

ALLIUM CEPA COMO BIOMONITOR DE TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE METRONIDAZOL

ALLIUM CEPA AS BIOMONITOR OF METRONIDAZOLE TOXICITY AND GENOTOXICITY

NANCY BEATRIZ ANDRIOLI*¹, ARTURO FEDERICO WULFF² Y MARTA DOLORES MUDRY¹

¹ Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE), Depto. de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón II, 4^{to} Piso Lab.: 46, (C1428EHA), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²Laboratorio de Genética. Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón II, 4^{to} Piso Lab.: 61 (C1428EHA), Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

*Autor para correspondencia: nandrioli@hotmail.com

RESUMEN

El metronidazol (MTZ) es un compuesto de uso frecuente como antiparasitario y bactericida. Los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* sobre la genotoxicidad del MTZ exhiben resultados contradictorios. Dado que hasta el momento, el MTZ no fue evaluado en modelos vegetales, se busca caracterizar el discutido efecto del MTZ al aplicar el test de *Allium cepa*, un modelo de sensibilidad demostrada para evaluar tanto toxicidad como genotoxicidad. El análisis fue realizado sobre el crecimiento de las raíces y sobre las células meristemáticas del ápice. Los resultados evidenciaron que la toxicidad manifiesta sobre el crecimiento de la raíz para las concentraciones 250 y 500 ug/ml no está asociada a la inhibición del del MTZ sobre las células meristemáticas no afectan significativamente el ciclo celular y que involucrarían otros mecanismos asociados al crecimiento de la raíz.

PALABRAS CLAVES: Aberraciones cromosómicas, *Allium cepa*, crecimiento de raíces, Índice mitótico, Metronidazol.

ABSTRACT

Metronidazole (MTZ) is frequently used as an antiparasitary and bactericide agent. However, genotoxic effects in different models *in vivo* and *in vitro* are contradictory. Since MTZ has not yet been evaluated in plant systems, the search is focused on describing the controversial effect MTZ produces when the *Allium cepa* test is applied a vegetal model which demonstrates sensitivity to genotoxic and toxic screening. The analysis was done on root growth and the meristematic cells apex. The results show that the toxicity manifested on the root growth for the 250 and 500 ug/ml is not associated to the inhibition of the mitotic index (IM). Neither the IM values nor the analysis of anaphases – telophases *Allium cepa* root which included both chromosome aberrations and disorganized anaphases did present significant differences for concentrations 10, 50 and 250 ug/ml under Student' T tests. These results indicate that the mechanism involved in the MTZ toxic effect on the meristematic cells do not affect significantly the cell cycle and that could involve other mechanisms associated with root growth.

KEYWORDS: *Allium cepa*, Chromosome aberrations, Metronidazole, Mitotic index, Root growth.

Recepción: 15/09/06. Revisión: 10/10/06. Aprobación: 30/11/06.

INTRODUCCIÓN

El Metronidazol (MTZ), 1-(hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazol, es un agente terapéutico utilizado en el tratamiento de infecciones tipo trichomoniasis, amebiasis y giardiasis, así como para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias anaerobias. Las parasitosis son frecuentes en los países tropicales y subdesarrollados, donde existe una población numerosa, susceptible y desfavorecida por las condiciones climáticas, económicas y sociales que facilitan la proliferación, persistencia y permanencia de las enfermedades parasitarias (Reyes Romero y Navarro Rojas, 1998). Los riesgos toxicológicos potenciales derivados de la utilización de las drogas indicadas para el tratamiento de estas afecciones, deben considerar su relación costo-beneficio, teniendo en cuenta que estas enfermedades infecciosas están directamente asociadas a los estilos de vida y a las condiciones de pobreza y marginalidad que favorecen su diseminación.

Los resultados obtenidos al analizar diferentes dosis y concentraciones de MTZ en modelos animales tanto *in vivo* como *in vitro* son controvertidos (Dobias *et al.*, 1994). Los modelos *in vitro* en algunos casos evidencian genotoxicidad, según diferentes parámetros que dan cuenta de alteraciones tanto en la cinética de la división celular como en la estabilidad cromosómica, en trabajos realizados en cultivos de células CHO (Mudry *et al.*, 1994), linfocitos de sangre periférica (López Nigro *et al.*, 2003; Carballo *et al.*, 2004, Gómez Arroyo *et al.*, 2004; Elizondo *et al.*, 1994; Menéndez *et al.*, 2002) y Electroforesis de células individuales o Ensayo de cometa (Rodríguez Ferreiro *et al.*, 2002). En otras publicaciones, se estableció una relación inversa entre concentración plasmática del MTZ y daño al ADN, atribuyendo este daño a un metabolito (Elizondo *et al.*, 1996; Menéndez *et al.*, 2001).

