

# Efecto genotóxico de la glibenclamida, metformina y terapia combinada en línea celular de ovario de hámster

Genotoxic effect of glibenclamide, metformin and combined therapy on chinese hamster's ovary cell lineage

Jair Morales-Alvarado<sup>1</sup>, Miguel Murga-Valdez<sup>1</sup>, Joan Moreno-Luján<sup>1</sup>, Eloy López-Deza<sup>1</sup>, José Gutiérrez-Bustamante<sup>2</sup>, Víctor Sánchez-Reyna<sup>3</sup>.

Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, Sociedad Científica Médico Estudiantil Peruana. Trujillo, Perú.

<sup>1</sup> Estudiante de Medicina Humana, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

<sup>2</sup> Departamento de Morfología Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

<sup>3</sup> Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

## RESUMEN

**Objetivo:** evaluar el efecto genotóxico de los antidiabéticos orales mediante la prueba de intercambio de cromátides hermanas y la prueba de micronúcleos. **Diseño:** estudio experimental. **Lugar:** Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú. **Participantes:** material celular de la línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1) *Cricetulus griseus* y tabletas de glibenclamida y metformina. **Intervención:** se empleó las células agrupadas y tratadas con glibenclamida 5mg, metformina 850mg, glibenclamida + metformina 5/850mg y el grupo control. Los resultados se valoraron en base a la prueba de evaluación genotóxica. **Principales medidas de Resultados:** pruebas chi cuadrado, ANOVA y Test Duncan. **Resultados:** se observó un incremento significativo de intercambio de cromátides hermanas ( $p < 0,05$ ) sólo en el grupo de la terapia combinada ( $8,03 \pm 0,17$ ); además se observó un incremento significativo de micronúcleos en el grupo de la terapia combinada ( $14,44 \pm 0,93$ ), glibenclamida sola ( $10,18 \pm 0,93$ ) y metformina sola ( $7,10 \pm 1,04$ ) con respecto al grupo control (sin tratamiento) ( $3,93 \pm 0,46$ ). **Conclusiones:** la glibenclamida más metformina produce efecto genotóxico evidenciado por medio de las pruebas intercambio de cromátides hermanas y de micronúcleos.

**Palabras clave:** genotoxicidad, glibenclamida, metformina, línea celular, intercambio de cromátides hermanas, prueba de micronúcleos.

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the genotoxic effect of oral antidiabetics by using Chromatid Exchange sister Test and the Micronucleus Test. **Design:** Experimental study. **Setting:** Genetic's Laboratory of Univesidad Nacional de Trujillo. **Subjects:** Cellular material of the cellular line of ovary of chinese hamster (CHO-K1) *Cricetulus griseus* and pills of glibenclamide and metformine. **Interventions:** We grouped and threated cells with Glibenclamide 5mg, metformine 850mg,

Glibenclamide 5mg + Metformine 850mg and group control. The results were evaluated with the Genotoxic Evaluation Test. Main outcome measures: Chi Square Test, ANOVA and Duncan Test. **Results:** We observed a significance increase of Chromatid Exchange Sister ( $p < 0,05$ ) only in the group of combined therapy ( $8.03 \pm 0.17$ ), además we observed a significant increase of Micronucleos in the group of combined therapy ( $14.44 + 0,93$ ), glibenclamide alone ( $10,18 + 0,93$ ) and metformine alone ( $7.10 + 1.04$ ) with respect to the group control (without treatment)

(3,93 + 0,46). Conclusion: The use of Glibenclamide plus metformine produces genotoxic effect evaluated by the use of Chromatid Exchange Sister and Micronucleus Test.

