



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

10524  
34

**“ ESTUDIO GENOTÓXICO DE FENILCARBAMATOS EN  
CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS POR MEDIO DE  
FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS  
HERMANAS “**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

**MAYRA / HERNÁNDEZ PÁEZ**

ASESORA : Dra. SANDRA DÍAZ -BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2003

A

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR**  
**DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Estudio genotípico de fenilcarbamatos en cultivo de linfocitos humanos por medio de frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas".

que presenta la pasante: Mayra Hernández Pérez  
con número de cuenta: 9236290-0 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 1 de Abril de 2003

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	<u>[Signature]</u>
VOCAL	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	<u>[Signature]</u>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	<u>[Signature]</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Gabriela Ponce Anguiano</u>	<u>[Signature]</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Rosa Isela Alvarez González</u>	<u>[Signature]</u>

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

B

## *AGRADECIMIENTOS*

A la Dr. Sandra Díaz Barriga Arceo, por compartir sus conocimientos, por su tiempo, apoyo y consejos. Gracias por darme la oportunidad y ayudarme a cumplir uno de mis sueños más deseados.

A la UNAM por darme las armas para mejorar mi vida y con ellas crear mi futuro. Y por que se que mi espíritu y mi ser siempre hablaran por ella.

A la Q.F.B. Sara Hernández Matilde por sus consejos, ayuda y sobre todo por tu amistad. Sin ti no hubiera podido realizar esta tesis.

A mis profesores, por enriquecerme con sus conocimientos ; en especial al Dr. Enrique Ángeles, Rosalba Bonilla, Ma. Esther Revuelta, Isela Álvarez, Gerardo Cruz, Marco Antonio Vega, Luis Espino, Juan Manuel Acevez, Amparo Londoño, Tonatiuh Cruz, Patricia Campos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## *DEDICATORIAS*

A mis padres, por darme la libertad para crear mi vida. Gran parte de este logro es suyo.

Mamá, Rosa, gracias por enseñarme a tomar mis decisiones, y que nadie puede saber lo que me conviene, solo yo.

Papá, Enrique aunque a veces lo dudes, eres parte importante en mi vida y lo que soy ahora, ha sido gracias a tus cuidados y consejos.

A mi hermana Lucia, por ser la mejor hermana menor que Dios me pudo haber mandado.

A mi hermano Edgar, espero que siempre estemos juntos.

A Ricardo, porque has sido a cada paso lo mejor de lo vivido. Gracias por ser mi compañero, mi apoyo, pero sobre todo gracias por ser mi mejor amigo. TE AMO.

A Raulito y Severo, por ser esos ángeles sin alas que me mando Dios. Gracias por su amistad.

A mis compañeros de Generación 22ava: Mónica, Nadia, Adriana, Blanca, Nora, Lupita, Elsa, Toñito, Iván, Oscar, Leopoldo, Alejandro, Carlos, Raúl, Patlani, Fernando, Victor, Isaí, Hector B. Gracias por tantos momentos inolvidables y divertidos, enriqueciendo mi vida.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*LO QUE HE LOGRADO , NO LO HICE SOLA, HA SIDO JUNTO A GENTE QUE HA LLENADO MI VIDA, Y QUE CON SU PERSONALIDAD ME HA ENRIQUECIDO, LO LOGRE JUNTO A PERSONAS QUE AMO.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Citogenética L-521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo y con la asesoría de la Química Farmacéutica Bióloga Sara Hernández Matilde.

El diseño y la síntesis de los compuestos estudiados estuvo a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano del Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE

• Índice de tablas y figuras .....	2
• Resumen.....	3
I. Introducción	
I.1 Generalidades de los fenilcarbamatos.....	4
I.2 Genotoxicología.....	9
I.2.1 Importancia y estudio de los Intercambios de Cromátidas Hermanas.....	10
I.2.2 Formación y sistema de estudio de los ICH.....	13
II. Objetivos .....	18
III. Hipótesis .....	19
IV. Materiales y reactivos.....	20
V. Metodología.....	22
VI. Resultados.....	26
VII. Discusión.....	35
VIII. Conclusiones.....	39
IX. Referencias.....	40
• Glosario.....	44

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura No. 1: Estructura análoga de carbamatos bencimidazólicos y alquil 4-(R) fenilcarbamatos .....6
- Figura No. 2: Estructura de fenilcarbamato LQM996.....8
- Figura No. 3: Modelo de Painter para la formación del ICH .....15
- Figura No. 4: Intercambio de Cromátidas Hermanas en cromosomas de ratón.....17
- Figura No. 5: Cinética de proliferación celular de LQM211, LQM996 y MTZ.....31
- Figura No. 6: Índice de replicación de LQM211, LQM996 y MTZ.....32
- Figura No. 7: Índice mitótico de LQM211, LQM996 y MTZ.....33
- Figura No. 8: Número de ICH de LQM211, LQM996 y MTZ.....34

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla No. 1: Concentraciones utilizadas en el cultivo de linfocitos.....23
- Tabla No. 2: Cinética de proliferación celular de LQM211, LQM996 y MTZ.....28
- Tabla No. 3: Índice mitótico de LQM211, LQM996 y MTZ.....29
- Tabla No. 4: Frecuencia de ICH de LQM211, LQM996 y MTZ.....30

## **R E S U M E N**

Algunos compuestos de la familia de los fenilcarbamatos que recientemente se han sintetizado en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, han demostrado una acción antimicrobiana de amplio espectro, y presentan acción antiparasitaria, especialmente contra *Hymenolepis nana* y *Giardia lamblia*. Esto aunado a que presentan baja toxicidad los convierte en posibles agentes terapéuticos. Es por ello que en el presente estudio se evalúa el potencial genotóxico de los carbamatos LQM996 y LQM211, mediante el ensayo de Intercambio de Cromátidas Hermanas.

Se trataron cultivos de linfocitos humanos con los compuestos LQM996 y LQM211 a las concentraciones de 25, 75 y 150  $\mu\text{g/ml}$ , utilizando metronidazol a las mismas concentraciones como comparativo.

Por los resultados obtenidos mediante el estudio de ICH, los fenilcarbamatos LQM996 y LQM211 se perfilan como medicamentos de elección, debido a que no produjeron efectos citotóxicos ni genotóxicos, a las concentraciones evaluadas de 25, 75 y 150  $\mu\text{g/ml}$ ; lo que les da ventaja sobre el metronidazol, que fue el medicamento comparativo y que presenta un marcado efecto, tanto citotóxico como genotóxico.

# I. INTRODUCCIÓN.

## I.1. GENERALIDADES DE LOS FENILCARBAMATOS

Los carbamatos son ésteres o sales del ácido carbámico (ácido aminometanoico) que presenta la fórmula general  $H_2NCOOR$  (Katsung, 1990).

Los carbamatos son insecticidas efectivos en virtud de su habilidad para inhibir la acetilcolinesterasa en el sistema nervioso, esto mediante la competencia del sitio activo. La carbamitación de la enzima es inestable y la regeneración de ésta es relativamente rápida comparada con el efecto de fosforilación producida por los insecticidas órgano fosforados.

La acetilcolina es hidrolizada a ácido acético y colina por acción de la acetilcolinesterasa, una serina del sitio activo reacciona con el grupo acetilo para formar un intermediario ligado a la enzima (Lodish y col., 2002). La acetilcolinesterasa, por lo tanto es un mediador sináptico de los impulsos nerviosos en mamíferos e insectos; por lo que una sobredosis de carbamatos produce constricción de las pupilas de los ojos, debilidad y espasmos musculares, falla respiratoria, baja en la presión sanguínea e inclusive paro cardíaco. Las convulsiones pueden ser de rigidez de los miembros o dar rápidos movimientos involuntarios (Ganong, 1984).

