

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biología



**EVALUACIÓN DE LA POSIBLE CAPACIDAD GENOTÓXICA
DE FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS: LOSARTÁN E
IRBESARTÁN**

Autora: Paula Arranz Gutiérrez

Directora: M^a Isabel Arrieta Sáez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer su trabajo a mi directora la Dra. M^a Isabel Arrieta, por proponer un tema tan interesante que me ha permitido aplicar conocimientos obtenidos durante el grado. Gracias a su tiempo, consejos y correcciones he podido llevar a cabo este Trabajo satisfactoriamente.

También quería agradecer a la Dra. Maitane Barasoain la ayuda prestada y la implicación total en la realización del mismo. Gracias por todos los consejos y por cada segundo invertido en enseñarme conceptos y técnicas.

De manera particular, quiero dar las gracias a todas las personas que han formado parte del estudio de manera altruista.

Asimismo, me gustaría expresar mi agradecimiento a la Universidad de Salamanca, a la cual pertenezco, y a la Universidad del País Vasco por permitirme realizar este Trabajo en el Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal.

Por último y en especial, quiero agradecer este Trabajo a mis padres por darme la oportunidad de estudiar y formarme. Este Trabajo, broche final de mí grado, no hubiera sido posible sin vuestro apoyo diario.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. HIPERTENSIÓN.....	2
1.1.1. Definición, incidencia y sintomatología.....	2
1.1.2. Clasificación de la hipertensión arterial.....	2
1.1.3. Tratamientos de la hipertensión arterial.....	3
1.1.4. Fármacos antagonistas de los receptores de la angiotensina II.....	5
1.2. ESTUDIOS DE BIOMONITORIZACIÓN HUMANA.....	6
1.2.1. Definición de biomonitorización y biomarcador.....	6
1.2.2. Biomarcadores de genotoxicidad.....	7
1.3. EVALUACIÓN DEL RIESGO GENÉTICO DE FÁRMACOS.....	8
1.3.1. Introducción a la toxicología genética.....	8
1.3.2. Ensayos genotóxicos: fármacos ARB.....	9
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. MUESTRA ANALIZADA.....	11
3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	11
3.2.1. Cultivo de linfocitos en sangre periférica.....	11
3.2.2. Ensayo de micronúcleos.....	12
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA POBLACIÓN.....	15
4.2. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS <i>IN VITRO</i>	15
4.2.1. Pruebas de normalidad de las variables citogenéticas.....	16
4.2.2. Comparaciones entre los grupos en estudio.....	17
4.2.3. Estudio de la influencia del sexo.....	19
5. CONCLUSIONES.....	21
6. BIBLIOGRAFÍA.....	22

RESUMEN

La hipertensión arterial (AHT), estado patológico definido como la elevación persistente de la presión arterial, es considerada uno de los principales problemas de salud pública. El tratamiento de la patología se realiza preferentemente con fármacos antihipertensivos. Los pacientes se encuentran sometidos a una exposición larga e ininterrumpida a estos fármacos.

Los fármacos antihipertensivos se clasifican en función del mecanismo de acción por el que logran su efecto. Una de las clases son los antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARB). Los ARB son la última clase terapéutica incluida en la terapia antihipertensiva.

En este Trabajo Fin de Grado, se ha evaluado la posible capacidad genotóxica *in vitro*, de dos tipos de fármacos ARB (losartán e irbesartán) mediante el empleo de uno de los métodos citogenéticos más utilizados, el ensayo de micronúcleos (MN). El índice de división nuclear (NDI) fue usado también como medida de genotoxicidad. El análisis se ha realizado en linfocitos de sangre periférica (PBL) de 10 individuos control mediante dos tipos de cultivo uno sin fármaco y otro añadiendo los fármacos a los cultivos en una concentración igual a la que se encuentra en el plasma de pacientes. Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos (BNMN) pero no se observan diferencias estadísticamente significativas en el índice de división nuclear.

Estos resultados sugieren un posible efecto genotóxico de los fármacos pero sería necesario llevar a cabo estudios en una población más amplia e *in vivo* con los mismos fármacos para confirmarlo.

ABSTRACT

Arterial hypertension (AHT) also known as high blood pressure, is a chronic medical condition in which the blood pressure in the arteries is elevated. It is considered one of the main public health problems. The large majority of hypertensive patients need long-term treatment with antihypertensive. Therefore, patients may be exposed to the effects of these drugs over a long period of time.

Antihypertensive drugs are classified according to their mechanism of action. Angiotensin II receptor blockers (ARBs) are a new class of drugs used in the treatment of hypertension.

In this project we studied the potential genotoxic effects of two ARBs (losartán e irbesartán) *in vitro* in human peripheral blood lymphocytes (PBL) by means of the cytokinesis-block micronucleous (CBMN) assay. The nuclear division index (NDI) was used too as a measure of cytotoxicity. The study was performed in 10 control individuals by two different types of cultures: one without adding any drug and the other type by adding the drugs to the culture medium at a final concentration similar to the levels found in plasma in patients.

Our results showed a significant increase in the frequencies of binucleated cells with MN (BNMN) but we have observed no significant variation in the NDI. The results suggest a possible genotoxic effect but further studies in a wider population and *in vivo* are needed to confirm it.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. HIPERTENSIÓN

1.1.1. Definición, incidencia y sintomatología

La hipertensión arterial (AHT) se define como un estado patológico determinado por una tensión sistólica igual o superior a 140 mm Hg y una tensión diastólica igual o superior a 90 mm Hg. La tensión arterial normal en un adulto está definida como una tensión sistólica de 120 mm Hg y una tensión diastólica de 80 mm Hg. Sin embargo, los beneficios cardiovasculares de la tensión arterial normal se extienden incluso por debajo de esos niveles de tensión sistólica (105 mm Hg) y de tensión diastólica (60 mm Hg) [1].

La hipertensión arterial es un importante factor de riesgo cardiovascular. Especialmente en países desarrollados, es una condición muy frecuente que afecta al 40% de los adultos [2]. La organización mundial de la salud (WHO) estima que sea la décima causa de muerte en 2030 [3]. En España, la AHT afecta aproximadamente a un 35% de la población, es decir, de manera global a unos 10 millones de individuos adultos. Este porcentaje de personas afectadas aumenta de manera análoga al incremento de la edad en los individuos [4]. Más concretamente, en el País Vasco es la enfermedad crónica que afecta a un mayor porcentaje de la población, tanto en mujeres como en hombres [5].

Uno de los factores que hacen a la AHT peligrosa es que al inicio, por lo general, es asintomática y la mayor parte de la población afectada por AHT desconoce que la padece [6]. La AHT es un proceso silencioso que dura muchos años y en ocasiones los primeros síntomas como cefaleas, ruidos de oídos, sensación de inestabilidad, fatiga y disnea pueden ser seguidos de complicaciones cardíacas en forma de infarto o insuficiencia cardíaca o incluso a nivel cerebral en forma de ictus [7].