Keywords: Genotoxicity, glibenclamide, metformin, cell lineage, chromatid sister Exchange test, Micronúcleos test

### INTRODUCCION

La diabetes es actualmente uno de los trastornos metabólicos más prevalentes a nivel mundial<sup>(1)</sup>, con tratamiento farmacológico variado que incluye a las sulfonilureas y biguanidas<sup>(2,3,4)</sup>. Como tal, la diabetes tipo 2 establece una relación de desarrollo potencial de cáncer, poco se conoce acerca del papel de las terapias antidiabéticas en esta relación<sup>(5,6,7)</sup>. Diversos estudios experimentales en animales y reportes de casos en humanos, demuestran la función crítica de la insulina como factor de crecimiento en todos los estadios del crecimiento en mamíferos; sugiriendo que la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina pueden promover la carcinogénesis<sup>(5,8,9)</sup>.

Aunque no existe evidencia de carcinogenicidad en el tratamiento con metformina en ratas y ratones machos, hubo una incidencia incrementada de pólipos uterinos estromales benigno en ratas hembras. Además los resultados realizadas *in vivo* con pruebas de micronúcleos en ratones también fueron negativos<sup>(10)</sup>. No obstante, aún no se ha 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<sup>(5)</sup>, al estimular la secreción de insulina.

Actualmente se utiliza 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<sup>(11)</sup>, es uno de los biomonitores de mayor difusión en el estudio de daño genético en los cromosomas. Como material de laboratorio es de fácil manejo, puede ser cultivada de diferentes formas y su mantenimiento es relativamente económico<sup>(12-13)</sup>.

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<sup>(14)</sup>.

En este biomonitor se puede aplicar la prueba de micronúcleos (MN), que son pequeños cuerpos citoplasmáticos de origen nuclear, éstos 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<sup>(13)</sup>.

Asimismo la prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) también es utilizada para demostrar efectos mutagénicos, identificando los intercambios recíprocos entre cromátides de un mismo cromosoma. Estos se producen en loci homólogos, involucrando rompimiento y reunión durante la replicación del ADN. 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<sup>(14-16)</sup>.

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 ADN es defectuoso, y por lo tanto, presentan un alto riesgo de desarrollar tumores malignos como el cáncer de piel<sup>(17)</sup>.

Teniendo en cuenta que existen estudios epidemiológicos que relacionan el cáncer y la diabetes mellitus, el presente estudio tiene por finalidad determinar la presencia 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 la prueba de micronúcleos.

### MATERIAL Y MÉTODO

El presente trabajo es un estudio experimental realizado en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

La unidad de investigación fueron las células que se obtuvieron de los cultivos celulares de la línea celular de

ovario de hámster chino (CHO-K1) *Cricetulus griseus*, provenientes del Banco Argentino de Células. El material farmacológico empleado fueron tabletas de glibenclamida (5 mg) y metformina (850 mg).

Las células fueron cultivadas en Ham's F10 suplementado con 2 % estreptomina-penicilina, 0,5 % L-glutamina y 10 % suero bovino fetal (PBS) 20 ml; y tratadas según el método utilizado por Degraasi (1988)<sup>(16)</sup> como se señala en la Tabla 1.

Las células de la línea CHO-K1 se trataron durante tres días en los intervalos de tiempo y dosis indicados en la Tabla 1, después de los cuales se realizaron los preparados citológicos utilizando la técnica del frotis para la prueba de micronúcleos y del goteo de suspensiones celulares para el intercambio de cromátides hermanas.

Para evaluar la genotoxicidad se utilizó la prueba de micronúcleos Hogstedt, (1984) y la prueba de intercambio de cromátides propuesta por Salamanca, (1990) que consisten en:

**Prueba de micronúcleos de Hogstedt:** se realiza la fijación inmediatamente después de hacer el frotis, sumergiendo los preparados citológicos en una batería de coloración que contenía el fijador (alcohol éter). Las láminas después de ser fijadas, se dejaron secar y luego se sumergieron en HCl 1N a 60 grados en baño María durante diez minutos, al cabo de los cuales se enjuagó con agua potable y se puso a secar en una estufa a 37 °C. Para la coloración de las láminas, estas se sumergieron en un recipiente con reactivo de Schiff por 60 minutos en oscuridad. Cumplido el tiempo de coloración, las lavamos durante dos minutos con agua sulfurosa por dos veces consecutivas y luego con agua destilada. Se observó las láminas al microscopio a un aumento de 100X, identificando los micronúcleos usando la siguiente definición: localización dentro del citoplasma, con contorno liso, no refractario, teñido con la misma intensidad que el núcleo principal, y más pequeño que el núcleo.