La toxicidad aguda de los diferentes carbamatos va desde un alta toxicidad hasta sólo ligera o prácticamente no tóxicos. La dosis  $DL_{50}$  reportada para la rata es de un rango mínimo de 1 mg/kg hasta por encima de 5000 mg / kg. Para ciertos metilcarbamatos la  $DL_{50}$  es 20 veces o más la correspondiente dosis efectiva cincuenta, existe una relación dosis efecto, entre la severidad de los síntomas y el grado de inhibición de la colinesterasa (Márquez, 2003).

Los **fenilcarbamatos** son un grupo pequeño de fungicidas, herbicidas e insecticidas. El desarrollo de esta clase de compuestos fue iniciada por el descubrimiento de algunos herbicidas N-fenilcarbamatos, quienes presentan actividad antimicótica, especialmente contra algunas cepas del hongo *Botrytis cinerea* que es una de las enfermedades más dañinas de los viñedos, las cuales son resistentes a los bencimidazoles. Con los N-fenilcarbamatos se pretende en la actualidad, reducir la fototoxicidad y la resistencia a los bencimidazoles que presentan estas cepas. Estos compuestos actúan inhibiendo la mitosis celular (Roberts y Hutson, 1999).

Los herbicidas carbámicos, N-fenilcarbamato de isopropilo, N-clorofenilcarbamato de isopropilo y Barba (N-clorofenilcarbamato de clorobutinilo), son útiles en la determinación del número y morfología de los cromosomas en los ápices de las raíces de diversas especies debido a que contraen mejor a los cromosomas logrando una mejor separación de éstos (Márquez, 2003).

Algunos compuestos de la familia de los fenilcarbamatos han sido sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, bajo la dirección del Dr. Enrique Ángeles Anguiano, los cuales han demostrado una acción antiparasitaria y antibacteriana, convirtiéndolos en posibles agentes terapéuticos.

Se obtuvo un grupo de derivados carbámicos a los cuales se les realizó el estudio teórico de la influencia de ciertos sustituyentes presentes en la estructura base; encontrando gran similitud con los compuestos bencimidazólicos, los cálculos sugirieron la posible efectividad en la actividad biológica deseada (Ángeles y col., 2000).

Se cree que los alquil 4-(R)-fenilcarbamatos presentan una similar actividad antihelmíntica comparada con los bencimidazoles, debido a que ambos presentan estructuras análogas, como se observa en la figura 1. La actividad antihelmíntica de los bencimidazoles parece estar relacionada a su acción antimicótica selectiva, debido a la preferencia de estos agentes por enlaces a la tubulina de los helmintos (Ángeles y col., 2000)

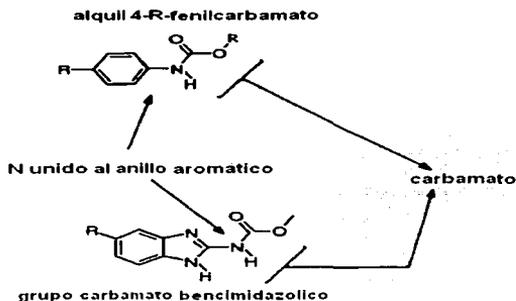


Figura 1. Estructura análoga de carbamatos bencimidazólicos y alquil 4-(R) fenilcarbamatos (Ángeles y col., 2000).

Se realizó una investigación en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la asesoría del M.V.Z. Pablo Martínez Labat utilizando como modelo *Hymenolepis nana* en ratones CD1. Los resultados mostraron que los compuestos probados a dosis de 5, 10 y 50 mg/kg, presentaron una eficacia de entre el 85 al 95% de actividad antiparasitaria, siendo muy similar

esta respuesta con respecto al medicamento praziquantel (sustancia utilizada como referencia), además a través de observaciones utilizando microscopía electrónica se evidenció la desaparición de las microvellosidades que recubren los proglótidos de los parásitos afectando su nutrición (Minero, 1997). Además se evaluaron *in vitro* algunos derivados carbámicos contra *Giardia lamblia*, determinándose concentraciones efectivas entre 18.16 y 181.6 µg/ml (Márquez, 2003).

Bajo la dirección de la M. en C. Stella Reginesi en el laboratorio de Microbiología Industrial de Posgrado de la FES-C UNAM, se empleó la técnica de difusión en caja, utilizando sensidiscos impregnados con 200 µg de los derivados carbámicos y 18 cepas provenientes de aislamientos clínicos pertenecientes a colecciones (ATCC), varias de las cuales son agentes infecciosos gastrointestinales. Los resultados mostraron que los compuestos poseen una actividad antibacteriana contra 13 géneros de bacterias Gram negativas, siendo el género más sensible el de *Vibrio* (Bernal, 2000).

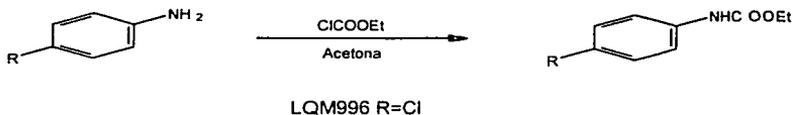
Por otra parte en el laboratorio del Dr. Andrés Romero Rojas en la FES-C UNAM se realizó la determinación de actividad antibacteriana de los derivados carbámicos contra *Helicobacter pylori in vitro*, mediante los métodos de Kirby Bauer y de dilución en agar. Nueve compuestos mostraron actividad inhibitoria en diferentes grados y su concentración media de inhibición (CMI) fue de 12.33 a 14 mm de diámetro. El compuesto LQM996 obtuvo un CMI de 32 mg/ml.

En cuanto a su mutagenicidad, se aplicó la prueba de revertentes en *S. typhimurium* donde se realizaron dos métodos, el de incubación y preincubación recomendados por Maron y Ames; encontrándose que los derivados carbámicos no fueron mutagénicos a concentraciones mayores de 250 µg lo que muestra una gran ventaja con respecto al metronidazol que es mutagénico en concentraciones expresadas en nanogramos (Márquez, 2003).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Actualmente, esta en proceso el registro de la patente de los nuevos derivados carbámicos en especial del compuesto que ha resultado hasta el momento con mejores resultados en las diferentes pruebas, siendo este el LQM996 (Figura 2) patente en trámite UNAM No: RPG/ 11186 (Dic. 2000) como antibiótico de amplio espectro contra *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*; y para parásitos como *Hymenolepis nana* y hongos (género *Tricophyllum*) (Márquez, 2003).

Es por estas razones, que se analizaron los compuestos LQM996 y un fenilcarbamato de tercera generación el LQM211, para evaluar su potencial genotóxico, comparándolo con metronidazol.



**Figura 2. Estructura del fenilcarbamato LQM996 (p-cloro fenilcarbamato de etilo)**

## **1.2 GENOTOXICOLOGÍA**

Cada día crece el número de compuestos químicos o de agentes capaces de inducir cambios en el material genético. La razón fundamental de este incremento es que en la actualidad se ha difundido el empleo de sustancias químicas para el control de plagas y el enriquecimiento de los suelos, el uso de numerosos agentes para preservar los alimentos, la exposición ocupacional a sustancias nocivas, el impresionante desarrollo de la química y la farmacología que ofrecen casi dos medicamentos nuevos al día. Existen aproximadamente 25,000 compuestos de uso común que se distribuyen libremente y que tienen propiedades mutagénicas y algunos pueden inducir cáncer (Salamanca, 1990).

