



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

EVALUACION DEL DAÑO AL DNA, PRODUCIDO POR
UN GRUPO DE DERIVADOS CARBAMICOS CON ACCION
ANTIPARASITARIA, MEDIANTE EL ENSAYO COMETA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :

**ANA CLAUDIA ALVAREZ ALCANTARA
MA. GUADALUPE ALARCON MORALES**

DIRECTORA:
DRA. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
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:

Evaluación del daño al DNA, producido por un grupo de derivados carbámicos con acción antiparasitaria, mediante el Ensayo Cometa.

que presenta la pasante: Ma. Guadalupe Alarcón Morales
con número de cuenta: 09460138-9 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 21 de Junio de 2004

PRESIDENTE MFC.	Ma. Eugenia R. Posada Galarza	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arce	
SECRETARIO	QFB. Virginia Oliva Arellano	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Rosalba Eonilla Sánchez	
SEGUNDO SUPLENTE	MC. Rosa Isela Alvarez González	

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
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:

Evaluación del daño al DNA, producido por un grupo de derivados carbámicos con acción antiparasitaria, mediante el Ensayo Cometa

que presenta 1a pasante: Ana Claudia Alvarez Alcántara
con número de cuenta: 09107521-5 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Biológica

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 21 de Junio de 2004

PRESIDENTE MFC. Ma. Eugenia R. Pcsada Galarza

VOCAL Dra. Sandra Díaz Barriga Arce

SECRETARIO QFB. Virginia Oliva Arellano

PRIMER SUPLENTE QFB. Rosalba Bonilla Sánchez

SEGUNDO SUPLENTE MC. Rosa Isela Alvarez González

AGRADECIMIENTOS

Existen en este mundo ángeles disfrazados de personas cuya presencia nos llena de luz el camino que tenemos que seguir, que nos apoyan, nos ayudan nos guían y enseñan; a todas esas personas cuyo destino esta ligado tan profundamente al mío he aquí mi reconocimiento y amor:

Mi familia; Madre: Eres una mujer fuerte, valiente, sabia, mi gran ejemplo a seguir, nunca te defraudaré; Álvarez: Por que el amor no acaba, aunque las circunstancias nos alejen; Hermanos (Paquito y Alma): Por todo lo que aprendo de ustedes a diario son una gran inspiración y mi gran fuente de amor.

Ale (amigui), Dr., Cordero, Rafa, Paco, Fabí, Diana, Roci y Akari: Por hacerme sentir parte de un todo, mi amor y agradecimiento, todos y cada uno tiene un lugar muy especial en mi corazón.

Abuelitos Mario y Tere: Por que todo lo que aprendí de ustedes, me ha llevado a este punto y estoy en deuda con la vida por dejarme formar parte de su camino; abuelita, mi amor eterno, sé que me cuidas.

Muños, Gallegos y Papaqui: Por que he aprendido que la familia es a prueba de todo que el amor es infinito.

Moni y Ara: porque son mujeres de las cuales aprendo muchísimo, por ser fuertes, inteligentes y talentosas.

Lyza, Edmundo, Héctor, Rodolfo y Ale: Por enseñarme que la amistad es una parte importante de la vida, que va ligada al amor, al apoyo y entendimiento de todo, a todos los quiero mucho, por ser parte del destino. Gracias.

A mis amigos (Domingo, Enrique, Male, Sandra, Angélica, Diana) por contribuir a este fin, por su apoyo y ayuda, los quiero.

Laura, Marybell, SAC y Lalo; por que sé que todo aquello que nos une forma parte de nuestras vidas, mi más profundo agradecimiento y cariño a todos ustedes.

A todos mis profesores: cuya experiencia y conocimientos forman parte de mi vida, porque me ayudan a crecer.

A mis profesoras de Citogenética y Genética Clínica: Por su gran calidad humana, por sus enseñanzas y ejemplo, por el orgullo de haber sido su alumna, especialmente a la Dra. Sandra, por haber asesorado esta Tesis, por el tiempo que invirtió en ella, por su gran e infinita paciencia, por su confianza, porque sin su apoyo y ayuda y colaboración esto no sería. Para usted con admiración, respeto y cariño.

Guadalupe: Por ser parte de esta Tesis, por aquellas tardes interminables, que hubieran sido más pesadas sin ti, por enseñarme que en la diversidad de ideas, esta el camino

Porque el amor no es la meta:
es el camino.

Ana Claudia.

Que cada alma que me toque, así sea con el más leve roce; reciba algún beneficio de mí: Algún pequeño detalle, algún pensamiento afectuoso, algún deseo aún no cumplido. O que reciba un poquito de valor si su cielo se ve oscurecido, una pizca de fe para afrontar los a veces densos males de la vida, o vislumbre del brillo de un cielo mas allá del cúmulo de nubes que hace que esta vida valga la pena.

Quiero darle las gracias a Dios y a la vida, por permitirme llegar a este momento con salud, a todas las personas que me han ayudado durante este proceso de gran aprendizaje durante la carrera, darle gracias a todas esas personas que han hecho de estos años algo tan especial.

La gratitud es uno de los grandes secretos de una vida plena y Nunca podremos llegar a agradecerse lo suficientemente pero son muchas las personas que de una u otra forma me han ayudado en el largo recorrido que significo la realización con éxito de esta Tesis y como muestra de mí reconocimiento inicio diciendo:

He recibido de la vida el regalo más bello, mi familia.

A mi Madre (Estela): Por ser una fuente inagotable de paciencia y amor y por ser el “Pilar” de la familia, por ser una mujer sencilla y trabajadora, por decirme: Sé fiel en el cumplimiento de tus deberes! Realiza con esmero y Amor todo los trabajos que te den, aunque parezca insignificante. Cualquier cosa que hagas, por pequeña que sea, es un paso adelante en el progresó. Realiza todos tus trabajos, como si todo tu futuro dependiese de ellos, y por enseñarme a ser una mujer llena de amor a la vida.

A mi Padre (Roberto): Por ser un gran Ser, por darme un ejemplo de vida, haberme apoyado siempre, haberme orientado y enseñarme que la disciplina es la parte más importante del éxito.. y por darme la oportunity de esta gran experiencia.

A mis Hermanos (Yedid, Hilda y Miguel A.): Por siempre ser fuente de inspiración y de ejemplo y espero no defraudarlos.

A mi familia, abuelos, tíos, primos, sobrinos y los que están en el cielo, a todos ustedes que los amo con todo mi corazón. Gracias.

A mis Amigas (Laura, Ale, Lyza, Marybell) Por brindarme su amistad por compartir en todos estos años alegrías, grandes experiencias, por ser pacientes conmigo, por apoyarme en momentos buenos y no tan buenos.

A mis Amigos (Erik, Martín, Quique, Ángel, Alfredo M., Fabián, Benito, Gerardo, Gina, Pao, Tere y Lety) por todo su apoyo, su amistad brindada y sus buenos consejos. Gracias.

