dosis con el sistema de Tradescantia Clone # 4430, y con la dosis sérica terapéutica no hay incremento significativo de micronúcleos. Para poder afirmar que el metronidazol es mutágeno sería necesario que existiera una dosis que superara el 5% de incidencia de micronúcleos, pero al aumentar la dosis existe citotoxicidad de las células meióticas de Tradescantia por lo cual, con éste sistema no es posible determinar la capacidad mutágena del Metronidazol.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Alpers B. J.: LO ESENCIAL DE LA EXPLORACION NEUROLOGICA, 1a. Ed., El Manual Moderno, México, 1975, 2:39.
2. Benson R. MANUAL DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA, 7a. Ed., Manual Moderno, México, 1985, 11:258.
3. Bevan A. J." FUNDAMENTOS DE FARMACOLOGIA, 2a. Ed., Harla, México 1982, pp. 661.
4. Bowman W.C.: FARMACOLOGIA, BASES BIOQUIMICAS Y PATOLOGICAS, 6a. Ed., Interamericana, México 1984, 6:11.
5. Coleman L.D., Dagg P. Ch., Kaliss N., Russel E., Fuller L. J.: BIOLOGY OF THE LABORATORY MOUSE, 2a. Ed., Dover Publications Inc., New York, 1975, 11: 187-200.
6. De la Torre V.R.: Mortalidad Perinatal, MEMORIAS DEL CONCYTEC, México, 1987, 20:239.
7. Gardner J. E.: PRINCIPIOS DE GENETICA, 5a. Ed., Limusa, México 1982, 8: 307-309.
8. Goldman P.: Metronidazole: Proven benefits and a potential risk, MEDICAL JOURNAL, Jul. 1980, 147(1), pp. 1-9.
9. Guizar V.J.: GENETICA CLINICA, 1a. Ed., Manual Moderno, México, 1988, 3:35.

10. Guzman T.R.: MEDIO AMBIENTE Y DEFECTOS CONGENITOS, 1a. Ed., Trillas, México 1986, 2:43.
11. Jiménez Y. I.: Comparación de la actividad genotóxica de ciclofosfamida y niclosamida en médula ósea de ratón, TESIS PROFESIONAL, Universidad Autónoma de México, México 1982.
12. Kumate J.: ANTIBIOTICOS Y QUIMIOTERAPEUTICOS, 2a. Ed., Méndez Cervantes, México 1981, pp. 327.
13. Langman J.: EMBRIOLOGIA MEDICA, 4a. Ed., Panamericana, México 1981, 8:107.
14. Ma T. H.: Prueba de micronúcleos de Tradescantia (MCN-TRAD) para clastógenos ambientales, PRUEBAS DE TOXICIDAD IN VITRO PARA AGENTES AMBIENTALES, Parte A.
15. Márquez M.C.: Acción del Diazepam sobre la osteogénesis de la tibia fetal del ratón., BOLETIN INFORMATIVO DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO, México, 1982.
16. Mascaró J. M.: DICCIONARIO TERMINOLOGICO DE CIENCIAS MEDICAS, 11a. Ed., Salvat, México 1982.
17. Mendenhall W.: INTRODUCCION A LA PROBABILIDAD Y ESTADISTICA, 1a. Ed., Wadsworth Inc., 1982, 13:442.
18. Molavi A.: CLINICAS MEDICAS DE NORTEAMERICA, México 1982, 3:121.

19. Moore K.L.: EMBRIOLOGIA CLINICA, 3a. Ed., Interamericana, México 1985, 8:149.
20. Müller M.; Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa, SUGERY, Nueva York, 1983, pp. 168.
21. Nuñez M.E.: GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA , 7a. Ed., Manual Moderno, México, 1987, 20:239.
22. Patten B. M.: EMBRIOLOGIA HUMANA, 5a. Ed., Interamericana, México, 1969, 9:186.
23. Riós C. R.: Mortalidad perinatal en el hospital general de Querétaro, MEMORIAS DEL CONCYTECO, Querétaro 1989, pp. 26.
24. Roe F.J: Evaluación toxicológica del metronidazol con referencia particular a su potencial carcinogénico, mutagénico y teratogénico, SUGERY, 93 (1, parte 2): 158-164, 1983.
25. Rosenstein E.: DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS 36a., PLM, México 1990, pp. 396.
26. Stewart T. E.: OBSTETRICIA DE BECK, 10a. Ed., Interamericana, México 1981, 24: 344-346.
27. Urrusti S.J.; El microambiente como condicionador de defectos al nacimiento, GEN, México, 1983, pp. 69

28. Varios autores, ANIMALES DE LABORATORIO, Instituto Mexicano del Seguro Social, Facultad de Veterinaria y Zootecnia, México 1986, UNAM.

29. Voogd, C.E.; On the mutation of the nitroimidazole, MUTATION RESEARCH, Mayo 1981, 86 (3), pp. 243-277.

30. Walpole E. R.: PROBABILIDAD Y ESTADÍSTICA PARA INGENIEROS, 2a. Ed., Interamericana, México, 1986, pp. 66.