Los agentes mutagénicos son de distinta naturaleza y pueden corresponder a agentes físicos como la luz ultravioleta y las radiaciones, a agentes biológicos como los virus o a un gran número de sustancias químicas entre las que se incluyen drogas empleadas en el armamento terapéutico (Salamanca, 1990).

Antes de que un nuevo compuesto pueda ser empleado en la terapéutica tiene que estudiarse desde el punto de vista farmacológico para saber si el compuesto tiene propiedades curativas o alivia un síntoma y segundo, que no produzca daño a la persona que lo recibe. En primer lugar se hace la demostración de la actividad del fármaco y después la seguridad de que éste no produzca efectos nocivos (Bondani, 1991).

Dentro de los estudios que evalúan los potenciales efectos nocivos está el genotóxico, que se encarga de investigar el daño producido al material genético (ADN) causado por diversas sustancias a las que estamos expuestos constantemente. El daño puede presentarse a nivel cromosómico, por ejemplo en forma de Intercambio de Cromátidas Hermanas (Álvarez, 1997).

El método del ICH es recomendado para detectar mutagenicidad por parte de la Comunidad Económica Europea y la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (Kliesch y col., 1982). Mientras que el Comité de Genética Toxicológica de los EE.UU. lo ha incluido como sistema de prueba para detectar daño genético por diversos agentes (Morales, 1988).

### **I.2.1 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS**

Los cultivos de células *in vitro* o la observación directa de células provenientes de médula ósea, así como el estudio de los espermatozoides, permiten valorar, mediante el estudio del cariotipo, los efectos mutagénicos ocasionados sobre los cromosomas y constituyen una valiosa herramienta que la citogenética ha aportado, principalmente en los últimos años, para la detección de los efectos genotóxicos. Esta herramienta se ha perfeccionado con el desarrollo de la técnica del Intercambio de Cromátidas Hermanas que logra una valoración más objetiva del daño cromosómico (Salamanca, 1990)

Con respecto a la investigación de los ICH se puede decir, que se utiliza como una prueba a corto plazo para estudiar tanto a los agentes mutagénicos como a los carcinogénicos. El análisis del Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) es una técnica que sirve para medir el impacto de agentes mutágenos como carcinógenos sobre los cromosomas, y evaluar el daño al DNA mediante el incremento en la frecuencia de ICH (Latt y col., 1979).

Aunque todavía no se conoce el significado biológico de los ICH el hecho de que se han observado en las células de todos los organismos estudiados sugiere que estos son un fenómeno o la expresión de un fenómeno común y fundamental para la célula. Por otro lado, es posible que el fenómeno de los ICH sea la consecuencia de un proceso que permite a la célula dividirse, aún en presencia de lesiones en su ADN; de ser así, pudiera haber una correlación entre el fenómeno y la mutación (Carrano y col., 1978). Cabe mencionar que el Síndrome de Bloom, entidad autosómica recesiva, con predisposición al cáncer y con fragilidad cromosómica, presenta una frecuencia de intercambios de 15 a 20 veces mayor que la considerada normal, lo cual constituye un nexo particular entre las mutaciones génicas, el fenómeno de transformación neoplásica y el comportamiento cromosómico (Salamanca, 1990).

No fue sino hasta la introducción de la técnica dependiente de BrdU de Latt cuando los ICH fueron ampliamente considerados como un indicador de potencialidad genética y carcinogénica. De hecho, los ICH son un método de mayor sensibilidad para la detección de muchos mutágenos químicos en comparación con las aberraciones cromosómicas: de acuerdo con Latt la sensibilidad de la prueba de ICH es aproximadamente 100 veces mayor que la prueba estándar de aberraciones cromosómicas (Latt y col., 1979). Este interés en los ICH como una alternativa genotóxica fue iniciada por el estudio extensivo a cargo de Perry y Evans en 1975. Actualmente hay evidencia de que para muchos agentes químicos, el estudio de los ICH proporciona el índice más sensibles para detectar el daño genético porque se ha encontrado que existe una correlación entre la frecuencia de ICH y la dosis del mutágeno (Perry y Wolff, 1974).

El ICH muestra gran sensibilidad cuando se emplean agentes alquilantes, ya que se requieren concentraciones más bajas de estas sustancias para inducir el intercambio que para producir el efecto clastogénico. No sucede así, sin embargo, con todos los agentes mutagénicos.

Los inductores potentes son aquellos que inducen una frecuencia de ICH cinco veces mayor que el valor considerado como normal; los moderados, los que incrementan al doble; y los débiles, aquellos que inducen menos que el doble, pero resultan significativos cuando se comparan con los valores normales (Salamanca, 1990).

Esta técnica también puede ser utilizada en el laboratorio clínico para monitorear el daño cromosómico en pacientes que son sometidos a quimioterapia con fármacos clastógenos (Latt y col., 1979), debido a que se ha encontrado incremento en la frecuencia de ICH en las personas que consumen medicamentos; también es útil para detectar genotoxicidad en medicamentos durante su etapa de investigación (Waksvik y col., 1981).

La diferenciación de cromátidas hermanas permite, además de evaluar el potencial genotóxico de diversos compuestos, establecer la cinética de proliferación celular, debido a la diferenciación del patrón de tinción de las metafases. Así, las metafases de primera división se observan oscuras, las metafases de segunda división aparecen con una cromátida clara y otra oscura, y las de tercera división son claras. La cinética de proliferación celular, puede ser modificada en presencia de ciertos compuestos que retardan el ciclo celular, es decir, que a mayor concentración de estos compuestos existe un mayor número de metafases de primera división y menor número de segunda división y por lo tanto pocas células llegan a la tercera división celular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **I.2.2 FORMACIÓN Y SISTEMA DE ESTUDIO DE LOS ICH**

Se puede establecer de manera sencilla que los intercambios de cromátidas hermanas son, como su nombre lo indica intercambios de segmentos homólogos o casi homólogos, simétricos y equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma (Morales, 1988) .

Desde un punto de vista molecular, los ICH consisten en un intercambio de doble cadena entre las moléculas de ADN de las cromátidas hermanas; esto ha dado lugar a que se propongan modelos que expliquen como ocurre el fenómeno, basados fundamentalmente en los modelos de recombinación bacteriana (Morales, 1988).

Aunque el mecanismo de formación del ICH aún no es conocido, existe un modelo que asegura que es un efecto de la reparación del ADN durante la post-replicación. Se sugiere que el ICH se forma probablemente en ciertas regiones del ADN, particularmente en los sitios dañados (Krishna y col.,1988). Por otra parte hay una teoría que es la más aceptada, fue hecha por Painter en 1980 (figura 3), donde dice que este fenómeno ocurre al replicarse el ADN, ya que se forman dos cadenas nuevas de ADN entre las cuales existen intercambios de fragmentos homólogos, presumiblemente involucra rompimientos de ADN para su posterior reunión (Morales, 1988), (Tucker y col., 1993). Esto se basa en que durante la fase "S" del ciclo celular, cuando ocurre la replicación del ADN, es el momento en que surge la formación del ICH, ya que al irradiar luz U.V. se potencializa la

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

formación del ICH durante la mitad de la fase "S". Se dice que las enzimas topoisomerasas participan en la formación, ya que las topoisomerasas I y II despiralizan al ADN en el momento de replicarse, además, la topoisomerasa II es capaz de inducir rompimientos de cadena doble de ADN, para posteriormente reunirse de manera intercambiada. Esto se sustenta al usar novobiocina que inhibe la acción de la topoisomerasa II disminuyendo la formación de ICH (Perry y Wolf, 1974).