A mis Profesores: Por darme lecciones en ese camino de aprendizaje que es la vida y por todos los años que emplearon en mi formación profesional, y de una manera especial a la Dra. Sandra que en todo momento facilitó enormemente la culminación de esta Tesis, con su dirección, consejo y amistad. Tengo la esperanza de hacerme en el futuro merecedora de la calidez y generosidad con que me recibió desde el primer día.

A ti Ana; quiero darte las gracias por tu apoyo, amistad y afecto, y porque también eres parte de esta Tesis, quiero darte las gracias

Espero contar con todos ustedes siempre.

A ti Alfredo R.: Gracias por enseñarme a amarte, por el camino que hemos recorrido juntos, por todos esos momentos tan maravillosos. Muchas gracias.

“Por la vida, por los que caen y se levantan porque su vuelo siempre llega a ser aun más alto”

Ma. Guadalupe Alarcón Morales

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Citogenética L-521 de la F.E.S.Cuautitlán.

Los compuestos estudiados en este proyecto fueron proporcionados por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano, del Laboratorio de Química Medicinal de la misma institución.

Este trabajo esta incluido en el Proyecto PAPIIT IN 205902.

CONTENIDO

Índice de tablas y figuras	i
Glosario	iii
I. Resumen	1
II. Introducción	
Capítulo 1	
❖ El uso del Linfocito en las pruebas de Genotoxicidad	3
Capítulo 2	
❖ Ontogenia del Linfocito Humano	4
Capítulo 3	
❖ Funciones biológicas de los Linfocitos Humanos	6
Capítulo 4	
❖ Morfología de los Linfocitos Humanos	7
Capítulo 5	
❖ Genotoxicidad	8
Capítulo 6	
❖ Estudios Citogenéticos	11
FISH	12
Ensayo Cometa	12
▪ Detección de la Ruptura en el DNA	14
▪ Sistema de Evaluación	16
▪ Características de los donadores	17

Capítulo 7	
❖ Compuestos antiparasitarios	
Carbamatos	19
▪ Modo de Acción	20
▪ Toxicidad	21
Nuevos derivados carbámicos	21
Antiparasitarios de primera elección	
▪ Albendazol	25
▪ Mebendazol	26
▪ Metronidazol	27
III. Objetivos	29
IV. Materiales y Métodos	30
V. Resultados	36
VI. Discusión	49
VII. Conclusiones	55
VIII. Referencias	56
IX. Apéndice	60

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICOS.

TABLAS

❖ Tabla 1: Derivados del ácido carbámico y sus usos.	19
❖ Tabla 2: Nombre y estructura de los compuestos carbámicos.	23
❖ Tabla 3: Propiedades físicas de los compuestos carbámicos de éste estudio.	24
❖ Tabla 4: Porcentaje de viabilidad mediante la prueba con Azul de Tripán	36
❖ Tabla 5: Relación Longitud total de la imagen / diámetro del núcleo (L/D).	37

FIGURAS

❖ Figura 1: Sistema Linfoide.	5
❖ Figura 2: Ganglio Linfático que ejemplifica la recirculación del linfocito humano	6
❖ Figura 3: Morfología del linfocito humano.	7
❖ Figura 4: Esquema de no disyunción que ejemplifica los gametos no balanceados	9
❖ Figura 5: Control Positivo y Control Negativo del Ensayo Cometa	14
❖ Figura 6: Esquematización de rupturas de cadena sencilla.	15
❖ Figura 7: Parámetros para el sistema de evaluación por micrómetro ocular	16
❖ Figura 8: Estructura básica de los Carbamatos.	19
❖ Figura 9: Reacción general de la Síntesis de 4-R-fenilcarbamatos de metilo.	22
❖ Figura 10: Reacción general de la Síntesis de 4R-fenilcarbamatos de etilo.	22
❖ Figura 11: Estructura Química del Albendazol.:	26
❖ Figura 12: Estructura Química del Mebendazol.	27
❖ Figura 13: Estructura Química del Metronidazol.	28
❖ Figura 14: Separación de linfocitos humanos por medio de Ficoll-Hypaque.	32

GRÁFICOS

❖ Gráfico 1: Compuesto LQM 901, Media de la relación L/D vs Concentración	38
❖ Gráfico 2: Compuesto LQM 904, Media de la relación L/D vs Concentración	38
❖ Gráfico 3: Compuesto LQM 930, Media de la relación L/D vs Concentración	38
❖ Gráfico 4: Compuesto LQM 996, Media de la relación L/D vs Concentración	38
❖ Gráfico 5: Metronidazol, Media de la relación L/D vs Concentración	39
❖ Gráfico 6: Mebendazol, Media de la relación L/D vs Concentración	39
❖ Gráfico 7: Albendazol, Media de la relación L/D vs Concentración	39
❖ Gráfico 8: Compuesto LQM 901, % de células vs Relación L/D	40
❖ Gráfico 9: Compuesto LQM 904, % de células vs Relación L/D	41
❖ Gráfico 10: Compuesto LQM 930, % de células vs Relación L/D	42
❖ Gráfico 11: Compuesto LQM 996, % de células vs Relación L/D	43
❖ Gráfico 12: Albendazol, % de células vs Relación L/D	44
❖ Gráfico 13: Metronidazol, % de células vs Relación L/D	45
❖ Gráfico 14: Mebendazol, % de células vs Relación L/D	46
❖ Gráfico 15: Comparativa de distribución de daño de los compuestos carbámicos	47
❖ Gráfico 16: Comparativa de distribución de daño de los antaparasitarios de primera elección	48

GLOSARIO

- Acetilserina: f. aminoácido poco frecuente, presente en algunas proteínas, que se forma por la acetilación de la serina una vez que la proteína ha sido transducida.
- ADN *DNA*: Abreviatura de ácido desoxirribonucleico (en inglés desoxyribonucleic acid o DNA). Es la molécula que contiene y transmite la información genética de los organismos excepto en algunos tipos de virus (retrovirus).
- Antígeno: Es una sustancia que induce la formación de anticuerpos debido a que el sistema inmune la reconoce como una amenaza. Esta sustancia puede ser extraña (no nativa) proveniente del ambiente (como químicos) o formada dentro del cuerpo (como toxinas virales o bacterianas).
- Antimicrobiano: Bactericidas, si produce la muerte del microorganismo y bacteriostáticos, si disminuyen la multiplicación del microorganismo.
- Ataxia: Es un desorden del ritmo y de la coordinación del movimiento en el que intervienen mecanismos complejos. Se manifiesta como desequilibrio al andar y dificultad para realizar movimientos rítmicos y precisos.
- ATP: Es una molécula que actúa como el transportador de energía química más importante en las células de todas las especies vivientes, y a medida que transfiere su energía a otras moléculas, pierde su grupo fosfato terminal y se transforma en difosfato de adenosina (ADP).
- Carbamatos: Son derivados del ácido carbámico, cuya actividad principal suele ser como insecticidas.

- CPA's: Células que exponen los complejos péptido-MHC (Complejo principal de histocompatibilidad), en una forma tal que puede ser reconocida por las células T.

- DL₅₀: Dosis a la cual se produce una mortalidad del 50%.

- DMSO: Es un solvente aprótico con notables propiedades de aumento de penetración de muchas drogas de aplicación local.