Por otra parte, entre los estudios en los que el MTZ arrojó resultados negativos, se encuentran ensayos con líneas celulares de mamíferos en los que el efecto genotóxico se registró sólo en condiciones de hipoxia (Korbelik y Horvarth, 1980) y ensayos de corto plazo (ECP) con linfocitos de sangre periférica (Hartley-Asp, 1979; Akiol *et al.*, 2000; Fahrig and Engelke, 1997).

En cuanto a los modelos *in vivo*, estudios recientes realizados en distintas cepas de ratón atribuyen a la acción del MTZ el aumento significativo de micronúcleos (el-Nahas A.E. and el-Ashmawy I.M., 2004). Estudios previos atribuyen efectos genotóxicos al MTZ, si bien, en algunos casos, el mismo está condicionado a algún estadio del desarrollo. En *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*, la mutagenicidad se evidenció sólo en células vegetativas (Ong and Slade, 1978; Ong *et al.*, 1979; Mhon *et al.*, 1970). El ensayo del letal recesivo en *Drosophila melanogaster* no mostró efecto genotóxico (Kramers, 1982), sin embargo se encontraron efectos teratogénicos para el mismo modelo (Palermo *et al.*, 2004).

La actividad genotóxica del MTZ en los ensayos *in vitro* se vinculan a la vía reductiva de metabolización a través de dos mecanismos posibles. Uno es la formación de una hidroxilamina de corta vida y posteriormente una amina primaria (Muller, 1981). La hidroxilamina reacciona uniéndose covalentemente al ADN provocando la pérdida de la estructura helicoidal, ruptura de cadena y desacoplamiento de la doble hélice (Edwards, 1986; Kedderis and Miwa, 1988). Mientras que el otro se da por la formación de radicales libres cuando el ingreso del MTZ a la célula anaeróbica es seguida de la activación biorreductiva del mismo y formación de un nitro anión debido al gradiente de electrones que se genera a través de componentes con suficiente potencial redox negativo como para transferirlos. Los radicales tóxicos pro-

vocan daños en el ADN, así como en otros componentes celulares (Raheter and Hanel, 2003).

El objetivo de este trabajo es analizar el efecto del MTZ al aplicar el test de *Allium cepa*, ya que estudios previos indican que es un biomonitor adecuado tanto para el análisis de toxicidad como de genotoxicidad (Fiskesjo, 1985). Su aplicación en el análisis genotóxico de compuestos químicos y mezclas complejas es ampliamente utilizado desde su implementación desarrollada por Levan en 1938. Numerosos trabajos han sido incluidos en la base de datos del Centro de Información sobre Mutágenos Ambientales, registros obtenidos con distintas técnicas en *Allium cepa* demostraron una confiabilidad de un 80% en un estudio en el que se compararon los resultados del test de *Allium cepa* con otros sistemas de prueba en la evaluación de varios compuestos (Grant, 1982). En este contexto y dado que el MTZ aún no ha sido evaluado con ensayos que utilizan plantas como modelo, consideramos de interés estudiar los aspectos toxicológicos del MTZ en relación con el modelo utilizado.

Los análisis realizados en este ensayo incluyen: crecimiento relativo de la raíz, alteraciones de anafases-telofases y aberraciones cromosómicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bulbos de *Allium cepa*, variedad Valcatorce fueron suministrados por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Tabletas conteniendo 500 mg de metronidazol (MTZ), CAS N° 443-48-1 de Lab. Phrone-Poulenc Rorer, fueron disueltas en 20 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), CAS N° 67-68-5 Lab Backer y la solución fue diluida con agua comercial hasta alcanzar las siguientes concentraciones de MTZ: 10, 50, 250 y 500 mg/ml. El agua con la que se rea-

lizó la dilución fue el control negativo. Como control negativo para el solvente se utilizó DMSO 1%.