Al inicio de la década de los 70, se desarrolló una metodología que permite la tinción diferencial de las cromátidas. El procedimiento consiste en adicionar al medio de cultivo, 24 horas después de la siembra, una base análoga de 5 - bromodeoxiuridina (5 - BrdU), la cual es incorporada en las células en lugar de la timina. Aquellas cromátidas que difieran en el número de cadenas de ADN que han sido sustituidas por BrdU pueden distinguirse fácilmente si los cromosomas se ponen en contacto con un compuesto derivado del bencimidazol, el colorante 33258 de Hoechst, que tiñe el ADN normal pero no aquel cuyas dos cadenas han sido sustituidas por BrdU (Salamanca, 1990). Por lo tanto, el resultado en metafases de células en primera división serán cromosomas donde sus cromátidas contengan una cadena doble unisustituida de ADN (una cadena sencilla normal unida a su respectiva cadena sencilla sustituida con BrdU); mientras en metafases de células en segunda división resultarán cromosomas donde una de sus dos cromátidas contendrá ADN unisustituido y en la otra estará su cadena doble sustituida por la BrdU (González, 1997). Posteriormente el complejo formado con la BrdU y el colorante Hoechst 33258, es removido al contacto con la luz ultravioleta mediante un proceso de fotólisis resultando huecos

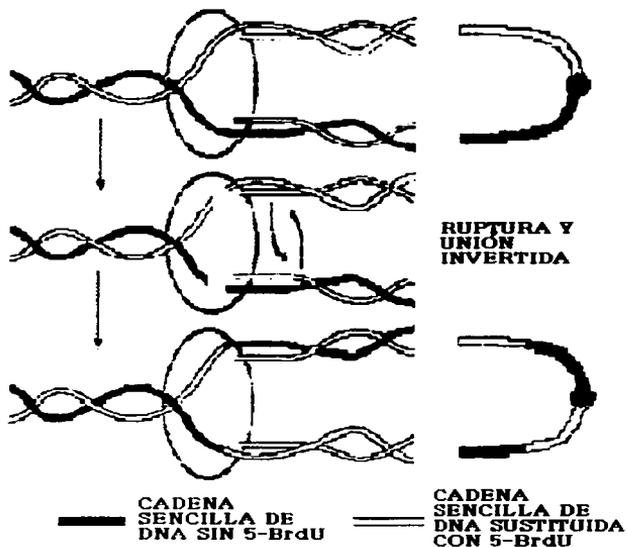


Figura 3. MODELO DE PAINTER PARA LA FORMACIÓN DEL ICH (González, 1997).

en el ADN, para lo que sus cargas son estabilizadas con una solución salina de citratos, y finalmente se realiza la tinción con Giemsa donde el colorante se fija mayormente a la cromátida con mayor densidad, o bien, en la cromátida que contenía menos BrdU .Como puede apreciarse en la figura 4, el resultado es que una cromátida aparece teñida en oscuro y la otra en claro, ofreciendo las cromátidas el aspecto de arlequines después de dos ciclos de replicación celular (Salamanca, 1990).

Las células metafásicas se obtienen de muestras que contengan células en división, o algunas de cultivos donde se inducen químicamente para dividirse *in vitro*. Las muestras que contienen células en proliferación espontánea incluyen la médula ósea, nódulos linfáticos, tumores. Los linfocitos obtenidos por punción, la biopsia de tejidos y muestras de fluido amniótico pueden ser cultivados *in vitro* (Gersen y Keagle, 2000).

Las células que se estudian son los linfocitos, dado que los eritrocitos han perdido su núcleo y por lo mismo no tienen cromosomas. En condiciones normales, los linfocitos no se multiplican en sangre periférica. Sin embargo, *in vitro*, se logra su transformación blástica y, por consiguiente, su división celular, adicionando al medio de cultivo un agente mitogénico, siendo el más empleado, la fitohemaglutinina, obtenida de un extracto de *Phaseolus vulgaris* (frijol). Este agente induce la transformación de linfocitos a linfoblastos, estimula la síntesis de ARN una hora después de su adición al medio de cultivo y de ADN 24 horas después; actuando sobre la membrana celular produce leucoaglutinación. Las células estimuladas con la fitohemaglutinina se mantienen en un medio de cultivo enriquecido con proteínas, aminoácidos y vitaminas a 37 °C por 72 horas.

Para detener a las células en el estadio de metafase de la división celular, se añade colchicina, sustancia que impide la formación el huso acromático. Las preparaciones deben tener una adecuada dispersión de los cromosomas, esto se logra con el uso de soluciones hipotónicas, como solución de citrato de sodio al 0.07% o de cloruro de potasio 0.075 M. Los cromosomas deben ser fijados y esto se logra con una solución de Carnoy preparada con metanol y ácido acético en una proporción 3:1; finalmente, para ser observados bajo el microscopio, los cromosomas se tiñen con Giemsa (Salamanca, 1990).

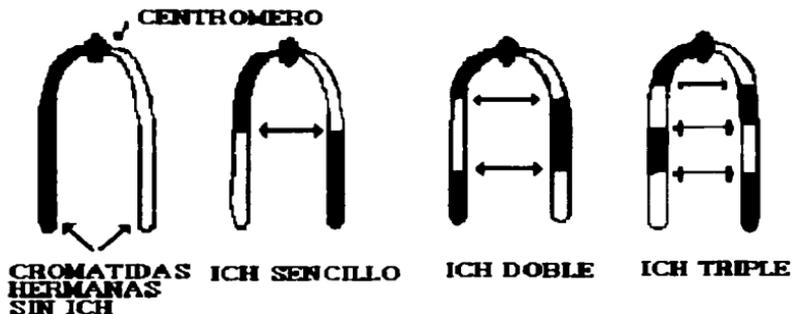


Figura 4. Intercambio de Cromátidas Hermanas en cromosomas de ratón (González, 1997).

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL.**

- 2.1.1** Determinar la capacidad genotóxica y citotóxica de los fenilcarbarnatos LQM996 y LQM211 evaluando la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas y la cinética de proliferación celular en cultivo de linfocitos humanos con la finalidad de sugerir o no su utilización como principios activos.

### **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 2.2.1** Cuantificar la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas en metafases de linfocitos humanos inducidos por diferentes concentraciones de los compuestos LQM996, LQM211 y metronidazol, para evaluar su acción genotóxica y compararlas.
- 2.2.2** Evaluar la citotoxicidad de los compuestos LQM996, LQM211 y el metronidazol, a través de la determinación del índice mitótico y del índice de replicación para establecer cual es su efecto sobre el ciclo celular.

### **III. HIPOTESIS**

Si los fenilcarbamatos LQM996 y LQM211, son mutagénicos y/o carcinogénicos, entonces el número de Intercambio de Cromátidas Hermanas se verá afectado, así como la cinética de proliferación de los linfocitos.