La importancia de la investigación sobre los tratamientos antihipertensivos o la mejora de los ya existentes radica no solo en la incidencia que tiene la AHT en la población sino también en ser la principal causante del 50% de las enfermedades cardiovasculares de alto riesgo como las mencionadas en el párrafo anterior [8].

1.1.2. Clasificación de la hipertensión arterial

La clasificación de la hipertensión arterial se puede realizar atendiendo a diferentes aspectos, tres de los más importantes son los siguientes [9]:

- ◆ Los valores de la presión arterial (BP).
- ◆ La importancia de afección de los órganos diana.
- ◆ La etiología.

Los valores de la presión arterial son usados en todas las guías internacionales para el tratamiento de la hipertensión arterial. La clasificación basada en estos valores se muestra en la tabla 1.1. [10].

	Presión arterial sistólica (mm Hg)	Presión arterial diastólica (mm Hg)
Óptima	<120	<180
Normal	120-129	80-84
Normal - alta	130-139	85-89
Grado 1 hipertensión (media)	140-159	90-99
Grado 2 hipertensión (moderada)	160-179	100-109
Grado 3 hipertensión (severa)	≥ 180	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	<90

Tabla 1.1. Clasificación de la BP en adultos [10].

La clasificación del tipo de hipertensión arterial es importante para determinar el tratamiento a seguir.

1.1.3. Tratamientos de la hipertensión arterial

El tratamiento de la AHT se suele llevar a cabo combinando dos componentes: uno no farmacológico y otro farmacológico. El componente no farmacológico consiste en un cambio del estilo de vida: pérdida de peso, aumento del ejercicio físico aeróbico [11] y la disminución del consumo de alcohol [12]. Asimismo, una dieta baja en grasa total, una reducción del consumo de sodio y un aumento de la ingesta de frutas, vegetales y productos lácteos desnatados [13] han demostrado que manteniendo en el tiempo (más de 3 años) estos hábitos la presión arterial disminuye [14]. Estas medidas no farmacológicas tienen efecto no solo sobre personas hipertensas, reduciendo la presión arterial, sino también en personas no hipertensas o pre-hipertensas, previniendo el desarrollo de hipertensión [15].

En el tratamiento farmacológico, las guías sobre AHT se han centrado durante muchos años en los valores de la presión arterial como variables únicas o principales que determinaban la necesidad y el tipo de tratamiento. La guía de la Sociedad Europea de Hipertensión y de la Sociedad Europea de Cardiología (ESH/ESC) de 2007 [16] hace hincapié en que el diagnóstico y el tratamiento de la hipertensión arterial

deben relacionarse con una cuantificación del riesgo cardiovascular total. Esto es importante ya que el problema de la AHT no aparece de forma aislada sino que los pacientes presentan otros factores de riesgo cardiovascular relacionados con el metabolismo lipídico principalmente [17]. Por ello, el tratamiento farmacológico puede involucrar el uso de más de un fármaco.

Los fármacos antihipertensivos se clasifican en función de su mecanismo de acción y lugar de actuación [18]. En base a esto tenemos:

- ◆ **Fármacos diuréticos:** son fármacos que estimulan la excreción renal de agua y electrolitos. Son los antihipertensivos más antiguos, económicos y bien tolerados a dosis bajas (12,5 - 25 mg/día) [19].
 - ◆ **Fármacos bloqueantes β -adrenérgicos:** los antagonistas β -adrenérgicos (bloqueadores beta) se unen selectivamente a los β -adrenoceptores, lo que produce un antagonismo competitivo y reversible de los efectos de la estimulación β -adrenérgica en distintos órganos [20]. Estos fármacos a nivel cardíaco disminuyen la fuerza contráctil del miocardio y la frecuencia cardíaca, y como consecuencia reducen el gasto cardíaco [19].
 - ◆ **Fármacos bloqueantes α -adrenérgicos:** reducen la presión arterial disminuyendo las resistencias periféricas y produciendo relajación [19]. Un efecto secundario muy común es la hipotensión ortostática de la primera dosis pero suele ser menos frecuente cuando se comienza con dosis bajas subiendo progresivamente. Otros efectos secundarios pueden ser mareo y molestias gastrointestinales [21].
 - ◆ **Fármacos antagonistas de calcio:** los canales de calcio que regulan la entrada de Ca^{2+} a la célula, son la diana específica de estos fármacos que, uniéndose a receptores acoplados a dichos canales, precipitan su cierre, la caída de los niveles citosólicos de Ca^{2+} y la vasodilatación [19]. Lo que supone un descenso de la BP.
 - ◆ **Fármacos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACEI):** desde la introducción de los ACEI a finales de la década de los 80 se ha demostrado como el bloqueo farmacológico del sistema renina-angiotensina (RAS) es efectivo para la prevención y el tratamiento de la hipertensión, la enfermedad coronaria, el ictus, la insuficiencia cardíaca o la nefropatía diabética [22]. El mecanismo de acción más evidente de estos fármacos es la inhibición de la enzima que convierte la angiotensina I en angiotensina II (A-II), con lo que las concentraciones de A-II circulantes disminuyen y se suprime la vasoconstricción directa inducida por este péptido, provocando un descenso de la presión arterial [23].
 - ◆ **Fármacos antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II):** los antagonistas de los receptores de A-II representan una clase de fármacos que poseen características comunes con
-

los ACEI en cuanto a su eficiencia para el tratamiento de la hipertensión aunque su principal diferencia es una mayor tolerabilidad de los ARA-II [22]. Estos fármacos son el objeto de estudio en este Trabajo Fin de Grado por lo que se hará una descripción más detallada en el siguiente apartado.

1.1.4. Fármacos antagonistas de los receptores de la angiotensina II

El RAS es un sistema hormonal responsable de la regulación del equilibrio electrolítico. La angiotensina II (A-II) es el mayor péptido efector del sistema.

La A-II interviene en el equilibrio electrolítico y su efecto sobre los diferentes tejidos se produce al interactuar con los receptores específicos que presentan en la membrana las células diana. Hay diferentes receptores pero los más conocidos son los AT1 y AT2. Los receptores AT1 se distribuyen principalmente por el corazón, los vasos sanguíneos, el riñón y el sistema nervioso central. Los receptores AT2 se encuentran en tejidos fetales y en el adulto en pequeñas cantidades, en el riñón, las glándulas adrenales, el corazón, el cerebro, el útero y los testículos. El mecanismo de acción de los fármacos ARA II consiste en inhibir las acciones de la A-II bloqueando a los receptores AT1.

La mayor afinidad de los ARA-II por los receptores AT1 supone que sus principales efectos sean la disminución de las resistencias periféricas, la modificación de la frecuencia cardíaca y/o del gasto cardíaco. Como consecuencia del desplazamiento competitivo se incrementan las concentraciones circulantes de angiotensina II. Este aumento de concentración provoca un aumento de las uniones de angiotensina II con los receptores AT2 que no estén bloqueados por los ARA-II. Esto genera un aumento de la liberación de óxido nítrico, bradicininas y prostaglandinas que presentan propiedades vasodilatadoras y participan en la reabsorción tubular proximal de Na⁺ [23]. Estos efectos suponen un descenso de la presión arterial y pueden verse esquematizados en la figura 1.1.