- Electroforesis: Es un método analítico semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico.

- Fracción Microsomal: (Citocromo P450) El citocromo P450 es una familia de enzimas con grupo hem que participan en la oxidación de esteroides, ácidos grasos y muchos xenobióticos ingeridos del ambiente.

- Genotoxicidad: Alteración o daño en el material hereditario, producido por algunos agentes ambientales físicos, químicos o biológicos.

- Helminto: o gusano, pluricelular, no se dividen dentro del huésped generalmente. Suelen adquirirse por vía oral a través de contaminación fecal del agua o alimentos.

- ICH: Fenómeno del intercambio de cromátidas hermanas que es útil para valorar efectos mutagénicos.

- LGG: Linfocitos granulosos grandes.

- **LOCUS:** Es la posición en un cromosoma en la que un gen en particular se encuentra, el locus puede estar ocupado por uno de los alelos del gen.

- **LQM:** Clave que identifica los compuestos proporcionados por el Laboratorio de Química Medicinal.

- **Nemátodos:** Son gusanos cilíndricos insegmentados. En este caso también suelen ser parásitos y producir enfermedades. Ejemplo: *Trichinella spiralis* (triquinosis).

- **Peróxido de hidrógeno:** (conocido también como agua oxigenada) es un líquido incoloro a temperatura ambiente con sabor amargo, es inestable y se descompone rápidamente a oxígeno y agua con liberación de calor. Forma radicales libres, que se unen covalentemente al grupo amino de la molécula de DNA, provocando rupturas.

- **Relación N:C :** Se refiere a la relación, del volumen relativo del núcleo y el citoplasma, de los linfocitos.

- **Sitio álcali lábil:** Lugar al interior de la molécula de ADN sensible a la acción de agentes alcalinos y, por lo tanto, es una región frágil y susceptible de lesionarse.

- **TLAM:** Tejido mucoso endotelial en donde las células T efectoras y de memoria se asientan preferentemente y en cada localización, las células muestran distintas características fenotípicas y funcionales.

I. RESUMEN

El interés de realizar un estudio de genotoxicidad de los compuestos derivados del ácido carbámico, se basa en que en los últimos años se ha incrementado la síntesis orgánica de estos compuestos por medio de estudios teóricos comparativos que consisten en el análisis de la relación estructura química con la actividad biológica, lo que aporta valiosa información para sintetizar nuevas sustancias con mejor actividad terapéutica y menores efectos secundarios.

En este contexto, el grupo de Química Medicinal de la FESC, ha sintetizado un grupo de sustancias derivadas del ácido carbámico que han mostrado actividad antiparasitaria y antimicrobiana, en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*.

Debido a que el Ensayo Cometa es una técnica que evalúa el daño al DNA, sensible, rápida, reproducible y confiable se eligió como prueba para estudiar el comportamiento genotóxico de los compuestos derivados del ácido carbámico sobre los linfocitos humanos.

El presente estudio se llevó a cabo *in vitro*, sin la adición de la fracción microsomal hepática, con la finalidad de observar el efecto genotóxico de los compuestos *per se* (LQM 901, LQM 904, LQM 930, LQM 996, Metronidazol, Mebendazol y Albendazol).

El material biológico empleado fue sangre periférica tomada por punción venosa de una donadora sana. En este estudio se probaron 3 concentraciones diferentes (10, 50 y 100mg/mL), utilizando un testigo negativo y un testigo positivo (H_2O_2) en cada ensayo, para cada uno de los compuestos trabajados: LQM 901, LQM 904, LQM 930, LQM 996, Metronidazol, Mebendazol y Albendazol.

El modelo celular utilizado fueron linfocitos humanos que se obtuvieron a partir de la muestra de sangre por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque, de aquí se preparó una suspensión celular de 350 000 céls/ml y se expusieron a los compuestos durante 1 hora. Después en todos los casos se realizó el Ensayo Cometa.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias estadísticamente significativas en el grado de daño al DNA por los diferentes compuestos.

Al comparar los resultados tanto de los carbamatos como de los antiparasitarios de primera elección se puede observar sin lugar a dudas que el compuesto elegido como líder (LQM 996), presenta una genotoxicidad menor a los

otros derivados y parecida a los antiparasitarios por lo que se vislumbra como una alternativa real en el tratamiento de las enfermedades parasitarias y también de la provocada por *H. pylori*.

II. INTRODUCCIÓN

Capítulo 1 :
EL USO DEL
LINFOCITO EN LAS
PRUEBAS DE
GENOTOXICIDAD.

El linfocito es una de las células que se pueden utilizar como modelo en pruebas de genotoxicidad ya que se encuentran en cualquier parte del cuerpo humano (cavidad bucal, nasal, mucosa gástrica, sangre, etc.), debido principalmente al papel primordial que juegan dentro del sistema inmune, organizándose a su vez en tejidos y órganos, estructuras que reciben el nombre genérico de sistema linfoide (Regueiro, 2002).

Los linfocitos entran en contacto directo con sustancias genotóxicas del medio ambiente.

Los linfocitos pueden ser estimulados para proliferar fuera del cuerpo humano, y su tiempo de vida media puede ser de semanas e incluso décadas. Nos provee información del daño aún después de la exposición debido, a la lenta reparación que muestran los linfocitos aislados recientemente, que aquellos que ya han sido estimulados para su proliferación, ya que debido a la función que tienen los linfocitos dentro del cuerpo humano, se considera que son células con una alta capacidad de división (Kassie et al; 2000) (Roitt; 2002).

El linfocito es un modelo excelente para estudiar el DNA, porque pueden hacerse estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, debido a que como todas las células sanguíneas; proviene de células hematopoyéticas pluripotenciales y éste al diferenciarse no pierde el material genético, lo que lo hace un modelo representativo(Regueiro.2002)

Capítulo 2 :
ONTOGENIA DEL
LINFOCITO HUMANO

Los linfocitos se producen diariamente en grandes cantidades en los órganos linfoides centrales o primarios. Algunas de estas células migran hasta los órganos linfoides secundarios a través del torrente sanguíneo.

Un ser humano adulto normal posee unas 10^{12} células linfoides y el conjunto de tejido linfoide representa aproximadamente un 2% del peso corporal total. Las células linfoides constituyen alrededor del 20% de los leucocitos circulantes totales. Muchas células linfoides maduras son de vida larga, y pueden persistir como células de memoria durante toda la vida del individuo.

El sistema linfoide esta formado por linfocitos, células accesorias (Macrófagos y Células presentadoras de antígeno CPA'S), algunos tejidos y células epiteliales. Puede estar organizado en forma de órganos encapsulados aislados o consistir en acumulaciones de tejido linfoide difuso. Los principales órganos y tejidos linfoides se clasifican en primarios (centrales o encapsulados) y secundarios (periféricos o difusos). (Fig. 1)

Los órganos linfoides primarios son los lugares en donde se produce mayoritariamente la linfopoyesis (desarrollo de los linfocitos). En ellos los linfocitos se diferencian a partir de las células madre linfoides, proliferan y dan lugar finalmente a células maduras funcionales. En los mamíferos, las células T maduran en el timo, mientras que las células B maduran en el hígado del feto y en la médula ósea.