## **IV. MATERIALES Y REACTIVOS**

### **a) MATERIAL Y EQUIPOS**

- Tubos de punta cónica estériles
- Jeringas estériles de 5 y 10 ml
- Frascos ámbar con tapón de rosca de 5 ml estériles
- Pipetas pasteur
- Pipetas de 10 ml
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Centrifuga clínica de 3500 rpm
- Incubadora bacteriológica (Blue M)
- Lámpara de luz U.V.
- Estufa HDP-433 (Proveedor científico, S.A.)
- Vórtex (Super – mixer 1290)

### **b) REACTIVOS**

- Medio de cultivo para linfocitos Mc. Coy 5ª con L-Glutamina (In vitro, s.a.)
- Bicarbonato de sodio al 4.4% para uso en cultivo de tejidos pH 7.3-7.5 (In vitro, s.a.)
- Fitohemaglutinina
- Sangre periférica de una donadora sana
- Colchicina
- KCl grado analítico (Merck)
- Metanol 99.9% (J.T.Baker)
- Acido acético glacial (Merck)
- 5 – BrdU (Sigma)
- Citrato trisódico grado analítico (Merck)
- Cloruro de sodio 99.8 % (J.T.Baker)

- Fosfato de sodio 99.8% (Fermont)
- Colorante de Hoechst 33258 (Seelze – Hannover)
- Colorante Giemsa tipo Azure A (Sigma)
- Heparina (Elkins – Sinn)
- Compuestos LQM211, LQM996 y metronidazol fueron proporcionados por el Laboratorio de Química Medicinal

### **c) SOLUCIONES**

Solución de 5-BrdU a una concentración de 18µg/ml

Solución de KCl 0.075M

Solución de metanol/ ácido acético 3:1 (solución fijadora)

Solución salina de citratos (citrato trisódico 0.03M, NaCl 0.3M)

Solución stock de Hoechst  $1.0 \times 10^{-4}$

Solución de trabajo de Hoechst : 1 ml sln stock + 9 ml agua + 10 ml buffer de diferenciación.

Buffer de citrato / fosfato pH =7 dilución 1:1 (buffer de diferenciación)

Buffer de fosfatos pH = 6.8

Fitohemaglutinina dilución 1:15

Colchicina 0.04%

## V. METODOLOGÍA.

### a) SIEMBRA DE LINFOCITOS

Adicionar a un frasco de 100ml de medio de cultivo, 4 ml de bicarbonato de sodio al 4.4% y 4 ml de fitohemaglutinina dil. 1:15

A cada frasco de punta cónica estéril, colocar 7.5 ml de medio de cultivo y 10 gotas de sangre, obtenida por punción y con heparina como anticoagulante.  
Incubar a 37 °C por 24 horas

Agregar los compuestos LQM211, LQM996 y MTZ, previamente solubilizados y esterilizados por filtración, de acuerdo a la tabla 1 más 45 µl de 5-BrdU  
Incubar hasta 70 horas a 37 °C

Agregar 1 gota de colchicina al 0.04%.  
Completar hasta 72 horas de incubación y realizar la cosecha

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 1. Concentraciones utilizadas en el cultivo de linfocitos**

<b>COMPUESTO</b>	<b>CONCENTRACION</b>	<p><b>LOS COMPUESTOS LQM996, LQM211 Y EL METRONIDAZOL FUERON DISUELTOS CON DMSO / H<sub>2</sub>O / ETOH (50%) EN UNA PROPORCION 2:1:1</b></p>
Agua destilada (Ctrl. Neg)		
DMSO / H <sub>2</sub> O / EtOH (50%) (Blanco)	2:1:1	
LQM 996	25 µg/ml	
LQM 996	75 µg/ml	
LQM 996	150 µg/ml	
LQM 211	25 µg/ml	
LQM 211	75 µg/ml	
LQM 211	150 µg/ml	
METRONIDAZOL	25 µg/ml	
METRONIDAZOL	75 µg/ml	
METRONIDAZOL	150 µg/ml	

## b) COSECHA DE LINFOCITOS

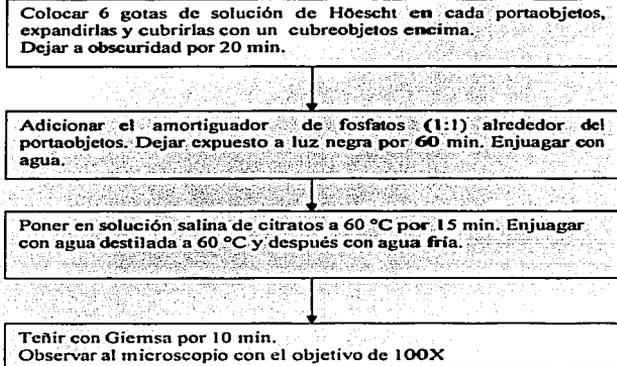
Centrifugar a 1500 rpm por 10 min. Retirar sobrenadante y adicionar 8 ml de KCl a 37 °C, resuspender e incubar a 37 °C por 20 min.

Centrifugar por 5 min. A 3000 rpm, resuspender el paquete.  
Agregar con agitación lentamente 8 ml de solución fijadora fría. Dejar actuar 30 min. a temperatura ambiente

Repetir 2 veces la fijación por 15 min. A la tercera fijación centrifugar por 5 min. y hacer una suspensión celular adecuada.

Dejar caer 3 gotas de la suspensión celular en un portaobjetos fríos y desengrasados. Flamear rápidamente.  
Realizar la tinción diferencial.

### c) TINCIÓN DIFERENCIAL



Por cada frasco de cultivo se determinará:

- Frecuencia de ICH: Se contaron los intercambios de cromátidas hermanas en un total de 25 metafases en segunda división, por cada concentración de cada uno de los compuestos y controles.
- Índice mitótico: Se contó el número de células que se encuentran en etapa de metafase por cada 1000 células para cada una de las concentraciones utilizadas de los compuestos y controles.
- Cinética de proliferación celular: Se contó el número de metafases en primera, segunda y tercera división en 100 metafases de cada concentración. El índice de replicación se calculo con la fórmula:

$$\frac{1(\% \text{ metafases } 1^*) + 2(\% \text{ metafases } 2^*) + 3(\% \text{ metafases } 3^*)}{100}$$

100

## VI. RESULTADOS

La cinética de proliferación celular nos permitió evaluar el impacto sobre el ciclo celular de los compuestos LQM996, LQM211 y metronidazol; los resultados se muestran en la tabla 2, donde se observa que los promedios de las metafases de primera división de los carbamatos LQM996 y LQM211 no varía con respecto al valor del control negativo que fue de 59.5, lo que se aprecia claramente en la figura 5. Se observa además, en el caso del metronidazol, que hay un aumento en las metafases de primera división, de hasta un promedio de 71 metafases a la concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$ . En el caso de las metafases de segunda división, los promedios obtenidos son muy similares al comparar el control negativo con los compuestos analizados, el LQM996, LQM211 y el metronidazol. No así con las metafases de tercera división, donde hay una disminución de la mitad de las metafases en tercera división con metronidazol, debido a que la mayoría de las metafases encontradas no pasaron de la primera división. En el caso de los carbamatos LQM996 y LQM211 no hay un cambio significativo en el promedio de las metafases en tercera división, respecto al control negativo, ni al compararlos entre ellos. Este comportamiento se hace evidente en la figura 5.

Estas variaciones afectan el cálculo del índice de replicación, que solamente se ve disminuido en los cultivos tratados con metronidazol, lo que indica que éste presentó un impacto en la cinética de proliferación celular, a comparación de los carbamatos, cuyos valores permaneces cercanos a los obtenidos con el control negativo. Estas diferencias significativas se pueden observar en la figura 6.