Toxicidad

Para cada tratamiento, se colocaron 4 bulbos de tamaño uniforme (3 cm de diámetro) en cubetas de vidrio de 2,5 cm de ancho, 14 de largo y 10 de alto. Antes de utilizarlos se les extrajeron las catáfilas exteriores y el disco inferior fue limpiado de raicillas sin destruir los primordios que serían expuestos a las soluciones de MTZ a testear. Se sumergieron los bulbos hasta su cuarta parte en agua durante 24 horas y aquellos en los que se observó un crecimiento de las raíces menor a 2 cm fueron descartados. Para determinar las concentraciones adecuadas para el test de genotoxicidad se analizó el crecimiento de la raíz durante 72 h, se midieron entre 20 y 30 raíces de cada una de las concentraciones y se obtuvo el promedio de longitudes que fue utilizado para el cálculo de los porcentajes de crecimiento de las raíces expuestas a MTZ respecto a los respectivos controles. Con estos valores se construyó una curva dosis respuesta. Se descartaron las concentraciones mayores a EC 50 para el análisis de genotoxicidad (Fiskesjo, 1985).

Genotoxicidad

Una vez finalizada las 48 h de exposición de las raíces a cada solución, se cortaron y se fijaron juntas en etanol-acético 3:1.

Para el test de genotoxicidad las raíces se fijaron luego de 48 h de exposición para las concentraciones de MTZ 0,10, 50 y 250 mg/ml y DMSO 1% y fueron almacenadas en etanol 70%.

Las condiciones se mantuvieron constan-

tes durante todo el ensayo, la temperatura fue de 22 °C, la aireación constante y los bulbos se mantuvieron en estufa de cultivo protegidos de la luz y de las corrientes de aire.

Se realizaron 3 preparados para cada concentración. En cada uno se colocaron los meristemas de 2 raíces, se ubicaron las mismas en un portaobjeto con una gota del Orceína aceto-clorhídrica de acuerdo al método de Tjio y Levan (1950). (Orceína: CAS N° 1400-62-0 de Biopack) se observaron 500 células por preparado con 1000 X en microscopio óptico (Leica DMLB). y se disgregaron mediante el uso de agujas de disección. Finalmente se aplicó la técnica de “squash”. Los preparados se realizaron en forma temporaria, de modo que fueron sellados con esmalte.

Evaluación

Los parámetros usados fueron:

1. Crecimiento de las raíces: longitud de las raíces luego de 72 horas de exposición.

2. Índice Mitótico (IM) como n° de células en división cada mil células observadas.
3. Análisis de anafases/telofases; se registraron las siguientes figuras: fragmentos acéntricos, puentes, y cromosomas errantes o rezagados y anafases desorganizados.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como medias \pm SD. Los datos fueron analizados con el Student t-test, a través del programa Statistica.

RESULTADOS

Los valores obtenidos para los parámetros analizados en las raíces de *Allium cepa* expuestas a distintas concentraciones de MTZ se muestran en la Tabla I.

Las longitudes para las concentraciones 250 ug/ml y 500ug/ml fueron significativamente menores respecto a los controles DMSO y MTZ 0 ($p < 0.05$).

La concentración 500 ug/ml no fue utilizada para el análisis de genotoxicidad por

TABLA I. Valores correspondientes a las longitudes de crecimiento, IM y anafases-telofases anormales de las raíces de *Allium cepa* para 72 hs. de exposición a diferentes concentraciones de MTZ y controles.

MTZ (ug/ml)	Longitud de raíces \pm DS (cm)	% de crecimiento relativo al control	Índice mitótico \pm SD (%)	% de anafases -telofases anormales \pm DS	Total de células observadas
0	8.11 \pm 1.19	100	7.47 \pm 2.64	0.24 \pm 0.15	9000
DMSO 1%	8.49 \pm 1.11	105	6.30 \pm 1.92	0.30 \pm 0.08	9000
10	7.71 \pm 0.67	95	6.09 \pm 1.64	0.32 \pm 0.13	9000
50	7.32* \pm 1.16	90	5.90 \pm 2.86	0.39 \pm 0.12	9000
250	5.48* \pm 1.27*	68	6.33 \pm 0.47	0.32 \pm 0.14	9000
500	4.07 \pm 1.05*	49•	NA	NA	NA

* Student t- test $p < 0, 05$ comparado con los controles MTZ 0 y DMSO 1%

•% de crecimiento de la raíz menor al 50% comparado con el control.

NA: No analizado.

presentar un crecimiento menor al 50% respecto al control.

Los valores de IM no presentaron diferencias significativas para ninguna de las concentraciones analizadas ($p > 0.05$).

El análisis de anafases-telofases está referido a dos tipos de efectos generales: Efecto clastogénico, resultado de ruptura cromosómica, evidenciado como puentes, fragmentos acéntricos y a efectos sobre la segregación y aneugénicos, como resultado de alteraciones a nivel de anclaje de cromosomas al huso mitótico y migración de las cromátidas, que se manifiestan como cromosomas errantes o rezagados y anafases desorganizados, multipolares y poliploides.