Los órganos linfoides secundarios son el bazo, los ganglios linfáticos y los tejidos asociados a las mucosas (TLAM), entre los que se encuentran las amígdalas y las placas de Peyer del íleon (Fig 1). Los ganglios linfoides secundarios proporcionan a los linfocitos un entorno en el que éstos pueden interaccionar entre sí, con las células accesorias y con los antígenos (Roitt, 2000)(García Tamayo, 1997).

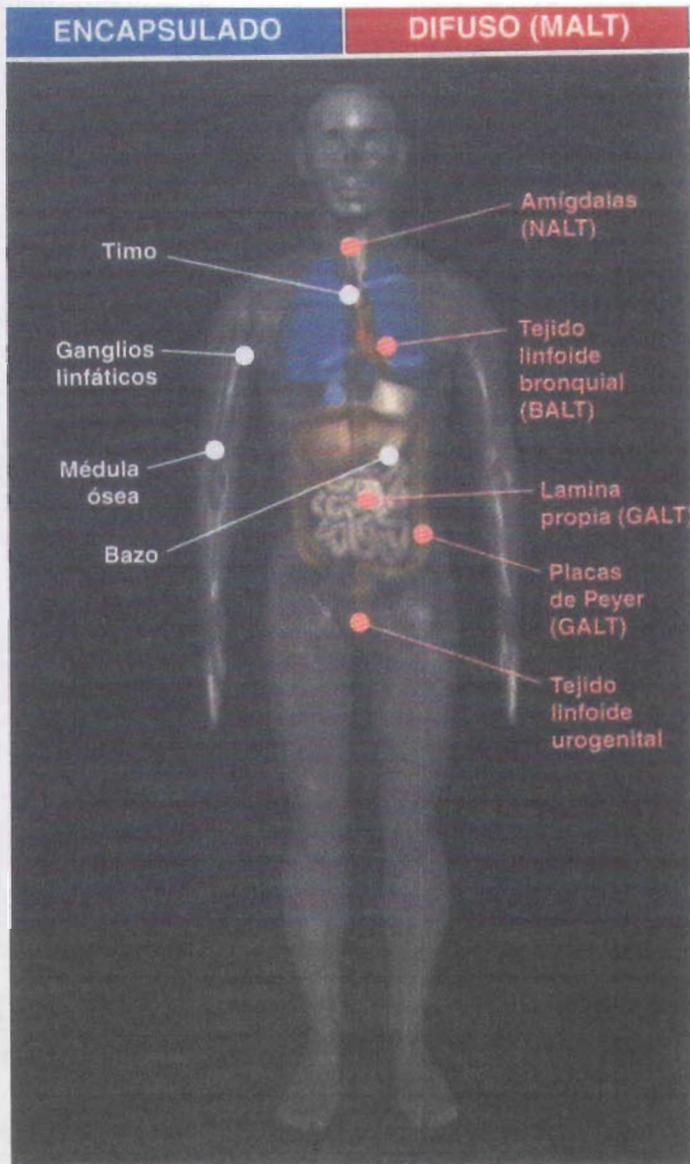


Fig. 1. Sistema Linfóide: Localización de los órganos linfoides primarios o encapsulados y secundarios o difusos. (Regueiro; 2002)

Capítulo 3 :
FUNCIONES
BIOLÓGICAS DE LOS
LINFOCITOS
HUMANOS

Una vez que han madurado, las diferentes subpoblaciones de linfocitos abandonan el timo y médula ósea, pasan a la circulación sanguínea, se reparten por todo el cuerpo y, finalmente, abandonan los vasos para filtrar casi todos los tejidos, particularmente los órganos linfoides secundarios (Fig. 2). Sin embargo, su localización tisular resulta transitoria porque los linfocitos recirculan.

Esto quiere decir que los linfocitos tisulares regresan a la sangre y, que más adelante, vuelven a salir hacia los tejidos y así sucesivamente.

Los linfocitos B y T son los encargados de reconocer los antígenos del medio ambiente, que penetran al cuerpo. Además inician y dirigen respuestas del sistema inmunitario, cada una de las cuales está dirigida específicamente contra los antígenos que lo estimularon (García, 1997).

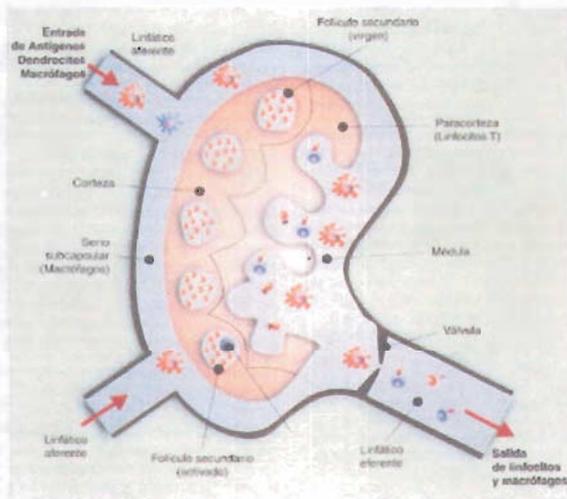


Fig. 2. Ganglio linfático, que ejemplifica la recirculación del linfocito humano (Regueiro, 2002).

Capítulo 4 :
Morfología del linfocito
humano

Los linfocitos que se observan en un frotis sanguíneo convencional presentan diversos tamaños que van de 6 a 10 μ m de diámetro, así como también variada morfología.

Hay diferencias en cuanto al volumen relativo del núcleo y el citoplasma (relación N:C), la forma del núcleo y la presencia o ausencia de gránulos azurófilos.

Mediante microscopía y una tinción hematológica clásica, como la tinción de Giemsa (Fig. 3), se pueden observar intracitoplásmaticos y se denominan linfocitos granulados grandes (LGG). Los LGG no se deben confundir con los dos tipos morfológicos de linfocitos en la circulación. Unos son relativamente pequeños, carecen de gránulos y presentan una relación N:C elevada. Los otros son más grandes presentan una menor relación N:C, contienen gránulos azurófilos intracitoplásmaticos y se denominan linfocitos granulados grandes (LGG). Los LGG no se deben confundir con los granulocitos, los monocitos, ni sus precursores, que también contienen gránulos azurófilos (Roitt, 2000).

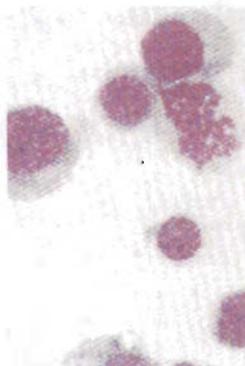


Fig. 3. Morfología del linfocito humano (Roitt; 2000)

Capítulo 5 : **GENOTOXICIDAD**

Importancia de los estudios genotóxicos.

La Genética Toxicológica fue reconocida en 1969 como una nueva disciplina de la toxicología, encargada de identificar y analizar la acción de los agentes con toxicidad dirigida hacia los componentes hereditarios de los sistemas vivos (Bello y Lòpez de Ceràn, 2001).