Los resultados que se muestran en la tabla 3 corresponden al índice mitótico, que es otro de los parámetros que nos permitió evaluar el impacto sobre el ciclo celular. No se observan efectos del compuesto LQM996 en el índice mitótico de los cultivos de linfocitos a ninguna concentración al compararlos con el control negativo. Hay una disminución significativa en la frecuencia de mitosis ( $P < 0.05$ ) solo con la concentración más alta del compuesto LQM211, el valor de las otras dos concentraciones es muy similar al reportado para el control negativo que es de 18.5. En el caso del metronidazol, la disminución es mayor ( $P < 0.001$ ) a todas las concentraciones, llegando a un índice mitótico de 7, lo que se puede observar de manera más clara en la figura 7, donde las barras del LQM211 a la concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$  y las tres concentraciones del metronidazol, se aprecian más pequeñas que las barras correspondientes a las demás concentraciones.

En la tabla 4 se muestra la frecuencia de ICH obtenida para el control negativo que fue de 2.4 intercambios por metafase, lo cuál se tomó como parámetro basal y así se pudo comparar el número de intercambios provocados por los compuestos analizados. Con el carbamato LQM996, el promedio de ICH fue de 3.3, indicando que no hay un aumento significativo. Tampoco se observa un aumento con el compuesto LQM211 cuyos valores van desde 2.9 a 3.8 intercambios por metafase. En cambio con el metronidazol se observó un aumento estadísticamente significativo, llegando hasta 6.6 intercambios por metafase. En la figura 8, las barras correspondientes al metronidazol se ven aumentadas, concordando con lo expuesto anteriormente.

**Tabla 2. Cinética de proliferación celular de LQM211, LQM996 y MTZ**

COMPUESTO	CONC.	M1	M2	M3	I.R.	DESVES
CTRL NEG		59.5	27	13.5	1.5	23.65
BCO		61.5	25	13.5	1.5	25.06
LQM 211	25 µg/ml	62.5	25	12.5	1.5	26.02
LQM 211	75 µg/ml	55	32.5	12.5	1.6	21.26
LQM 211	150 µg/ml	57.5	33	9.5	1.5	24.01
LQM 996	25 µg/ml	57	33	10	1.6	23.51
LQM 996	75 µg/ml	55	33	12	1.6	21.51
LQM 996	150 µg/ml	59.5	30.5	10	1.5	24.87
MTZ	25 µg/ml	71	25	6.5	1.3	33.21*
MTZ	75 µg/ml	68.5	25	6.5	1.4	30.76*
MTZ	150 µg/ml	70	25	5	1.3	33.29*
<b>Índice de replicación (I.R.) = 1(% met 1a) + 2(% met 2a) + 3(% met 3a) / 100</b>						

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control neg con la prueba de  $\chi^2$ :  $\alpha=0.05$   $gl=2$

**TABLA 3. Índice mitótico de LQM211, LQM 996 y MTZ**

COMPUESTO	CONC	I.M		MEDIA	DESVES
CTRL NEG BLANCO		20	17	18.5	2.12
		21	22	21.5	0.71
LQM 211	25 µg/ml	20	18	19	1.41
LQM 211	75 µg/ml	15	13	14	1.41
LQM 211	150 µg/ml	9	11	10*	1.41
LQM 996	25 µg/ml	27	24	25.5	2.12
LQM 996	75 µg/ml	23	18	20.5	3.54
LQM 996	150 µg/ml	16	16	16	0
MTZ	25 µg/ml	6	8	7*	1.41
MTZ	75 µg/ml	5	6	5.5*	0.71
MTZ	150 µg/ml	5	9	7*	2.83

I. M = # metafases / 1000 células

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control neg con la prueba de Tukey  $p < 0.05$

**TABLA 4. Frecuencia de ICH de LQM211, LQM996 y MTZ**

COMPUESTO	CONCENTRACION	#ICH	DESVEST
CTRL NEG		2.4	0.28
BCO		3.5	0.25
LQM 211	25 µg/ml	2.9	0.25
LQM 211	75 µg/ml	3.8	0.57
LQM 211	150 µg/ml	3.5	0.62
LQM 996	25 µg/ml	3.3	0.62
LQM 996	75 µg/ml	3.3	0.59
LQM 996	150 µg/ml	3.6	0
MTZ	25 µg/ml	5.1	1.27 **
MTZ	75 µg/ml	6.6	0.48 **
MTZ	150 µg/ml	6.6	0.06 **

# ICH / 25 metafases

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo con la prueba de Tukey  $p < 0.05$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

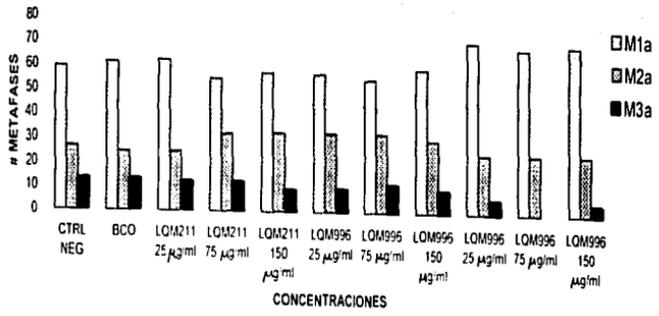
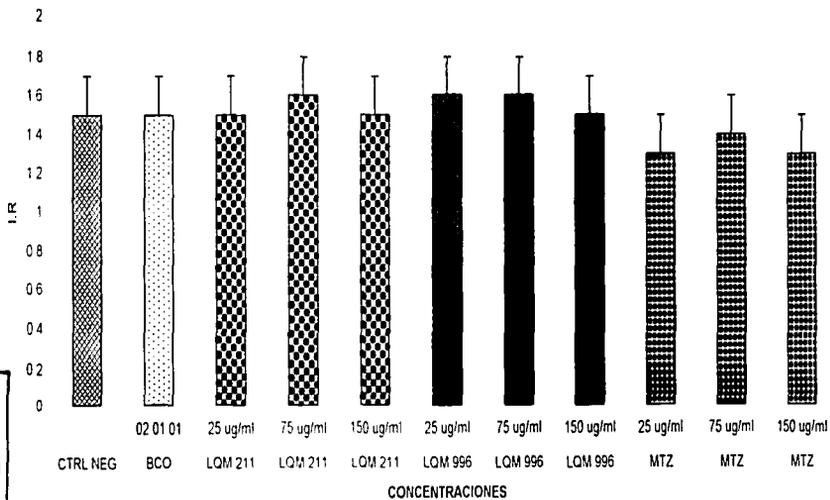