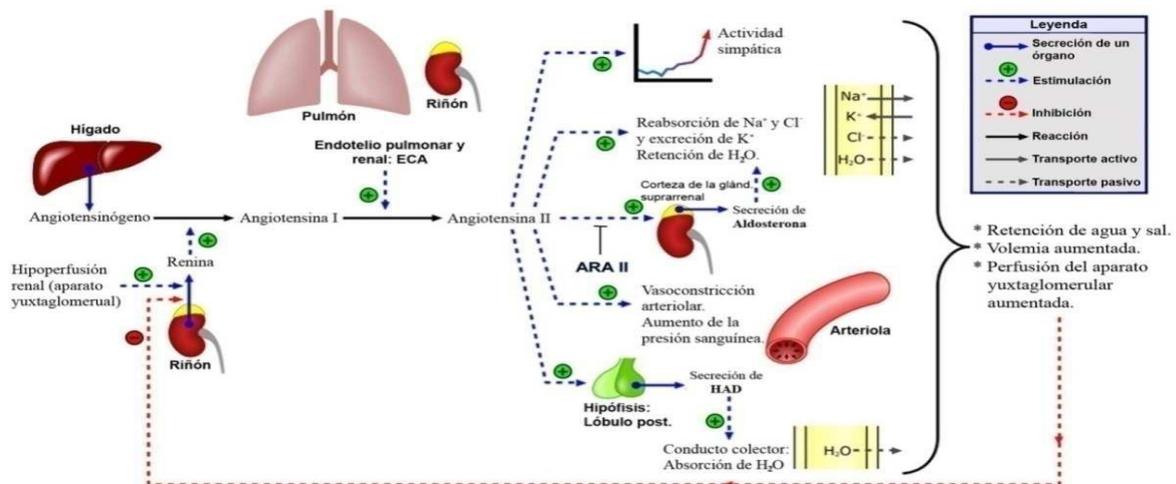


Figura 1.1. Sistema RAS y lugar de acción de fármacos antihipertensivos [9].

En este Trabajo Fin de Grado evaluaremos la posible capacidad genotóxica de dos fármacos antagonistas de los receptores de la angiotensina II: losartán e irbesartán.

- ◆ Losartán fue uno de los primeros fármacos ARA II aprobados para uso clínico, su aprobación se realizó en 1995 [24]. Por su estructura química al igual que los fármacos valsartán, irbesartán y candersartán, pertenece al grupo de los binefilitetrazoles. Losartán se absorbe bien por vía oral y alcanza su concentración máxima al cabo de una hora pero el 14% de la dosis administrada se transforma en un metabolito activo que alcanza su concentración máxima a las dos o cuatro horas con una semivida más larga de nueve horas por lo que el metabolito activo es el verdadero causante de muchas acciones del losartán [25]. Aun así, esta semivida de nueve horas hace que los efectos sean a muy corto plazo en comparación con otros fármacos ARA-II como el candersartán cuyos efectos duran más de 24 horas [26].
- ◆ Irbesartán se absorbe de forma rápida y completa por vía oral y su concentración máxima se alcanza a la hora y media o dos horas. Presenta una semivida más prolongada que el losartán y su respectivo metabolito, de unas quince a diecisiete horas [27]. Diversos ensayos clínicos han demostrado que irbesartán y otros fármacos ARA-II como candersartán, olmesartán y telmisartán son más efectivos que losartán en la reducción de la presión arterial [28].

1.2. ESTUDIOS DE BIOMONITORIZACIÓN HUMANA

Los seres humanos están expuestos a una gran variedad de sustancias, esta exposición puede conllevar efectos negativos sobre la salud. Los estudios de biomonitorización o evaluación del riesgo son esenciales para la estimación y predicción de efectos adversos para la salud humana.

1.2.1. Definición de biomonitorización y biomarcador

La biomonitorización humana es una actividad que consiste en la obtención de muestras biológicas con el objetivo de determinar el potencial riesgo que para la salud humana tiene la sustancia en estudio.

Para identificar los cambios resultantes en sistemas biológicos producidos por la sustancia en estudio, sus metabolitos o sus productos de reacción se utilizan indicadores llamados biomarcadores. En un sentido general, un biomarcador se define como cualquier respuesta biológica que refleja una interacción entre un sistema biológico y un agente químico, físico o biológico. El principal valor de los biomarcadores radica en que evidencia los efectos tempranos de una sustancia tóxica [29,30].

Los biomarcadores se dividen clásicamente en tres grupos:

- ◆ De exposición: permiten conocer si el agente en estudio ha penetrado en el organismo.
 - ◆ De efecto: indican cambios bioquímicos que acontecen tras la exposición a los agentes en estudio.
 - ◆ De susceptibilidad: sirven como indicadores de la respuesta individual frente a la agresión de un tóxico o grupo de tóxicos.
-

En nuestro estudio analizamos biomarcadores de efecto como son los micronúcleos en linfocitos de sangre periférica.

1.2.2. Biomarcadores de genotoxicidad

Englobados en el grupo de biomarcadores de efecto se hallan los marcadores de genotoxicidad que se utilizan, generalmente, para monitorizar el efecto genotóxico de sustancias químicas [32]. Las alteraciones citogenéticas son uno de los marcadores de efecto biológico temprano más utilizado en biomonitorización humana debido a que se ha demostrado que casi todas las sustancias inducen un aumento de este tipo de alteraciones [29].

a. Ensayo de micronúcleos

Entre los ensayos citogenéticos más utilizados está el estudio de micronúcleos (MN).

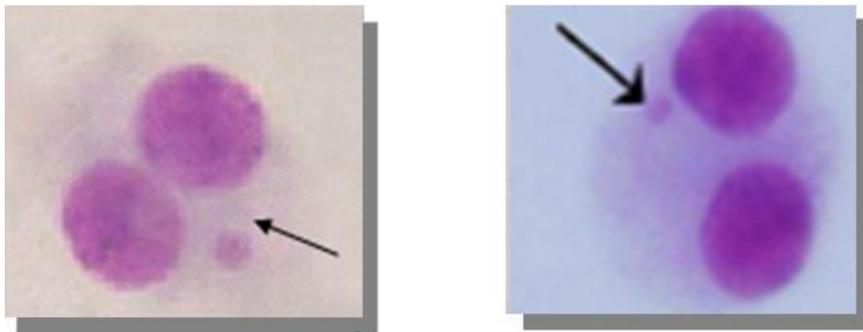


Figura 1.2. Imágenes de células binucleadas con un micronúcleo [34,7].

a.1. Los micronúcleos y su origen.