Las consecuencias que sobre la salud pueden tener los agentes mutagénicos dependen del tipo de células donde el agente en cuestión actúe. Así que, en el caso de interaccionar con células somáticas adultas los efectos pueden verse reflejados como una transformación maligna de éstas, como causa de un envejecimiento celular prematuro o incluso como muerte celular. En el caso de afectar células somáticas embrionarias la respuesta clínica de la mutación pueden ser anomalías congénitas, muerte embrionaria fetal o perinatal, o bien células transformadas que conduzcan al cáncer.

El daño genotóxico puede ocurrir también a nivel de células germinales, las cuales sí cuando forman gamétos viables mutantes darán origen a individuos mutantes; pero si éstos no están balanceados, el efecto será esterilidad y abortos (Fig. 4).

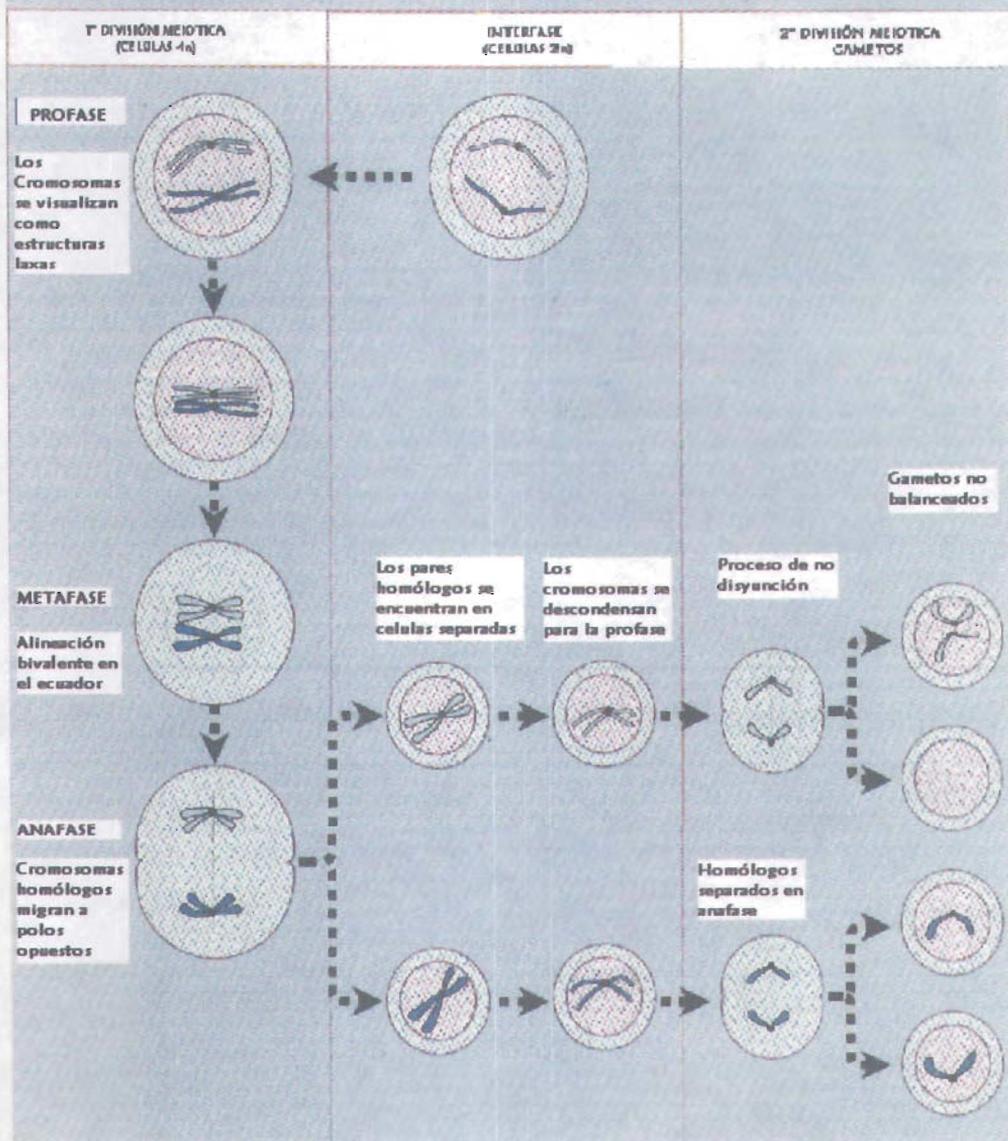


Fig. 4: Esquema de no disyunción que ejemplifica los gametos no balanceados

Sí bien, las pruebas de elección para evaluar los agentes sospechosos de ser genotóxicos son mucho muy variadas, existen dos etapas primordiales que deben ser tomadas en cuenta por cualquier ensayo de esta naturaleza. La primera etapa comprendería la detección del potencial genotóxico y la segunda etapa evalúa el riesgo-beneficio, ya que de esto último dependería el control de la producción y el consumo del agente genotóxico estudiado (Salamanca, 1990; Bello y Lòpez de Ceràn, 2001).

Capítulo 6 :
ESTUDIOS
CITOGENÉTICOS

Una mutación se considera como una modificación en la secuencia de las bases nitrogenadas que constituyen al DNA. Este cambio puede ocurrir en los genes o en el agrupamiento de éstos, denominados cromosomas; de tal manera que podríamos distinguir dos niveles a los cuales puede ser estudiado el daño al material genético.

A nivel génico, los estudios para detectar mutaciones generalmente se realizan con pruebas en microorganismos, las razones para ello son la relativa simplicidad con que puede detectarse el cambio en un gen provocado por un agente específico. Estos estudios están representados por el ensayo de Ames en *Salmonella typhimurium* (Tice et al, 2000).

Los métodos cromosómicos para evaluar el daño genotóxico de diversos agentes no están considerados como prueba sobre un organismo específico o como una mutación génica en un locus determinado, de tal manera que las inferencias obtenidas a través de estos métodos permiten ser extrapolado casi a cualquier especie o línea celular con respecto a las respuestas que producen los agentes genotóxicos.

Los estudios citogenéticos evalúan principalmente dos tipos de acciones de los agentes genotóxicos sobre el material cromosómico; estos son: el efecto clastogénico, o sea cuando el agente produce rupturas cromosómicas; y la acción genotóxica S dependiente que se suscita durante la etapa en la cual el DNA se replica. Por esta razón los primeros estudios citogenéticos enfocados en evaluar el efecto de los agentes mutagénicos sobre los cromosomas comprenden los parámetros de evaluación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas y más tarde el estudio de la frecuencia de los intercambios entre las cromátidas hermanas (ICH).

El daño producido por diversos factores al material genético, a través de la mutagénesis, es uno de los riesgos toxicológicos que no se han valorado suficientemente, a pesar de su repercusión en la salud de los individuos afectados y de sus descendientes. Esto ha propiciado que aparezcan nuevas técnicas que buscan ser rápidas y más económicas que las anteriores (Enciso, 2000; Tice et al, 2000; Bello y Lòpez de Ceràn, 2001).