Figura 5. Cinética de proliferación celular de LQM211, LQM996 y MTZ



**Figura 6. Índice de replicación de LQM211, LQM996 y MTZ**

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

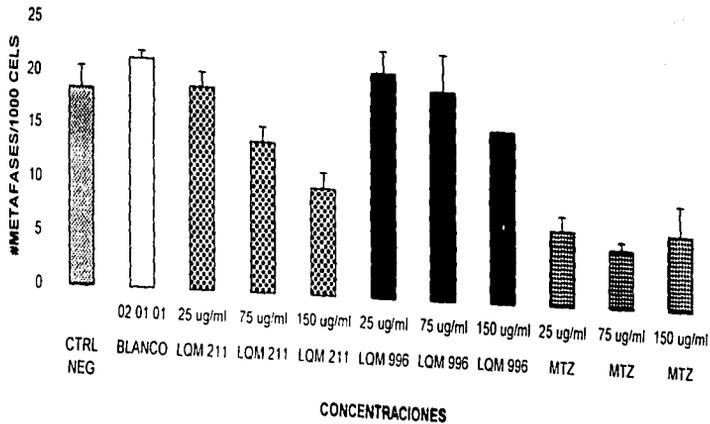


Figura 7. Índice mitótico de LQM211, LQM996 y MTZ

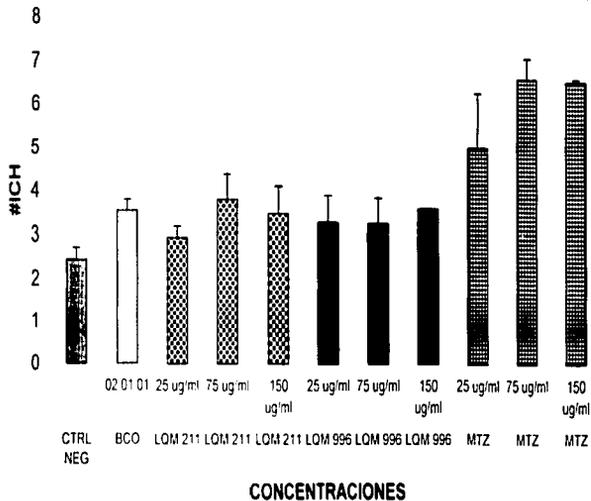


Figura 8. Frecuencia de ICH de LQM 211, LQM996 y MTZ

## VII. DISCUSIÓN

El compuesto LQM996 formó parte de un vasto grupo de derivados carbámicos, a los cuales se les realizó una serie de pruebas preclínicas encaminadas a evaluar su actividad biológica, que permitieron identificarlo como la molécula líder (Márquez, 2003). De tal manera que habiéndose perfilado como una sustancia con potente acción antibiótica y antiparasitaria (Bernal,2000; Minero, 1997), se tuvo la necesidad de evaluar su potencial genotóxico.

La evaluación de la frecuencia del ICH en los cromosomas metafásicos de un cultivo de linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de LQM996 fue la prueba de elección, ya que se conoce de sobra la sensibilidad que tiene esta prueba para detectar sustancias con acción mutagénica y carcinogénica. Las concentraciones utilizadas del compuesto en este cultivo celular fueron de 25, 75 y 150  $\mu\text{g/ml}$  y representan concentraciones del fármaco en el torrente sanguíneo mayores a las que se podrían esperar después de una sola administración vía oral. Los resultados indicaron que no se produjo un incremento en la frecuencia de ICH con ninguna de las concentraciones probadas y que dicha frecuencia fue similar a la obtenida en el cultivo de linfocitos que sirvió como testigo negativo. Una de las ventajas de la forma en que fueron expuestos los cromosomas (el material genético) a las diferentes concentraciones del compuesto, es que éste fue un sistema cerrado, en el cual, por no habersele adicionado la fracción microsomal S9 no existió biotransformación, así como tampoco eliminación. De manera que el efecto observado se puede asociar íntegramente a la molécula *per se*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El metronidazol continúa siendo el fármaco de elección en la mayor parte de las parasitosis gastrointestinales producidas por protozoarios, además de utilizarse en un amplio espectro contra muchas infecciones bacterianas, entre ellas la producida por *Helicobacter pylori*. Sin embargo, este fármaco presenta en la actualidad resistencia a un gran número de cepas como es el caso de *Trichomona vaginalis* y *Entamoeba histolytica* (Goodman y Gildman, 1996).

Estudios de mutagénesis y carcinogénesis han mostrado que metronidazol tiene capacidad clastogénica y altera la proliferación linfocitaria. La mutagenicidad del metronidazol está relacionada con niveles estacionarios del medicamento en sangre, los estudios *in vitro* en células humanas indican que el metabolito hidroxilado es el que produce alteraciones en la proliferación de los linfocitos (López, y col., 2001; Ménendez y col., 2001).

En el presente estudio se realizó la exposición de un cultivo de linfocitos a 25, 75 y 150  $\mu\text{g/ml}$  de metronidazol y los resultados mostraron que la frecuencia de ICHs fue de 5.1 y 6.6, dos veces mayor que la obtenida con LQM996 y el cultivo testigo negativo. Estos resultados vienen a apoyar los hallazgos anteriormente reportados en la literatura y que ponen de manifiesto la necesidad de sintetizar nuevas moléculas que sean una alternativa con mayor seguridad para la salud de los pacientes.

Paralelamente a la determinación de la frecuencia de ICH se realizó la evaluación de la cinética de proliferación celular. En lo que respecta a los resultados obtenidos en el cultivo de linfocitos expuesto a LQM996 no se observaron cambios en la frecuencia de células de 1º, 2º y 3º. división comparados con los que presentaron los cultivos testigo negativo, en ninguna de

las concentraciones ensayadas. Este parámetro nos indica que la progresión en el ciclo celular no ha sufrido cambios por la presencia de esta sustancia, aún con las concentraciones altas que se han utilizado. No sucedió así en los cultivos que fueron expuestos a metronidazol, donde a las concentraciones utilizadas los resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas comparando con LQM996 y el testigo negativo.

Otra medida más del efecto citotóxico que un compuesto puede ejercer sobre un cultivo, es la evaluación del índice mitótico que representa la capacidad total de la célula para poderse dividir. Cuando los cultivos fueron expuestos a LQM 996 los resultados no mostraron alteración en la frecuencia de figuras mitóticas, los cuales fueron similares a los obtenidos en el testigo negativo. El índice mitótico disminuyó en un 32.56% en los cultivos expuestos a metronidazol, con respecto al cultivo testigo negativo.

Los resultados de los primeros ensayos preclínicos realizados a LQM996 (Márquez, 2003) han dirigido el diseño molecular y la síntesis del compuesto LQM211 y otros compuestos análogos. Debido a que uno de los principales objetivos de la síntesis de este segundo grupo de derivados fue el aumentar la seguridad del compuesto, se analizó también la frecuencia de ICH en cultivo de linfocitos humanos a las mismas concentraciones de 25, 75 y 150  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados mostraron que la frecuencia fue de 2.9, 3.8 y 3.5 respectivamente y comparativamente con LQM996 no existieron diferencias estadísticamente significativas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La cinética de proliferación celular de LQM211 se encontró muy similar al LQM996, por lo que los cambios realizados en la estructura de los compuestos no alteran al ciclo celular, demostrando que ninguno de los dos compuestos es citotóxico. Ahora bien, los resultados muestran claramente que hay una alteración en el ciclo celular al comparar a los cultivos tratados con metronidazol a las mismas concentraciones.

El índice mitótico muestra un comportamiento similar al comparar al LQM211 con los cultivos de LQM996 y el testigo negativo. Al realizar la comparación de los cultivos con LQM211 y metronidazol, se observó una disminución del 42%.

Los compuestos LQM996 y LQM211, no solo presentan ventaja sobre el metronidazol, como se ha evidenciado en este estudio; sino también sobre otros compuestos de los que se han reportado acción genotóxica como es el caso del tiabendazol y prazicuantel (López y col., 2001; Menéndez y col., 2001).

Esto hace pensar que los compuestos 211 y 996 *per se* no son genotóxicos, sin embargo se sabe que en ocasiones los efectos mutagénicos y carcinogénicos de los fármacos son debidos a sus metabolitos y no a sus moléculas intactas (González, 1997). Existen varias formas de abordar este problema que podrían ser el uso del Ensayo Cometa o la Prueba de Micronúcleos *in vivo* (Menéndez y col., 2001), sin embargo, este no fue por el momento el objetivo de este estudio. Los estudios de farmacocinética, de toxicidad y genotoxicidad *in vivo* evaluarán tales efectos.