Los micronúcleos son estructuras derivadas del núcleo, más pequeñas. Pueden contener cromosomas enteros o fragmentos cromosómicos derivados de roturas no reparadas. Estos fragmentos de cromatina rodeados de una envoltura nuclear se producen por irregularidades en el proceso de división celular [33]. El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros y se consideran micronúcleos de origen aneugénico o pueden derivar de fragmentos cromosómicos acéntricos, estos últimos son más frecuentes y se consideran que son de origen clastogénico [34]. Para conocer el origen de los micronúcleos se emplean las técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) con sondas alfa satélite [35].

a.2. Ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica

La utilización de los MN como marcadores en los linfocitos de sangre periférica fue propuesta en 1976 por Countryman y Heddle. Estos investigadores propusieron el recuento de MN como medida de daño cromosómico. Posteriormente, en 1985 el ensayo fue mejorado por Fenech y Morley mediante el empleo de

citocalasina-B (cyt-B) impidiendo la citocinesis y generando células binucleadas (BN) que han sufrido una sola división. La cyt-B no afecta al núcleo, solo imposibilita la formación del anillo contráctil [36]. Esta técnica fue validada a nivel mundial en 1999 como un biomarcador efectivo de daño en el DNA [37].

a.3. Factores que afectan a la frecuencia de micronúcleos

Los micronúcleos pueden producirse de manera espontánea o generada por contaminantes ambientales, radiaciones, sustancias químicas, estrés oxidativo o incluso hábitos de vida; también pueden ser inducidos por inflamaciones crónicas, exposición a metales pesados, quimioterapia o condiciones neoplásicas [38,39]. La tabla 1.2. señala algunos factores que afectan al número de micronúcleos en cultivos de células humanas.

Factores que incrementan el número de MN	Factores que reducen el número de MN
La edad o procesos fisiológicos como la osteoporosis o la menopausia suponen un mayor porcentaje de MN.	Agentes antioxidantes.
El sexo femenino presenta mayor porcentaje de MN.	Vitaminas E y C.
Drogas, alcohol y exposición a agentes tóxicos de forma cotidiana.	β -Caroteno.
Déficit de folato o vitamina B12.	Infusiones de Ginseng y té

Tabla 1.2. Factores que afectan al número de MN en cultivos de células humanas [38,39].

1.3. EVALUACIÓN DEL RIESGO GENÉTICO DE FÁRMACOS

1.3.1. Introducción a la toxicología genética

La Toxicología Genética es la disciplina que estudia los agentes genotóxicos físicos, químicos y biológicos que pueden dañar el material genético de las células, directa e indirectamente. El término genotóxico se aplica a aquellos agentes que causan daño en el material genético a dosis subtóxicas [40].

1.3.2. Ensayos genotóxicos: fármacos ARB

Revisiones recientes sobre la capacidad genotóxica de los agentes antihipertensivos sugieren también que para la mayoría de estos fármacos, los datos publicados no permiten la evaluación del riesgo en humanos [41].

En la actualidad, los fármacos ARB son medicamentos de última generación cuyo uso está ampliamente extendido. Sin embargo, solo tres ARB irbesartán, telmisartán y eprosartán han sido analizados relación a su capacidad genotóxica en células humanas (estudio anomalías cromosómicas *in vitro*); los resultados son positivos para irbesartán, negativos para eprosartán y no concluyentes para telmisartán.

2. OBJETIVOS

En base a lo señalado previamente, el principal objetivo de este Trabajo Fin de Grado es evaluar *in vitro* la posible capacidad genotóxica de dos fármacos inhibidores de los receptores de angiotensina II: losartán e irbesartán.

El estudio se ha llevado a cabo en linfocitos de sangre periférica de un grupo de personas sanas a través de la realización de un ensayo de micronúcleos.

Para llevar a cabo el objetivo principal, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- ◆ Determinar la frecuencia de células binucleadas con un micronúcleo (BNMN).
- ◆ Analizar el índice de división nuclear (NDI) como una medida de toxicidad celular.
- ◆ Estimar si existe una correlación entre la frecuencia de micronúcleos y el sexo.
- ◆ Evaluar la posible diferencia, en cuanto a la capacidad genotóxica, entre los dos fármacos, ambos pertenecientes al grupo de bifeniltetrazoles.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTRA ANALIZADA

La muestra consta de diez individuos, cinco hombres y cinco mujeres, entre veinte y treinta y dos años, procedentes de diferentes localidades. Estos individuos están sanos por lo que no están recibiendo ningún tratamiento farmacológico, no son fumadores, no tiene hábitos de consumo de alcohol y no han estado sometidos a ningún tipo de prueba radiológica últimamente.

El análisis se ha realizado en linfocitos en sangre periférica (PBL). A cada individuo se le ha extraído 20 ml de sangre mediante punción en el antebrazo. La sangre la hemos recogido en tubos con heparina para evitar la coagulación, el periodo transcurrido entre la extracción y el posterior cultivo ha sido menor a dos horas. Para facilitar el etiquetado a cada individuo se le ha asignado un número.

Los métodos analíticos se han llevado a cabo entre Noviembre de 2014 y Junio de 2015 en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco.

3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.2.1. Cultivo de linfocitos en sangre periférica

Cuando las muestras llegan al laboratorio se establecen los cultivos que se realizan en condiciones de esterilidad y por duplicado. Para cada individuo se realizan seis cultivos:

- ◆ Un cultivo con losartán y su correspondiente duplicado.
- ◆ Un cultivo con irbesartán y su correspondiente duplicado.
- ◆ Un cultivo control y su correspondiente duplicado.

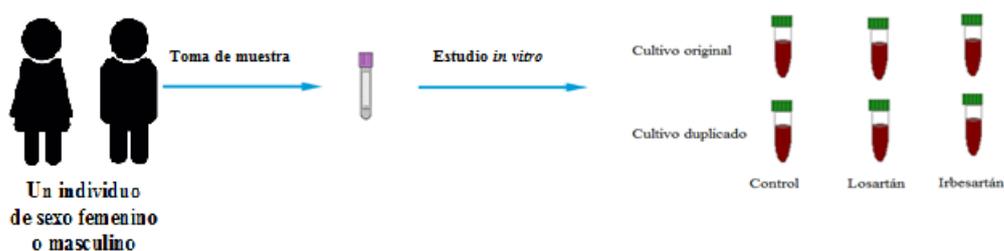


Figura 3.1. Toma de muestras y diferentes cultivos para cada individuo.

El cultivo de linfocitos de sangre periférica se realiza en: medio RPMI-1640 (*Gibco*®) suplementado con suero fetal bovino al 15 % (*Gibco*®), antibiótico-antimicótico al 1 % (*Gibco*®), y tampón Hepes al 1 % (*Gibco*®). Una vez suplementada y homogeneizada la mezcla, se alicuota en tubos de 5 ml. A cada tubo se le añade 0,5 ml de sangre. Los tubos se cultivan en la estufa a 37°C ligeramente inclinados. Una vez al día es necesario homogeneizar y oxigenar la muestra mediante agitación manual suave.

A las 24 horas a dos de los seis tubos de cada individuo de la muestra se añade el fármaco losartán y a otros dos tubos se añade el fármaco irbesartán. Los fármacos adicionados se disuelven previamente en agua destilada.

Las concentraciones en los cultivos calculadas a partir de la dosis habitual inicial son las siguientes:

- ◆ Para losartán la dosis habitual es de 50 mg/día, por lo que la concentración en el cultivo será de 0.03mg/ml.
- ◆ Para irbesartán la dosis habitual es de 150mg/día, por lo que la concentración en el cultivo será de 0.01mg/ml.