Este análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles MTZ 0 y DMSO ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Allium cepa es un organismo que ofrece un buen modelo experimental *in vivo* para evaluar la toxicidad y la genotoxicidad de sustancias y mezclas complejas.

Numerosas publicaciones informan los resultados obtenidos sobre sustancias analizadas utilizando *Allium cepa* como organismo de prueba. Aunque el MTZ es un compuesto que fue evaluado en una amplia variedad de experimentos, tanto *in vivo* and *in vitro* en procariontes y eucariontes, previamente al presente trabajo, no hay datos del efecto de este compuesto en modelos vegetales.

Algunos químicos relacionados estructuralmente con el MTZ fueron evaluados con este test dando resultados en algunos casos negativos y en otros positivos (Grant, 1982). El dato previo más relevante relacionado es el obtenido con la hidroxilamina, ya que es el intermediario más reactivo de la vía biorreductiva del MTZ. En un ensayo reali-

zado con el objeto de caracterizar el efecto protector de los compuestos tioles sobre sustancias mutagénicas no alquilantes, la hidroxilamina induce un porcentaje elevado de aberraciones cromosómicas sobre las células del meristema de *Allium cepa* (Kaul and Choudhary, 1975).

Considerando el resultado del presente trabajo, podría sugerirse que la vía de reducción que conduce a la formación de hidroxilamina no estaría ocurriendo en las células meristemáticas. Por otro lado, la formación de radicales libres es atribuida a la transferencia de electrones que se favorece en células anaeróbicas o en condiciones de hipoxia. Dado que el oxígeno es muy electronegativo, la biorreducción de sustancias con bajo potencial redox se encuentra favorecida en condiciones de hipoxia y anoxia. El grupo nitro presenta bajo potencial redox y así su biorreducción es improbable en células oxigenadas como el meristema de la raíz de *Allium cepa* (Abreu, 2002; Schmid and Schmid, 1999). La reducción del grupo nitro podría ocurrir en estas condiciones cuando la dosis es elevada por efecto de la ley de acción de masas (Raheter and Hanel, 2003). En este contexto, cabe considerar que en plantas superiores el sistema de citocromos P450 se encuentra involucrado en procesos de detoxificación (Werc *et al.*, 1990; Sanderman, 1992; Guencheva and Pêgas Henriques, 2003), por lo cual *Allium cepa* constituiría un modelo disponible para el análisis de biotransformación de compuestos químicos.

La ausencia de efectos genotóxicos podría estar asociada a la baja reducción del grupo nitro en las dosis ensayadas y a la condición aeróbica y oxidativa de las células meristemáticas de *Allium cepa*.

En cuanto al efecto tóxico evidenciado por la inhibición de crecimiento de la raíz, éste podría involucrar mecanismos no relacionados con la cinética de división celular,

dado que la misma no se encuentra afectada y en cambio interferir con procesos asociados a la elongación de la raíz, en la zona contigua del meristema. En este caso, los mecanismos afectados podrían estar vinculados con el ordenamiento de las microfibrillas de celulosa a lo largo del eje mayor de crecimiento celular, impidiendo una adecuada expansión celular (Green and Poethig, 1982). Esta interacción podría o no involucrar la despolimerización de los microtúbulos corticales, que controlan el proceso de ordenamiento de las microfibrillas de celulosa (Cry and Palevitz, 1995). Dado que los resultados no evidencian efectos aneugénicos y C-mitosis relacionados con falencias en la formación del huso por despolimerización, podría ser que el efecto no sea a nivel de microtúbulos o bien que el MTZ actúe diferencialmente en la zona de elongación y no presente toxicidad en la zona meristemática.

Publicaciones recientes atribuyen la regulación de elongación y diferenciación de la raíz de *Allium cepa* a diferencias en el contenido de ascorbato y diferentes enzimas relacionadas con su estado de oxidación, así como a la presencia de peróxido de hidrógeno y actividad de la peroxidasa. El contenido de estos metabolitos y enzimas difiere con las zonas de la raíz en función del grado de diferenciación de las células, el estado fisiológico y los requerimientos metabólicos (Córdoba Pedregosa *et al.*, 2003). Desde hace varias décadas se conoce que las diferentes zonas de la raíz de *Allium cepa* presentan diferencias en la electronegatividad desde el ápice hasta la base, mientras que el consumo de oxígeno asociado a la tasa respiratoria es más alta en la zona meristemática donde la división celular es muy activa (Berry and Brock, 1946). Considerando que la reducción del MTZ dependería de las condiciones de óxido reducción, como se manifestó anteriormente, sería más probable que

dicha reducción ocurra en la zona de elongación, donde las reacciones de oxidación son menos favorables que en la zona meristemática, lo que podría tener como consecuencia un efecto tóxico evidenciado en la inhibición del crecimiento de la raíz.

El efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la raíz de *Allium cepa* por exposición a algunos compuestos, debería ser reconsiderado cuando este efecto no presente correlación con la inhibición en el índice mitótico y con efectos aneugénicos, y su interpretación enmarcada en un contexto que ofrezca una mayor valoración de este modelo experimental como biomonitor de toxicidad.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el marco del Subsidio PIP 5012 otorgado por CONICET.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU FC, FERRAZ PA, GOULART MOF (2002), Some Applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties. *J. Braz. Chem. Soc.* 13: 19-35.
- AKIOL D, MUNGAN T, BALTACI V (2000), A comparative study of genotoxicity effects in the treatment of *Trichomonas vaginalis* infection: metronidazole or nalidixic acid. *Arch. Gynecol. Obstet.* 264(1): 20-23.
- BERRY LJ, BROCK MJ (1946), Polar distribution of respiratory rate in the onion root tip. *Plant Physiol.* 21(4): 542-549.
- CARBALLO MA, PALERMO AM, MUDRY MD (2004), Toxicogenetic evaluation of metronidazole in the treatment of women infected with *Trichomonas vaginalis*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.* 2: 139-174.
- CÓRDOBA-PEDREGOSA MC, CÓRDOBA F, VILLALBA JM GONZÁLEZ REYES JA (2003), Zonal Changes in Ascorbate and Hydrogen Peroxide Contents, Peroxidase, and Ascorbate-Related Enzyme Activities in Onion Roots. *Plant Physiology* 131: 697-706.