Por el momento con este estudio se tiene una aproximación del comportamiento que estas moléculas *per se* tienen sobre el material genético y muestran mejores resultados que el fármaco que desde hace décadas ha sido el antiparasitario de elección.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VIII. CONCLUSIONES

- 8.2 La frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas, no sufrió elevación en los linfocitos humanos en ninguna concentración estudiadas de los compuestos LQM996 y LQM211, por lo cual se considera que no son genotóxicos. A diferencia de éstos, el metronidazol aumenta al doble la frecuencia de ICH a concentraciones similares.
- 8.3 Los compuestos LQM996 y LQM211, no modificaron el índice mitótico ni el Índice de replicación del cultivo de linfocitos humanos en ninguna de las concentraciones empleadas. Poniendo de manifiesto que son menos citotóxicos que el metronidazol, el cual disminuye el IM y el IR.
- 8.4 Los fenilcarbamatos LQM996 y LQM211, pueden ser una alternativa al metronidazol para tratar infecciones parasitarias y/o microbianas, ya que no presentan efectos genotóxicos ni citotóxicos similares a los niveles provocados por este último.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## IX. REFERENCIAS

1. Álvarez, I., 1997. *Estudio genotóxico in vivo de un compuesto 1,4-Dihidropiridinico (FESCDIPINA) mediante la evaluación de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas.*. Tesis que para obtener el título de QFB. FES-C. UNAM.
2. Ángeles, E., Martínez, P., Seller, J., Martínez, R., Rubio, M., Ramírez, G., Castillo, R., López-Castañares, R., Jiménez, E., 2000. *Ethyl and methylphenylcarbamates as antihelmintic agents: theoretical study for predicting their biological activity by PM3.*, *Theochem.* **504**: 141-170.
3. Bernal, S., 2000. *Evaluación de algunos productos derivados del ácido carbámico como agentes antimicrobianos.* Tesis que para obtener el título de QFB. FES-C. UNAM.
4. Bondani, A., 1991. *La seguridad de un nuevo medicamento. Estudios Toxicológicos.* Cemifar. México. pp.53.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

5. Carrano, A., Thompson, L., Linl, A., Minkler, J., 1978. *SCE as an indicador of mutagenesis*. *Nature*. 271: 551-553
6. Ganong, W., 1984. *Fisiología Médica*. 9a. ed. El Manual Moderno. México. pp. 216-217.
7. Gersen, S., Keagle, M., 2000. *The principles of Clinical Cytogenetics*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp. 71-79.
8. Gonzalez, D., 1997. *Inducción de Intercambio de Cromátidas Hermanas por el Benzo  $\alpha$  pireno en espermatogonía de ratón.*, Tesis que para obtener el título de QFB. FES-C. UNAM. pp. 18-25.
9. Goodman G., Hardman, J., Lumbird, L., Molinoff, P., Ruddon, R., 1997. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Vol II. Interamericana. México. pp. 973-981
10. Katzung, B., 1984. *Farmacología Básica y Clínica*. El Manual Moderno. México. pp 231-233.
11. Kliesch, U., Roupova y Alder, D., 1982. *Induction of chromosome damage in mouse bone marrow by benzo  $\alpha$  pyrene*. *Mutat Res*: 102: 268-273.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

12. Krishna, G., Nath, J., Petersen, M., y Ong, T., 1988. *In vivo and in vivo/in vitro kinetics of cyclophosphamide-induced sister –chromatid exchanges in mouse bone marrow an spleen cells.* Mutat Res. 204:297-305.
13. Latt, A., Samuel, I., Rhona, R., Schreck, K., Loveday, S., y Chuler, C., 1979. *In vitro and in vivo Analysis of Sister Chromatid Exchange.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 30:501-535.
14. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, S. 2002. *Biología celular y molecular.* 4a. ed. Panamericana. España. pp. 939-942.
15. López, N., Gadano, B., Carballo, A., 2001. *Evaluation of genetic damage induced by a nitroimidazole derivative in human lymphocytes.* Toxicol. In Vitro. 15:209-213.
16. Márquez, P., 2003. *Actividad genotóxica de cuatro derivados carbámicos en ratón y análisis de la relación de dicho efecto con su estructura química.* Tesis que para obtener el grado de maestría en Ciencias Químico Biológicas con la Especialidad en Biomedicina. IPN.
17. Minero, B., 1997. *Comparación de la eficacia anticestódica de dos principios de nueva síntesis contra el prazicuantel, usando Hymenolepis nana como modelo en ratones.* Tesis que para obtener el título de QFB. FES-C. UNAM. pp. 1-59.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

18. Menéndez, E., Rojas, A., Herrera, C., López, M., Sordo, G., Elizondo, G., Ostrosky-Wegman, P., 2001. *DNA breakage due to metronidazole treatment*. *Mutat Res.* 478:153-158.
  
19. Morales P., 1988. *EL daño a la información genética y los intercambios entre cromátidas hermanas*. *Ciencia y Desarrollo*. 81: 65-72.
  
20. Perry, P., y Wolff S., 1974. *New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids*. *Nature*. 251: 156-158.
  
21. Roberts, T., Hutson, D., 1999. *Metabolic pathways of agrochemicals. Part two insecticidas and fungicides*. The Royal Society of Chemistry Information Services. Cambridge, UK. pp.234-242.
  
22. Salamanca, F., 1990. *Citogenética Humana. Fundamentos y aplicaciones clínicas*. Ed. Medica Panamericana. México. pp. 400.
  
23. Tucker, D., James, A., Cimino, C., Dearfield, K., Jacobson-Kram, D., Tice R., Carrano, V., 1993. *Sister-chromatid exchange: second report of the gene-Tox program*. *Mutat Res*. 297: 101-180.
  
24. Waksvik, H., Per, M., y Berg, K., 1981. *Effects of age, sex and genes on sister chromatid exchange*. *Clin. Genet*. 20: 449-454.

## GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

**Ácido Desoxirribonucleico (ADN):** Material genético de todas las células, doble cadena de polidesoxirribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, antiparalela y complementaria.

**ATCC:** Siglas de American Type Culture Collection, Colección Americana de Cultivos Tipo.

**5 - Bromo-2'-desoxiuridina (5-BrdU):** Compuesto con la capacidad de incorporarse al ADN sustituyendo a la timidina en la cadena sencilla que es sintetizada durante su replicación.

**Carcinógenos:** Agente o proceso que aumenta significativamente la incidencia de neoplasias malignas en la población.

**Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>) :** Dosis que se requiere para producir la muerte del 50% de la población.

**Helmintos:** Término general que significa gusano y que, pertenecen a dos grupos, los nemátodos y los platelmintos.

**Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH):** indica intercambios de segmentos homólogos o casi homólogos, simétricos y equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma.

**Metafases:** Período de la mitosis o meiosis, durante el cual los cromosomas se alinean en la placa ecuatorial.

**Metronidazol (MTZ):** Agente antimicrobiano y antiparasitario perteneciente al grupo de los nitroimidazoles; efectivo para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias anaerobias y ciertos protozoarios.

**Mutágenos:** Toda sustancia que produce un cambio permanente y heredable en el material genético.

**Protozoarios:** Microorganismos unicelulares eucarióticos, compuestos por un núcleo o más de uno y el citoplasma.