3.2.2. Ensayo de micronúcleos

El ensayo de MN en PBL ha sido realizado siguiendo el protocolo estandarizado del grupo de investigación del Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco.

El bloqueo de la citocinesis se ha llevado a cabo como propone Fenech *et al.* [42]. A las 44 h, se le añade al cultivo Cyt-B (*Sigma - Aldrich*®) a una concentración de 6 µg/ml que inhibe tanto la polimerización de la actina como la interacción de la actina con otros filamentos impidiendo que se produzca la citocinesis. Los cultivos se vuelven a incubar a 37°C durante otras 28 h más hasta llegar a las 72 horas de siembra y entonces se inicia su procesamiento.

a. Procesamiento

En primer lugar, se centrifugan los cultivos durante 10 min a 1.500 r.p.m. y tras desechar el sobrenadante se añaden 5 ml de una solución hipotónica (0,075 M KCl); al contener dicha solución menor concentración de sales que el citoplasma de la célula, provoca que el agua entre en la célula por ósmosis haciendo que ésta aumente su volumen.

Transcurridos 3 min se repite la centrifugación y tras eliminar de nuevo del sobrenadante, se fijan las células con 5 ml de solución de Carnoy recién preparada (metanol: ácido acético 3:1; *Merck*); el metanol precipita la cromatina y el ácido acético lisa las distintas estructuras de la célula.

Se vuelve a centrifugar y se repite la ronda de fijación 3 veces más con la finalidad de eliminar restos celulares. En nuestro caso, la última ronda de fijación la llevamos a cabo al día siguiente justo antes de realizar las extensiones y hasta entonces mantenemos las muestras a 4°C.

b. Extensión y tinción.

Finalmente, se realizan las extensiones adicionando un par de gotas a los portaobjetos y, a continuación se tiñen mediante tinción con Giemsa (6 ml de Giemsa (*Merck*) en 10 % de tampón fosfato durante 10 min) para que puedan ser observadas al microscopio óptico. La suspensión celular restante es almacenada a - 20 °C por si fuese necesario repetir el análisis.

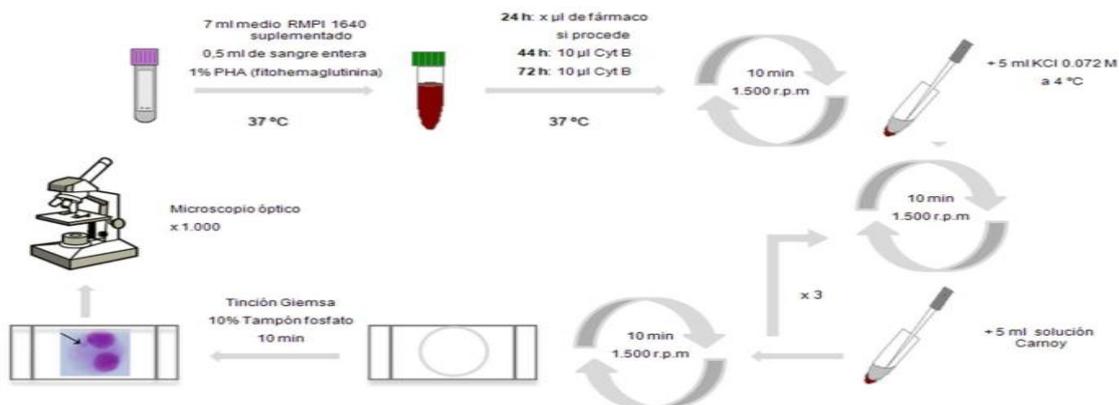


Figura 3.2. Protocolo del ensayo de micronúcleos en PBL [7].

c. Análisis células binucleadas y micronúcleos

La selección de células binucleadas y micronúcleos para el análisis se ha realizado de acuerdo con los criterios reconocidos por la iniciativa internacional HUMN [43], tal y como muestra la tabla 3.1.

Criterio de selección de células BN	Criterio de selección de MN
Las células deben presentar dos núcleos.	El diámetro oscila entre 1/16-1/3 de la media del diámetro del núcleo principal.
Membrana citoplasmática y nuclear intacta.	No refractarios.
Los dos núcleos de una célula binucleada deben tener aproximadamente el mismo tamaño, el mismo patrón de tinción y forma.	Intensidad de tinción similar a los núcleos principales.
Los dos núcleos de la célula binucleada pueden estar unidos por un puente nucleoplasmático no más largo que un cuarto del diámetro de la célula.	Forma similar a los núcleos de la célula BN.
Los dos núcleos de una célula binucleada no pueden estar solapados ni encontrarse en etapas de apoptosis.	No conectados con ninguno de los núcleos de la célula BN, pueden tocarse los núcleos de la célula BN pero no solaparse.

Tabla 3.1. Criterios selección de células binucleadas y micronúcleos [43].

Se analizan 1.000 células BN de cada cultivo y se determinan el número de células binucleadas con un micronúcleo. Además, se calcula el NDI de acuerdo con la fórmula propuesta por Eastmont y Tucker, para lo cual, se cuentan 500 células y se determina el porcentaje de ellas con un núcleo M_1 , dos M_2 , tres M_3 o cuatro M_4 (mono-, bi-, tri- y tetra-nucleadas respectivamente) mediante la siguiente fórmula 3.1. [44]:

$$\text{NDI} = \frac{M_1 + M_2 + M_3 + M_4}{\text{N}^\circ \text{ Total de células analizadas.}}$$

Donde $M_1 = 1 \times \text{N}^\circ \text{ Células mononucleadas}$, $M_2 = 2 \times \text{N}^\circ \text{ Células binucleadas}$, $M_3 = 3 \times \text{N}^\circ \text{ Células trinucleadas}$ y $M_4 = 4 \times \text{N}^\circ \text{ Células tetranucleadas}$.

Fórmula 3.1. Cálculo del NDI de acuerdo con la fórmula propuesta por Eastmont y Tucker [44].

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El programa estadístico utilizado tanto para los resultados del análisis descriptivo como para la comparación estadística ha sido el SPSS para Windows, versión 22.0 (Illinois, U.S.A).

Las frecuencias de las variables se describen principalmente mediante la media aritmética y la desviación estándar en cada grupo. El nivel de significación considerado en todas las pruebas ha sido de $p < 0,05$.

Las comparaciones que se han llevado a cabo han sido:

- ◆ Comparación entre el grupo control y el grupo control/fármaco.
- ◆ Comparación entre los subgrupos control/fármaco divididos en función del fármaco analizado.
- ◆ Comparación entre el grupo control y los subgrupos control/fármaco divididos en función del fármaco analizado.
- ◆ Estudio de la influencia del sexo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA POBLACIÓN

La población está compuesta por 10 individuos 5 hombres y 5 mujeres, entre veinte y treinta y dos años. Estos individuos están sanos por lo que no están recibiendo ningún tratamiento farmacológico, no son fumadores, no tienen hábitos de consumo de alcohol y no han estado sometidos a ningún tipo de prueba radiológica últimamente.