**Prueba de intercambio de cromátides hermanas (ICH):** A las 24h de la siembra del cultivo celular, se adicionó bromodeoxiuridina (BrdU) a una concentración final de

20µg/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 µg/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 una a dos horas. Se lavó con agua potable y se dejó por 24h luego se colocó en Giemsa a pH 6,8 durante diez a diez minutos. Se observó y luego se determinó las frecuencias de intercambios de cromátides hermanas en diez placas metafásicas por tratamiento. Los ICH fueron cuantificados en diez metafases en segunda división celular por un solo observador. Todas las observaciones que evidenciaron daño se fotografiaron.

Finalmente, se creó una base de datos en STATGRAPH v 11, determinando la exactitud y la validez de la muestra con las pruebas chi cuadrado con doble entrada y la prueba de ajuste y distribución binomial respectivamente, además se emplearon las pruebas no paramétricas como la prueba de Comparación múltiple (ANOVA) y el Test Duncan ( $p < 0,05$ )<sup>(17)</sup> para determinar el grado de significancia de los tratamientos.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos a través de la prueba de ICH, como son las frecuencias de ICH por metafase obtenidas en las células de ovario de hámster chino tratadas con glibenclamida, metformina y terapia combinada se aprecian en la Tabla 2. Se observó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en el tratamiento de la terapia combinada ( $8,03 \pm 0,17$ ) en comparación con el grupo control, no así en la terapia única con la glibenclamida ( $7,29 \pm 0,52$ ) ni con metformina ( $6,91 \pm 0,19$ ;  $6,94 \pm 0,45$ ).

En la prueba de MN los valores promedios de cambios en micronúcleos se describen 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 ( $14,44 \pm 0,93$ ), sólo glibenclamida ( $10,18 \pm$

**Tabla 1. Tratamiento administrado por grupo de experimentación de acuerdo con el tiempo de exposición**

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

0,93) o metformina únicamente ( $7,10 \pm 1,04$ ) en comparación con el grupo control ( $3,43 \pm 0,46$ ).

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten demostrar 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, nuestros resultados apoyan la hipótesis que la inestabilidad cromosómica puede estar asociada con la progresión de células anormales<sup>(17,18)</sup>. Altos niveles de ICH han sido reportados sugiriendo que las células malignas pueden producir factores "solubles" que incrementen la inestabilidad de los cromosomas<sup>(18)</sup>, nuestros resultados mostraron un incremento gradual de ICH (Tabla 2). Estos datos se corroboran con el estudio por Yokata *et al*, que informan un incremento de ICH de acuerdo al desarrollo neoplásico; sin embargo, existe discrepancias con otros estudios, además de la alta variabilidad de la prueba indican que este parámetro citogenético no es útil como marcador preclínico<sup>(18)</sup>.

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

**Tabla 2. Número promedio de ICH y MN en células de la línea celular de ovario de hámster chino *Cricetulus griseus* de acuerdo con la terapia (N.º de células estudiadas = 10)**

Tratamientos	ICH*	MN*
Glibenclamida	$7,29 \pm 0,52$	$10,18 \pm 0,93^{**}$
Metformina	$6,94 \pm 0,45$	$7,10 \pm 1,04^{**}$
Terapia combinada	$8,03 \pm 0,17^{**}$	$14,44 \pm 0,93^{**}$
Control	$6,91 \pm 0,19$	$3,93 \pm 0,46$

\* Se expresan como media y desviación estándar, \*\* Diferente al control,  $p < 0,05$

debido a la inestabilidad cromosómica de estas células anormales<sup>(18)</sup>. 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 en las células. 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<sup>(19)</sup> (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 en el 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 en las células<sup>(20)</sup>. Además, los resultados obtenidos por Martínez *et al* confirman el daño en el ADN mediante el uso de MN en todos aquellos pacientes con diabetes tipo 2, que llevaban algún tratamiento farmacológico (principalmente el grupo con Insulina más metformina)<sup>(21)</sup>.