- CRY RJ, PALEVITZ BA (1995), Organization of the cortical microtubules in plants cells. *Curr. Opin. Cell. Biol* 7: 65-71.
- DOBIAS L, CERNÁ M, ROSSNER P, SRÁM R (1994), Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutation Res.* 317:177-194.
- EDWARDS DI (1986), Reduction of Nitroimidazoles in vitro and DNA damage. *Biochem. Pharmacol.* 35: 53-58.
- ELIZONDO G, MONTERO R, HERRERA JE, HONG E, OTROSKY-WEGMAN P (1994). Lymphocyte proliferation kinetics and sister-chromatid exchanges in individual treated with metronidazole. *Mutation Res.* 305(2): 133-137.
- ELIZONDO G, GONSEBATT ME, SALAZAR AM, LARES I, SANTIAGO P, HERRERA J, HONG E, OTROSKY-WEGMAN P (1996), Genotoxic effects of metronidazole, *Mutation Res.* 370(2): 75-80.
- EL-NAHAS AE, EL-ASHMAWY I.M (2004), Reproductive and Cytogenetic Toxicity of Metronidazole in Male Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 94:226-231.
- FAHRIG R, ENGELKE M (1997), Reinvestigation of in vivo genotoxicity studies in man. No induction of DNA strand break in peripheral lymphocytes after metronidazole therapy. *Mutation Res.* 312 (2-3): 215-221.
- FISCHER DD, CRY JR (1998), Extending the microtubule/microfibril Paradigm. *Plant Physiol.* 116:1043-1051.
- FISKESJO G (1985), The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102: 99-109.
- GOMEZ ARROYO S, CASTRO-MELCHORS, VILLALOBOS PIETRINI R, CAMARGO EM, SALGADO-ZAMORA H, CAMPOS ALDERETE ME (2004), Role of functionality in the genotoxicity of metronidazole and its hydroxy metabolites. *Toxicology in Vitro* 18(3): 319-324.
- GRANT WF (1982), Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US Environmental Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 99, 273- 291.
- GREEN PL and POETHIG SP (1982) Biophysics of the extension and initiation of plants organs. In. SUBTELNY S, GREEN PB, (eds), *Developmental Order: Its origin and regulation*, New York: Alan R Liss, pp. 485-509.
- GUENCHEVA TN and PEGAS HENRIQUES JA, (2003) Metabolismo de Xenobióticos. Citocromo P450. In. DA SILVA J., ERDTMAN B., PEGAS HENRIQUES J. A. (eds.), *Genética Toxicológica*, Brasil: Alcance, pp. 225-243.
- HARTLEY-ASP B (1979), Absence of chromosomal damage in the lymphocytes of patients treated with metronidazole for trichomoniasis vaginalis. *Toxicol. Lett.* 4: 15-19.
- KAUL B L. AND CHOUDARY D K (1975), Thiol modification of the biological damage of some non-alkylating mutagens. *Science and Culture* 41 (2): 81-85.
- KEDDERIS GL, MIWA GT (1988), The metabolic activation of nitroheterocyclics therapeutic agents. *Drug Metab* 19: 33-62.
- KORBELIK M, HORVARTH D (1980), The mutagenicity of nitroaromatics drugs. Effects of metronidazole after incubation in hypoxia in vitro. *Mutation Res* 78: 201-207.
- KRAMERS PGN (1982), Studies on the induction of sex-linked recessive lethal mutation in *Drosophila melanogaster* by nitroheterocyclic compounds. *Mutation Res* 101: 209-236.
- LEVAN A (1938), The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas* 24:471-486.
- LOPEZ NIGRO MM, PALERMO AM, MUDRY, MD. CARBALLO MA (2003), Cytogenetics evaluation of two metronidazole derivatives. *Toxicology in Vitro* 17: 35-40.
- MENENDEZ G, ROJAS E, HERRERA LA, LOPEZ MC, SORDO M, ELIZONDO G, OTROSKY-WEGMAN P (2001), DNA breakage due to metronidazole treatment. *Mutation Res* 478(1-2):153-8.
- MENENDEZ D, BENDESKY A, ROJAS E, SALAMANCA F, OTROSKY-WEGMAN P (2002), Role of P35 functionality in the genotoxicity of metronidazole and its hydroxymetabolite. *Mutation Res* 501(1-2): 57-67.
- MHON GR, ONG TM, CALLEN DF, KRAMERS PGN, AARON CA (1970) Comparison of the genetic activity of 5 nitroimidazoles derivatives in *Escherichia coli*, *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Environ Pathol. Toxicol* 2: 657-670.
- MUDRY MD, CARBALLO MA, LABAL DE VINUESA M, LARRIPA I (1994), Mutagenic Bioassay of certain pharmacological drugs: III Metronidazole (MTZ). *Mutation Res* 305: 127-132.
- MULLER M (1981) Action of clinically utilized 5-Nitroimidazoles on microorganisms. *Scan J Infect Dis* 26: 31-41.
- ONG T, SLADE B (1978). Mutagenicity and mutagenic specificity of metronidazole and

- niridazole in *Neurospora crassa*. J Toxicol Environ Health 2: 815-824.
- ONG T, SLADE B, DE SERRES FJ (1979), Mutagenicity and mutagenic specificity of metronidazole and niridazole in *Neurospora Crassa*. J Environ Pathol Toxicol 2: 1109-1118.
- PALERMO A, REYNOSO AS, LOPEZ NIGRO M, CARBALLO MA, MUDRY MD (2004), Teratogenic Evaluation of Metronidazole and Ornidazole Using *Drosophila melanogaster* as an Experimental Model. Birth Defects Research 70: 157-162.
- RAHETER W, HANEL H (2003), Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. Parasitology Research 90: 19-39.
- REYES ROMERO H AND NAVARRO ROJAS P (1998), Infecciones Parasitarias. Caracas. Disinlimed 196 pp.
- RODRÍGUEZ FERREIRO G, CANCINO BADIAS L, LOPEZ NIGRO M, PALERMO AM, MUDRY MD, GONZALEZ EP, CARBALLO MA (2002), DNA Single breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives. Toxicol. Lett. 132 (2): 109-115.
- SANDERMAN H (1992), Plants metabolism of Xenobiotics. Trends Biochem Sci. 17: 82-84.
- SCHMID A, SCHMID H (1999), Pharmacotoxicological mode of Action of Antimicrobial 5-Nitroimidazole Derivates. J. Vet. Med. 46: 517-522.
- TJIO JH AND LEVAN A (1950) The use the oxiquinoline in chromosome analysis. Ann Est Exp Aula Dei 2:21-64.
- WERC RD, GABRIAC B, TEUSTSCH H, DURST F (1990), Two cytochrome P450 isoforms catalyzing O-deethylation of ethoxycoumarin and ethoxyresorufin in higher plants. Biochem J. 270: 729-735.