Las características descriptivas de la población se muestran en la tabla 4.1.

	TOTAL DE INDIVIDUOS	SEXO		EDAD	
		HOMBRES	MUJERES	HOMBRES	MUJERES
CONTROL	10	5	5	27,40 ± 3,39	25,00 ± 3,39

Tabla 4.1. Características descriptivas de la población.

De cada individuo tenemos seis cultivos, a dos de ellos se añade el fármaco losartán y se les denomina subgrupo control/losartán, a otros dos cultivos se añade el fármaco irbesartán formando el subgrupo control/irbesartán. Ambos subgrupos forman el grupo control/fármaco. A los dos cultivos restantes no se añade ningún fármaco y forman el grupo denominado control.

4.2. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS *IN VITRO*

El ensayo de MN *in vitro* permite evaluar la posible actividad genotóxica *in vitro* del fármaco al comparar los resultados de las variables analizadas obtenidos en el grupo control y los resultados de las variables analizadas, obtenidos en el grupo control/fármaco. En el ensayo de MN se han analizado las siguientes variables: el número total de BNMN y el NDI.

Los resultados obtenidos para cada variable se recogen en la tabla 4.2.

GRUPO	BNMN	NDI
Control	3,85 ± 1,34	1,72 ± 0,04
Control/fármaco	6,02 ± 2,90	1,75 ± 0,09
Control/losartán	6,30 ± 3,16	1,75 ± 0,11
Control/irbesartán	5,75 ± 2,67	1,74 ± 0,07

Tabla 4.2. Resultados de las variables analizadas en el ensayo de MN.

En relación a la frecuencia espontánea de cualquier lesión cromosómica, referida a la incidencia de éstas en la población general, es importante resaltar que su identificación es fundamental, ya que representa una medida del daño genético acumulado durante la vida media de los PBL que circulan por el torrente sanguíneo [39]. La frecuencia basal de lesiones cromosómicas debe ser establecida para determinar los valores normales aceptables y así, poder estimar el incremento inducido por un determinado agente.

Surrallés *et al.* [45], establece la frecuencia basal media de MN en la población general en $7,8 \pm 5,2$ BNMN por cada 1.000 células BN; y se encuentra fuertemente influida por el sexo y la edad.

En nuestra muestra control, la frecuencia media basal de MN hallada es de 3,85 MN/1.000 células BN, un valor inferior a la frecuencia espontánea estimada en la población general. Surrallés *et al.* estima también que el incremento anual en la frecuencia de MN se sitúa en 0,17 BNMN/año por lo que la edad media de los individuos de nuestra muestra (26,2 años), inferior a la de la población general, puede ser uno de los motivos por los que la frecuencia basal media de MN sea menor.

Respecto al NDI, la relación de células mononucleadas, binucleadas o multinucleadas generadas en función del número de cariocinesis, nos ofrece una medida del índice de proliferación de las células en el cultivo. Una disminución en el índice NDI es una medida indirecta de citotoxicidad que refleja un retraso en la actividad mitótica. De acuerdo con Fenech *et al.* [37], en cultivos de PBL los valores normales de NDI oscilan entre 1,3 y 2,2.

En nuestro estudio, el valor del índice NDI en todos los grupos analizados se encuentra dentro de este rango. En el estudio sobre el posible efecto citotóxico de los fármacos ARB analizados, se constata un ligero aumento del índice NDI aunque no es estadísticamente significativo para el grupo control/fármaco. De manera individualizada para los dos tipos de fármacos ARB no se observan diferencias en el NDI. Estos resultados sugieren que los antihipertensivos analizados no inhiben la división nuclear *in vitro*.

4.2.1. Pruebas de normalidad de las variables citogenéticas

De acuerdo con numerosos autores, las variables citogenéticas discretas en el ensayo de MN se ajustan a una distribución de Poisson [46]. Para comprobar que no siguen una distribución normal realizamos el test de Kolmogorov-Smirnov ya que tenemos más de 50 datos. Los resultados se muestran en la tabla 4.3.

		<i>p</i> (BNMN)	<i>p</i> (NDI)
Tipos de distribución	Normal	<0,001	<0,001
	Poisson	0,972	Distribución no aplicable ya que no son números enteros.

Tabla 4.3. Resultados del test de Kolmogorov-Smirnov.

En relación a BNMN se ha comprobado estadísticamente como los datos se ajustan a una distribución de Poisson por lo que las comparaciones entre los grupos se realizan empleando tests no paramétricos. Respecto al índice de división nuclear vemos como no sigue una distribución normal simétrica sino una distribución asimétrica positiva, por lo que para las comparaciones entre los grupos empleamos también tests no paramétricos.

La figura 4.1 muestra la distribución de frecuencias de BNMN y NDI en la población analizada.

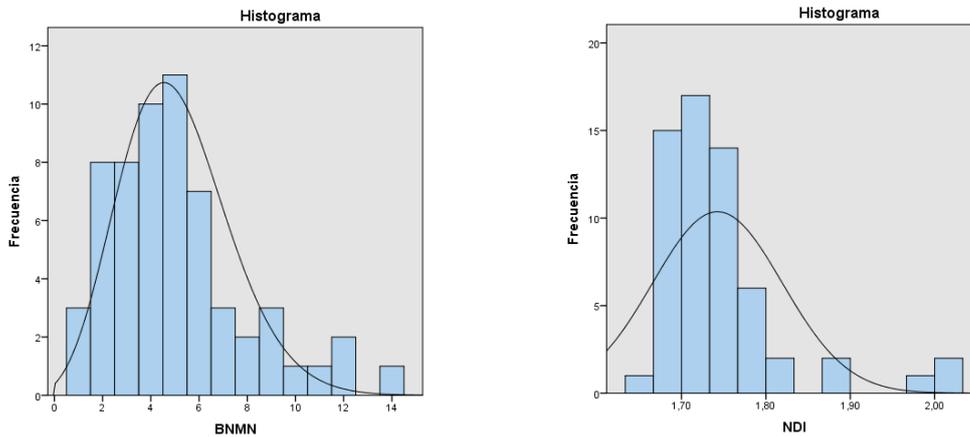


Figura 4.1. Histogramas mostrando la distribución de frecuencias de BNMN y NDI en la población.

4.2.2. Comparaciones entre los grupos en estudio

a. Comparación entre el grupo control y el grupo control/fármaco

Las frecuencias medias de la variable BNMN observadas en el grupo control son inferiores respecto a las frecuencias medias obtenidas en el grupo control/fármaco ($3,85 \pm 1,34$ vs. $6,02 \pm 2,90$ para BMMN, respectivamente).

Mediante el test de Wilcoxon para muestras dependientes no paramétricas, se comprueba que esas diferencias entre las medias de ambos grupos son además estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El valor del índice NDI en el grupo control se sitúa en $1,72 \pm 0,04$ mientras que en el grupo control/fármaco, dicho índice adquiere un valor de $1,75 \pm 0,09$. Al testar estadísticamente los resultados obtenidos en ambos grupos mediante el test de Wilcoxon para muestras dependientes no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Estos resultados podemos verlos en la tabla 4.5.