Las técnicas que en la actualidad han tomado gran importancia en el análisis de los efectos mutagénicos de los agentes genotóxicos son las técnicas de citogenética molecular y el estudio electroforético de células individuales cuyo material cromosómico ha sido dañado.

FISH.

Aunque los procedimientos de utilización de fluorescencia en hibridaciones *in situ* (FISH) se han realizado desde la década pasada, la aplicación de esta técnica para la detección de aberraciones cromosómicas inducidas por agentes genotóxicos no había sido explotada sino hasta ahora gracias a la obtención de sondas que son específicas de cada cromosoma o incluso de regiones cromosómicas como por ejemplo las sondas de DNA satélite. Esta novedosa técnica implementada por Evans y colaboradores ha permitido el estudio de aberraciones cromosómicas específicas en la interfase; de ésta forma , no se necesitan obtener metafases para poder detectar de qué tipo de aberraciones cromosómicas se trata. Hasta el momento la técnica de FISH ha sido utilizada para estudiar a las aberraciones cromosómicas en general.

ENSAYO COMETA.

El ensayo cometa es también conocido como “Ensayo en gel unicelular” (SCG), “Electroforesis Unicelular”, o “Electroforesis en Microgel” (MGE); fue utilizado por primera vez por Östling y Johanson (Östling, 1984) como una técnica electroforética para la observación directa del daño al DNA en células individuales.

Originalmente, estos dos investigadores suspendieron un pequeño número de células irradiadas en un delgado gel de agarosa colocado sobre un portaobjetos, a esta preparación se le hacía un corrimiento electroforético que posteriormente sería teñida con un colorante fluorescente de unión al DNA, el resultado fueron imágenes que por su apariencia fueron nombradas “cometas”.

Este proceso de electroforesis hace que el núcleo migre de forma diferencial poniendo de manifiesto el daño al DNA, de forma que el DNA intacto migra íntegro, mientras que el DNA dañado o fragmentado migra de manera diferencial

mostrando una cola de cometa y la extensión de ese DNA liberado de la cabeza del cometa está en función del daño.

Dentro de las principales ventajas de la metodología es que es, sencilla y rápida (en 24 horas se pueden tener los resultados), se puede aplicar a prácticamente cualquier tipo de tejido que pueda ser disgregado, se requiere de una muestra pequeña de células (500-1000 células), es muy sensible (a $\text{pH} > 13$; $< 5\text{cGy}$ de rayos X) y finalmente provee la distribución de los datos de daño al DNA y de reparación de daño al DNA.

El ensayo cometa alcalino o el ensayo electroforético unicelular en microgel (SCGE), es un método de detección de sitios de ruptura en el DNA así como sitios álcali lábiles en células individuales. Desde su introducción en 1988, se ha aceptado como una técnica rápida, simple y sensible para medir las rupturas en el DNA que ha encontrado aplicación en estudios de daño y reparación del DNA, biomonitoreo, análisis de alimentos radiados y determinación de la genotoxicidad (McKelvey-Martin et al, 1993). Esta basado en la habilidad de las cargas negativas expuestas cuando hay una ruptura en el DNA, que al estar en un gel de agarosa, responden a un campo eléctrico. Además la extensión de la migración del DNA es relacionada directamente con la frecuencia de rupturas en el DNA (Singh, 1998).

Una suspensión celular es mezclada con agarosa y montada en una laminilla. Son lisadas con un detergente alcalino y se corre una electroforesis a $\text{pH} > 13$. En la versión alcalina del ensayo, el DNA en células sin tratar se observa con una fuente de fluorescencia compacta, mientras el DNA en las células tratadas para romper las cadenas migran en dirección al ánodo provocando la aparición de cometas (Fig. 5).

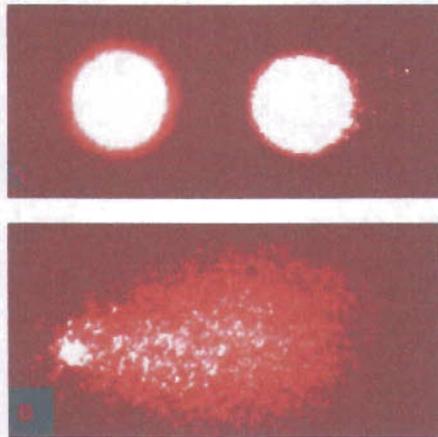


Fig. 5. Fotografías del linfocito humano en el ensayo cometa. (A) Control negativo. (B) Control positivo. (Henderson; 1999)

El tamaño del cometa y la distribución de la fluorescencia tiene una correlación cuantitativa con la frecuencia del rompimiento en las cadenas del DNA (Olive y Banath, 1993) (McCarthy, 1997).

Detección de la ruptura en el DNA.

Algunos de los agentes que dañan al DNA y que causan un incremento en la migración del DNA en el ensayo cometa son: Luz U.V., radiación ionizante, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros químicos que forman radicales libres, agentes alquilantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's), químicos radiomiméticos y varios metales (Tice, 1995). En principio la versión alcalina del Ensayo cometa, detecta rompimientos en una sola cadena inducidos en el DNA y lesiones capaces de inducir un rompimiento sencillo en una sola cadena (Ej. Sitios álcali lábiles) (Fig. 6).

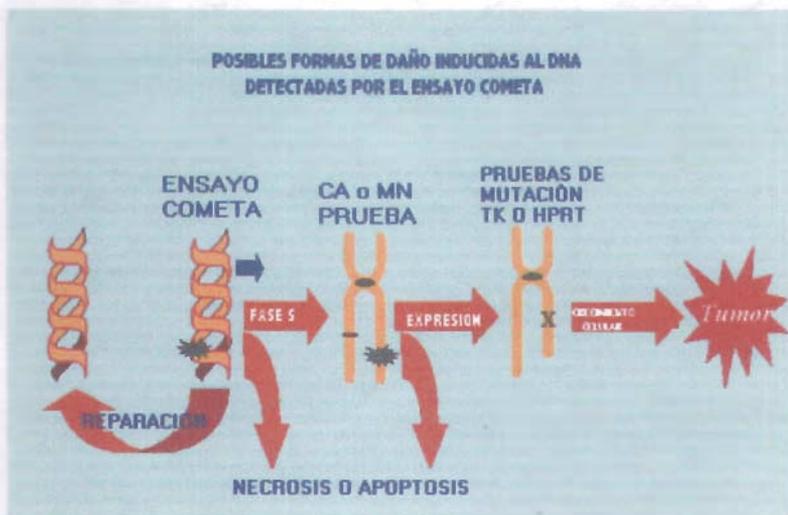


Fig. 6: Esquemización de rupturas de cadena sencilla

Las uniones (DNA-DNA o DNA-Proteínas), inducidos por cisplatina, ciclofosfamida o formaldehído, puede causar problemas en el protocolo estándar de la prueba, por que los cruzamientos pueden estabilizar el DNA cromosómico e inhibir la migración del DNA (Hartmann, 1995). Una forma de detectar un cruzamiento es inducir primero la fragmentación del DNA con un agente de referencia (Ej. Radiación ionizante, o metilmetanosulfonato MMS) y detectar la reducción de la migración en presencia de agentes enlazantes (Pfuhrer, 1996).