Concluimos afirmando que existe un efecto genotóxico producido por la terapia con glibenclamida y metformina, individual o combinada, en la línea celular ovario de hámster chino *Cricetulus griseus*, comprobada mediante las pruebas descritas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Powers AC, Diabetes Mellitus. En: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson LJ, editores. Harrison Principios de Medicina Interna. 15ª ed. Madrid: McGraw-Hill; 2001. p.2467-500.

2. Cabezas-Cerrato J, Cabezas Agrícola J. Tratamiento no farmacológico y farmacológico de la diabetes mellitus. *Medicine*. 2004; 9(16): 1000-07.
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; 131(4):281-303.
5. Bowker S, Majumdar S, Veugelers P, Johnson J. Increased Cancer-Related Mortality for Patients With Type 2 Diabetes Who Use Sulfonylureas or Insulin. *Diabetes Care*. 2006; 29:254-8.
6. Coughlin S, Calle E, Teras L, Petrelli J, Thun M. Diabetes Mellitus as a Predictor of Cancer Mortality in a Large Cohort of US Adults. *Rev Am J Epidemiol*. 2004; 159(12):1160-7.
7. Adami H, McLaughlin J, Ekblom A, Berne C, Silverman D, Hacker D, et al. Cancer risk in patients with diabetes mellitus. *Cancer Causes and Control*. 1991; 2(5): 307-14.
8. Rosenfeld R. Insulin-like growth factors and the basis of growth. *N Engl J Med*. 2003; 349(23):2184-6.
9. Schneider M, Matsuzaki H, Haorah J, Ulrich A, Standop J, Ding X, et al. Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. *Gastroenterology*. 2001; 120(5): 1263-70.
10. Kao F, Puck T. Genetics of somatic mammalian cells VII. *Proc Natl Acad Sci*. 1968;60:1275-81.
11. Sánchez-Lamar A. Utilización de la línea celular CHO en los ensayos de genotoxicidad. *Rev Cubana Invest Bioméd*. 1999;18(1):19-21.
12. Armstrong M, Bean C, Galloway M. A quantitative assesment of the citotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese Hamster ovary cells. *Mutat Res*. 1992;265: 45-60.
13. Gobierno de España [Página principal en Internet]. España: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales: AÑO [acceso 25 septiembre 2007]. De Lampurlanés XS, Hernandez MM. Control biológico de la exposición a genotóxicos: técnicas citogenéticas. Disponible en: [http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp\\_354.htm](http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_354.htm).
14. Rodríguez-Ferreiro G. Tinidazol: una droga antimicrobiana con actividad genotóxica. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2001;20(1): 54-8.
15. Steel R, Torrie J. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2ª ed. New York. Mc. Graw-Hill; 1980.
16. Karl-Heinz W, Juerb A, Zarembach B, Elmadfa I. Impact of antiseptics on radical metabolism, antioxidant status and genotoxic stress in blood cells: povidone-iodine versus octenidine dihydrochloride. *Toxicology In Vitro*. 2004;18(4): 411-18.
17. Spitz MR, Bond ML. Genetic susceptibility to cancer. *Cancer*. 1993;72: 991-995.
18. 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 [en línea]* 2000 Abril-Junio. [acceso 25 septiembre 2007]; 1(2). Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/i/2/articulos/cancer.html>.
19. Ramirez A; Henrique SP. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Rev Genet Mol Res*. 2002;1(3): 246-260.
20. Ibarra-Costilla E 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.
21. 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 [en línea]* 2004 Febrero [acceso 25 septiembre 2007];4. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-4-2004/41.htm#top>

Correspondencia:

Víctor Jair Morales Alvarado

Dirección: Calcuchimac H23 Urb. Santa María, Trujillo Perú.

Teléfono 044-294461

Correo\_e: jair\_k182@hotmail.com

Manuscrito recibido: 17 de octubre de 2007

Aceptado para publicarse: 14 de diciembre de 2007