	BNMN	NDI
<i>p</i>	< 0,001	0,411

Tabla 4.5. Resultados del análisis estadístico entre el grupo control y el grupo control/fármaco.

Esta comparación del grupo control con el grupo control/fármaco nos da una visión general del efecto que tienen los fármacos sobre los controles. Al testar *in vitro* la exposición a los fármacos en el grupo control vemos como hay un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de BNMN, lo que sugiere un posible potencial genotóxico de los fármacos ARB. Por otro lado, respecto al NDI no hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo control/fármaco lo que sugiere que la presencia del fármaco no influye en la proliferación celular.

b. Comparación entre el grupo control y los subgrupos control/losartán y control/irbesartán

Las frecuencias medias de la variable BNMN observadas en el grupo control ($3,85 \pm 1,34$) son inferiores respecto a las frecuencias medias obtenidas en los subgrupos control/losartán y control/irbesartán ($6,30 \pm 3,16$ y $5,75 \pm 2,67$ para BMMN, respectivamente).

Mediante el test de Wilcoxon para muestras dependientes no paramétricas, se comprueba que las diferencias entre las medias del grupo control y los subgrupos son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El valor del índice NDI en el grupo control se sitúa en $1,72 \pm 0,04$ mientras que en los subgrupos control/losartán y control/irbesartán, dicho índice adquiere un valor de $1,75 \pm 0,11$ y $1,74 \pm 0,07$ respectivamente. Al comparar estadísticamente los resultados obtenidos en ambos grupos, mediante el test de Wilcoxon para muestras dependientes, no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

La tabla 4.6. muestra los resultados del análisis estadístico.

	BMMN		NDI	
	Control vs. Control/losartán	Control vs. Control/irbesartán	Control vs. Control/losartán	Control vs. Control/irbesartán
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	0,411	0,614

Tabla 4.6. Resultados del análisis estadístico entre el grupo control y los subgrupos control/losartán y control/irbesartán.

Esta comparación individualizada de los dos fármacos ARB con el grupo control de nuestro estudio nos dan una visión más concreta del efecto de cada uno de los fármacos. Los resultados señalan que, en ambos casos hay un incremento significativo en la frecuencia de BNMN indicándonos un posible efecto genotóxico por parte de los dos fármacos. En cuanto al valor del NDI aumenta ligeramente tanto en los cultivos con losartán como en los cultivos con irbesartán pero en ninguno de los dos casos las diferencias con el cultivo control son estadísticamente significativas.

c. Comparación entre los subgrupos control/losartán y control/irbesartán

Las frecuencias medias de la variable BNMN observadas en los subgrupos control/losartán y control/irbesartán son $6,30 \pm 3,16$ y $5,75 \pm 2,67$, respectivamente.

Mediante el test de Wilcoxon para muestras dependientes no paramétricas, se comprueba que las diferencias entre las medias de los subgrupos control/losartán y control/irbesartán no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

En los subgrupos control/losartán y control/irbesartán, el NDI adquiere un valor de $1,75 \pm 0,11$ y $1,74 \pm 0,07$ respectivamente. Al contrastar estadísticamente los resultados obtenidos en ambos grupos mediante el test de Wilcoxon para muestras dependientes tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

La tabla 4.7. muestra los resultados del análisis estadístico.

	BNMN	NDI
<i>p</i>	0,321	0,940

Tabla 4.7. Resultados del análisis estadístico entre los subgrupos control/losartán y control/irbesartán.

Analizamos la variabilidad entre los dos tipos de fármacos ARB, ambos pertenecientes al grupo de bifeniltetrazoles, utilizados como terapia antihipertensiva en nuestro estudio para comprobar si alguno de los dos fármacos ejerce mayor efecto genotóxico que otro. Los resultados señalan que, no hay diferencia estadísticamente significativa en los valores de BNMN y NDI. Por lo que ambos ejercen el mismo posible efecto genotóxico.

4.2.3. Estudio de la influencia del sexo

Entre los posibles factores que pueden influenciar la frecuencia de la variable BNMN, se encuentra el sexo [38].

En nuestro estudio, la media de la variable BNMN en mujeres es más elevada que en hombres, tanto en el grupo control como en el grupo control/fármaco. En ambos grupos se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Respecto a la variable NDI, en el grupo control el valor del índice es mayor en el grupo masculino que el valor del índice en el grupo femenino ($1,74 \pm 0,03$ frente a $1,71 \pm 0,04$) pero no se constatan diferencias estadísticamente significativas. En el grupo control/fármaco sí hay diferencias estadísticamente significativas siendo mayor el valor de NDI en el grupo femenino ($1,78 \pm 0,11$) respecto al grupo

masculino ($1,71 \pm 0,04$).

Los resultados medios obtenidos para las variables BNMN y el índice NDI en el grupo control y el grupo control/fármaco en función del sexo se encuentran recogidos en la tabla 4.8.

		BNMN	NDI
Control	Hombre	$3,00 \pm 0,94$	$1,74 \pm 0,03$
	Mujer	$4,70 \pm 1,99$	$1,71 \pm 0,04$
Control/fármaco	Hombre	$4,80 \pm 2,04$	$1,71 \pm 0,04$
	Mujer	$7,25 \pm 3,78$	$1,78 \pm 0,11$

Tabla 4.8. Frecuencias medias de las variables analizadas en función del sexo en el grupo control y el grupo control/fármaco.

La tabla 4.9. muestra los resultados del análisis estadístico.

		BNMN	NDI
Control	<i>p</i>	0,002	0,132
Control/fármaco	<i>p</i>	0,006	0,012

Tabla 4.9. Resultados del análisis estadístico del efecto del sexo en el grupo control y el grupo control/fármaco.

En los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas mediante el ensayo de MN, es importante comprobar la influencia de factores de confusión como el género o la edad en la frecuencia de MN, ya que, podrían generar a un posible enmascaramiento de los resultados [39].

En relación a los resultados del efecto del sexo sobre la frecuencia de BNMN obtenidos en nuestra investigación, se observa una influencia significativa del sexo femenino. Esto ha sido evidenciado en otros estudios [38,39]. De hecho, se conoce que las mujeres a partir de los 20 – 30 años muestran una tasa de 1,5 micronúcleos superior frente al mismo parámetro en hombres.

Respecto al NDI no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos sexos en relación al grupo control pero en el grupo control/fármaco sí hay diferencias estadísticamente significativas, esto sugiere un efecto diferente de los fármacos sobre el ciclo celular en función del sexo. Según Surrallés *et al.* [45], esta influencia del género puede ser explicada por la acción preferencial de ciertas sustancias sobre el cromosoma X.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos se presentan las conclusiones más destacables del estudio.

- ◆ En el análisis *in vitro*, se observa un incremento en el número de células binucleadas con micronúcleos (BNMN). Ese incremento señala una posible capacidad genotóxica de los dos fármacos ARB estudiados *per se*.
- ◆ El sexo es un factor modulador de la frecuencia de BNMN en nuestro estudio; las mujeres muestran valores más altos que los hombres.