El cruzamiento también puede ser analizado por el incremento en la duración del desenrollamiento y/o electroforesis en células control sin tratar que exhiben una migración significativa en contraste con células tratadas que migran pobremente (Fusco, 1996). En adición directa de inductores del rompimiento de cadenas, los procesos en que se inducen éstos rompimientos tales como la incisión durante la escisión en los procesos de reparación, también pueden ser detectados. En algunos casos (Ej. U.V. PAH's) la contribución de la reparación por escisión inducida al DNA y sus efectos en el Ensayo Cometa toman mayor importancia (Speit, 1995).

Algunas clases específicas de daño al DNA en una base, puede ser detectada con el ensayo cometa con ayuda de endonucleasas que reconocen la lesión específicamente. Estas enzimas se añaden a las laminillas por un corto tiempo antes de la lisis, provocando rupturas en sitios específicos, donde se encuentra la alteración de una base, y resultando en rupturas de cadena sencilla, que pueden ser cuantificada por el ensayo cometa. Usando esta modificación del ensayo cometa, la oxidación de bases en el DNA puede ser detectada con una alta sensibilidad con ayuda de endonucleasa III o formamidopiridina-DNA-glicosilada *in vivo* e *in vitro* (Collins, 1993; Dennog, 1996).

Sistema de evaluación.

El análisis de las laminillas del ensayo cometa puede ser reportado usando varios métodos diferentes, incluyendo métodos manuales y análisis de imagen automatizadas o computarizadas. El método manual usado por Gedik (1992), es donde los cometas son medidos visualmente y clasificados de acuerdo con la forma del cometa. La forma del cometa refleja el daño y las imágenes son definidas en grados 0, 1, 2, 3 y 4 donde 0 indica que no existe daño y 4 indica un daño máximo. Otros investigadores miden el diámetro del núcleo y la longitud total de la imagen directamente usando un micrómetro ocular (Fig. 7).



Fig. 7.- Parámetros para el sistema de evaluación por micrómetro ocular.

Otro método manual es donde se mide la longitud de la cola del cometa, el diámetro del núcleo y el área del cometa son medidos usando calibradores y transparencias gráficas (McKelvey, 1990). El sistema de análisis de imagen provee un rango de parámetros cuantitativos que describen propiedades densitométricas y geométricas del cometa que no pueden ser cuantificadas en un análisis manual (Olive, 1990; MCKelvey, 1992) (McCarthy, 1997; Singh, 1998).

Características de los donadores.

En el caso de los donadores, la parte ocupacional, el tipo de vida y la exposición ambiental a genotóxicos pueden influir en los resultados que se muestran en el ensayo cometa, ya que se necesitan niveles bajos de exposición debido a la gran sensibilidad del ensayo.

La exposición ocupacional a pesticidas, benceno, gases anestésicos, radiaciones y estireno causan un incremento significativo de daño al DNA, así mismo contaminantes ambientales exhiben un daño significativo al DNA.

El efecto del tabaco del cigarro en los fumadores, muestran un incremento significativo de la ruptura de las cadenas en el DNA, esto no tiene ninguna correlación con el número de cigarrillos que se fumen durante el día; usualmente los fumadores muestran un incremento en la respuesta a los agentes mutagénicos mayor que la que presentan los no fumadores.

El ejercicio físico excesivo muestra un incremento significativo en el daño al DNA en comparación con el daño bajo condiciones normales, aunque puede disminuirse cuando se consumen suplementos alimenticios que contengan vitamina E (Kassie et al; 2000).

Entre las personas sanas la variabilidad a la respuesta de las pruebas de genotoxicidad es mínima, no así las personas que cursan por una enfermedad aguda o crónica.

En el caso de enfermedades hereditarias, se ha encontrado que las células de los pacientes con ataxia telangiectasia, son más sensibles que las células normales, lo que era de esperarse; sin embargo, también encontraron que las células de los heterocigotos fueron las más sensibles a los efectos citotóxicos del arsénico.

Las muestras de sangre deben ser tomadas de donadores sanos, que no cursen alguna infección viral o reciban tratamiento con algún medicamento (Anderson 1989). Si se trata de un estudio en el que se tomaran muestras en diferentes días, la toma de muestra, deberá realizarse a la misma hora y bajo condiciones semejantes, conservando la menor cantidad de variaciones o variantes posibles.

Capítulo 7 :
COMPUESTOS

CARBAMATOS

Los carbamatos también llamados uretanos, son compuestos orgánicos que tienen un grupo $-NH_2$, $NHR-$ o $-NR_2$ unido a un grupo carbonilo de éster. La estructura básica de los carbamatos es la siguiente: (Fessenden y Fessenden, 1983).

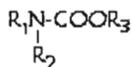


Fig.8. Estructura básica de los Carbamatos (Fessenden y Fessenden, 1983).

Así como los ésteres del ácido fosfórico, los ésteres del ácido carbámico se usan como insecticidas. Algunos de estos compuestos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Derivados del Ácido Carbámico y sus Usos.

DERIVADO CARBÁMICO	USOS
Aldicarb	Plaguicida
Carbofuran	Plaguicida
Metomil	Plaguicida
Propoxur	Plaguicida
Carbaryl	Plaguicida
Uretano	Actividad antimitótica
Aponal	Hipnótico
Hedonal	Hipnótico
Aleudrin	Hipnótico
Voluntal	Hipnótico
Albendazol	Antihelmíntico

(Córdoba, 2002)(Di Palma, 1989)(Goldsmith,1995)

Existen tres clases principales de pesticidas carbámicos, los derivados de los ésteres, usados como insecticidas y nematocidas que generalmente son estables y poseen una baja solubilidad en agua. Los carbamatos herbicidas que contienen grupos aromáticos o alifáticos y los carbamatos funguicidas que contienen el grupo bencimidazólico (Lu, 1992).

Modo de Acción.

Los ésteres del ácido carbámico, conducen a la muerte de los insectos por medio del bloqueo a la acetilcolinesterasa. Los síntomas de intoxicación son similares a los que se observan por envenenamiento con los ésteres del ácido fosfórico. La carbamilación de la enzima es inestable y la regeneración de ésta relativamente rápida comparada con el efecto de fosforilación producida por los insecticidas organofosforados (Ronaldi, 1984).

La acetilcolinesterasa es una esterasa que contiene serina, lo que induce la acción del neurotransmisor acetilcolina para producir colina y ácido acético; siendo ésta un mediador sináptico de los impulsos nerviosos en mamíferos e insectos; por lo que una sobredosis de carbamatos producirían constricción de las pupilas, debilidad o espasmos musculares, fallas respiratorias, baja en la presión sanguínea e inclusive paro cardíaco. Las convulsiones pueden ser rigidez de los miembros o dar rápidos movimientos involuntarios (Lu, 1992; Terry, 1999).