Son necesarios estudios *in vivo* para corroborar esta posible genotoxicidad ya que aunque los estudios *in vitro* son de gran validez para testar los efectos de un supuesto agente genotóxico en células humanas cultivadas; no reflejan la absorción, distribución y eliminación del compuesto a través del cuerpo humano, de manera que únicamente detectan el potencial intrínseco del fármaco.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. World Health Organization (WHO). A global brief on hypertension: Silent killer, global public health crisis. Ginebra;2013.
- [2]. Kearney P, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton P, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet*. 2005;365(9455):217-223.
- [3]. World Health Organization (WHO). Global health estimate summary tables: Projection of deaths by cause, age and sex. Ginebra; 2013.
- [4]. Banegas Banegas J. Epidemiología de la hipertensión arterial en España. Situación actual y perspectivas. *Hipertensión y Riesgo Vascular*. 2005;22(09):353-362.
- [5]. Departamento de Salud del Gobierno Vasco. Plan de salud de Euskadi 2013-2020. Vitoria; 2014 p. 36-37.
- [6]. Wilber J, Barrow J. Hypertension—A community problem. *The American Journal of Medicine*. 1972;52(5):653-663.
- [7]. Honorato Pérez J, Purroy Unanua A. Hipertensión arterial. León [Spain]: Editorial Everest; 2002.
- [8]. World Health Organization (WHO). The world health report. 2002 p. 57,88.
- [9]. Huerta Bengoa I. Evaluación de la capacidad genotóxica de fármacos antihipertensivos antagonistas de los receptores de la angiotensina II [Doctorado]. Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal. Universidad del País Vasco.; 2014.
- [10]. Tran T, Giang N. Changes in blood pressure classification, blood pressure goals and pharmacological treatment of essential hypertension in medical guidelines from 2003 to 2013. *IJC Metabolic & Endocrine*. 2014;2:1-10.
- [11]. Whelton S, Chin A, Xin X, He J. Effect of Aerobic Exercise on Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *Annals of Internal Medicine*. 2002;136(7):493-503.
- [12]. Xin X, He J, Frontini M, Ogden L, Motsamai O, Whelton P et al. Effects of alcohol reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension*. 2001;38:1112-1117.
- [13]. Akita S, Sacks F, Svetkey L, Conlin P, Kimura G. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH). *New England journal of medicine*. 2001;344(1):3-10.
- [14]. Rodríguez Martín C, Castaño Sánchez C, García Ortiz L, Recio Rodríguez J, Castaño Sánchez Y, Gómez Marcos M. Eficacia de una intervención educativa grupal sobre cambios en los estilos de vida en hipertensos en atención primaria: un ensayo clínico aleatorio. *Revista Española de Salud Pública*. 2009;83(3):441-452.

- [15]. B.Duran-Salgado M, F. Rubio-Guerra A. Lifestyle Changes and Surgical Treatment for Hypertension in the Elderly. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Cardiovascular & Hematological Agents)*,. 2014;12(3):174-186.
- [16]. Mancia G, Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G et al. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal*. 2007;28(12):1462-1536.
- [17]. Mancia G, Parati G, Borghi C, Ghironzi G, Andriani E, Marinelli L et al. Hypertension prevalence, awareness, control and association with metabolic abnormalities in the San Marino population: the SMOOTH study. *Journal of Hypertension*. 2006;24:837-843.
- [18]. Flórez J, Armijo J, Mediavilla A. *Farmacología humana*. Barcelona: Masson; 2008.
- [19]. López-Sendón, J., Swedberg, K, McMurray, J., Tamargo, J., Maggioni, A. P., Dargie, H., & Torp-Pedersen, C. Documento de Consenso de Expertos sobre bloqueadores de los receptores β -adrenérgicos. *Revista Española de Cardiología*. 2005;58(1):65-90.
- [20]. Mendoza Patiño N. *Farmacología médica*. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
- [21]. Morales Olivas F, Estañ Yago L. Conceptos nuevos sobre el sistema renina angiotensina. *Hipertensión y Riesgo Vascular*. 2010;27(5):211-217.
- [22]. García Donaire J. Diferencias y similitudes entre inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina y antagonistas de los receptores de la angiotensina II. *Hipertensión y Riesgo Vascular*. 2013;30:30-38.
- [23]. Hernández-Hernández R, Sosa-Canache B, Velasco M, Armas-Hernández M, Armas-Padilla M, Cammarata R. Angiotensin II receptor antagonists role in arterial hypertension. *J Hum Hypertens*. 2002;16:S93-S99.
- [24]. Sica D, Gehr T, Ghosh S. Clinical Pharmacokinetics of Losartan. *Clinical Pharmacokinetics*. 2005;44(8):797-814.
- [25]. Meredith P. Clinical Comparative Trials of Angiotensin II Type 1 (AT₁)-Receptor Blockers. *Blood Press*. 2001;10(3):11-17.
- [26]. Croom K, Curran M, Goa K, Perry C. Irbesartan. *Drugs*. 2004;64(9):999-1028.
- [27]. Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Delpón E. Características farmacológicas de los ARA-II. ¿Son todos iguales?. *Revista Española de Cardiología Suplementos*. 2006;6(3):10C-24C.
- [28]. Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: State of the art. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2007;210(3-4):201-228.
- [29]. Gil Hernández F. El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. Departamento de Medicina Legal y Toxicología Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

- [30]. Walker C, Hopkin S, Sibly R, Peakall D. Biomarkers: Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis. 1996:175-194.
- [31]. Brusick D. An assessment of the genetic toxicity of atrazine: Relevance to human health and environmental effects. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 1994;317(2):133-144.
- [32]. Terradas M, Martín M, Tusell L, Genescà A. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2010;705(1):60-67.
- [33]. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2005;28(2).
- [34]. Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, De Boeck M, Decordier I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2002;504(1-2):137-148.
- [35]. Surrallés J, Falck G, Norppa H. In vivo cytogenetic damage revealed by FISH analysis of micronuclei in uncultured human T lymphocytes. *Cytogenetic and Genome Research*. 1996;75(2-3):151-154.
- [36]. MacLean-Fletcher S. Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell*. 1980;20(2):329-341.
- [37]. Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 1985;147(1-2):29-36.
- [38]. Fenech M, Neville S, Rinaldi J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 1994;313(2-3):203-207.
- [39]. Fenech M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes—a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1998;404(1-2):155-165.
- [40]. Carrano A, Natarajan A. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1988;204(3):379-406.
- [41]. Brambilla G, Martelli A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2006;612(2):115-149.
- [42]. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1084-1104.
- [43]. Fenech M, Holland N, Chang W, Zeiger E, Bonassi S. The HUman MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1999;428(1-2):271-283.
-

[44]. Eastmond D, Tucker J. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1989;13(1):34-43.

[45]. Surrallés J, Natarajan A. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1997;392(1-2):165-174.

[46]. Ceppi M, Gallo F, Bonassi S. Study design and statistical analysis of data in human population studies with the micronucleus assay. *Mutagenesis*. 2010;26(1):247-252.