La terapia consiste en el uso indirecto de parasimpaticomiméticos, la hidrólisis de la serina del ácido carbámico es mucho más lenta que la hidrólisis de acetilserina. Más del 80% de la sustancia absorbida es eliminada antes de las 24 horas.

Toxicidad

La toxicidad de los diferentes carbamatos va, desde una alta toxicidad hasta sólo ligera toxicidad o prácticamente no tóxicos. La dosis LD_{50} reportada para la rata es de un rango mínimo que va de 1mg/Kg hasta por encima de 5g/Kg. Para ciertos metilcarbamatos la LD_{50} es 20 veces o más la correspondiente dosis efectiva cincuenta, además existe una relación dosis efecto, entre la severidad de los síntomas y el grado de inhibición de la colinesterasa (Hernández, 1990).

La toxicidad dérmica de los carbamatos es baja o moderada; una excepción es el aldilcarbamato debido a su alta toxicidad. Algunos carbamatos son muy tóxicos como lo es el caso del tiocarbamato, que causa neurotoxicidad, esto incluye ataxia que es asociada con una desmielinización del nervio y una parálisis ascendente. Sin embargo el carbaril por ejemplo, requiere dosis orales muy altas para producir una ataxia. Algunos autores concluyen que se requiere administrar repetidamente altas dosis para inducir neuropatologías típicas como las que se presentan con el uso de insecticidas organofosforados (Hernández, 1990; Klaassen, 1996).

Se han reportado evidencias de los efectos tóxicos crónicos de los carbamatos, que en esencia muestran que se requieren grandes dosis para producir alteraciones en el ciclo estral o inducir un impedimento en la fertilidad. Sin embargo se ha observado efectos teratogénicos en conejos alimentados con carbaril entre el día 6 y el 18 de gestación e incremento en el número de abortos en monos preñados durante la administración. En un estudio de 22 meses se observó un decremento en los niveles de hemoglobina en ratas hembras administradas diariamente con 400 ppm de carbaril en el alimento (Ronaldi, 1984; Russell, 1992).

NUEVOS DERIVADOS CARBÁMICOS

Se probaron diferentes 4-R-fenilcarbamatos de metilo y 4-R-fenilcarbamatos de etilo. Estos compuestos fueron sintetizados y proporcionados por el Laboratorio de Química Medicinal de la Unidad de Postgrado de la FESC. La reacción general de la síntesis de estos se ilustra a continuación.

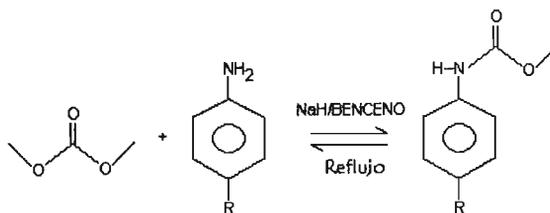


Fig. 9. Reacción general de la síntesis de 4-R-fenilcarbamatos de metilo (Fessenden; 1983).

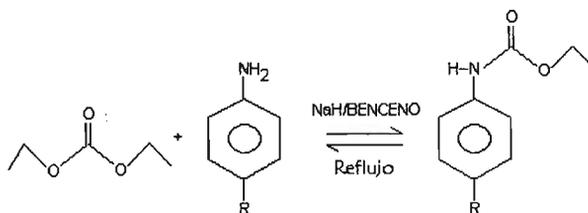


Fig.10. Reacción general de la síntesis de 4-R-fenilcarbamatos de etilo. (Fessenden; 1983).

TABLA 2: Nombre y estructura de los Compuestos carbámicos.

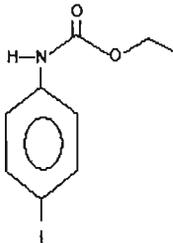
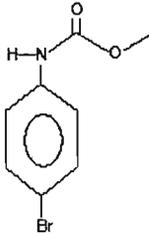
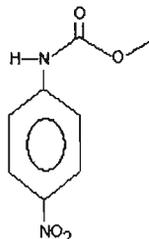
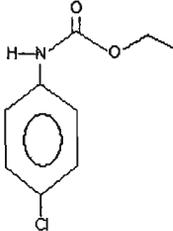
COMPUESTO	ESTRUCTURA	NOMBRE
LQM 901		p-Iodofenilcarbamato de etilo.
LQM 904		p-Bromofenilcarbamato de metilo.
LQM 930		p-Nitrofenilcarbamato de metilo.
LQM 996		p-Clorofenilcarbamato de etilo.

TABLA 3: Propiedades Físicas de los compuestos carbámicos de éste estudio.

COMPUESTO	APARIENCIA	SOLUBILIDAD
LQM 901 p-Iodofenilcarbamato de etilo	Cristales en forma de agujas grandes de color amarillo, sin olor.	Soluble en DMSO, acetona, cloroformo y etanol. Insoluble en agua.
LQM 904 p-Bromofenilcarbamato de metilo	Cristales pequeños de color café, sin olor	Soluble en DMSO, Acetona, Cloroformo y Etanol. Insoluble en Agua.
LQM 930 p-Nitrofenilcarbamato de metilo	Cristales pequeños de color amarillo-café. Sin olor	Soluble en DMSO, acetona, cloroformo y etanol. Insoluble en agua.
LQM 996 p-Clorofenilcarbamato de etilo	Cristales en forma de agujas de tamaño mediano, color café. Sin olor	Soluble en DMSO, acetona, cloroformo y etanol. Insoluble en agua.
Albendazol	Polvo blanco, sin olor.	Soluble en DMSO. Insoluble en acetona, cloroformo, etanol y agua.
Mebendazol	Polvo blanco, sin olor.	Soluble en DMSO. Insoluble en acetona, cloroformo, etanol y agua.
Metronidazol	Polvo de aspecto cristalino ligeramente amarillo, sin olor.	Soluble en DMSO. Ligeramente soluble en acetona. Insoluble en cloroformo, etanol y agua.

PRINCIPALES ANTIPARASITARIOS INTESTINALES

ALBENDAZOL

El albendazol actúa sobre las larvas y las formas adultas de los nemátodos gastrointestinales y pulmonares y las formas adultas de los céstodos y tremátodos. Es más eficaz contra *Áscaris lumbricoides*, *Enterovius vermicularis*, *Anquilostoma duodenalis*, *Nicator americanis*, *Trichinella trichura*, *Tricomonas vaginalis*, *Taenia saginata*, *T. Solium*, *Hymenolepis nana* y *Fasciola hepática*.

Su efecto se atribuye a que inhibe la polimerización de tubulina, y por lo tanto, depleta los niveles energéticos hasta que estos llegan a ser insuficientes para la sobrevivencia de los parásitos. De este modo el albendazol, inicialmente inmoviliza y después mata a los helmintos susceptibles.

Después de su administración oral se absorbe aproximadamente un 5% a través de la mucosa gastrointestinal y alcanza concentraciones plasmáticas máximas a las 3 horas, se distribuye en todo el organismo y la mayor concentración se obtiene en el hígado y en los riñones. Se metaboliza en el hígado, donde se produce sulfóxido de albendazol, su metabolito principal, que se elimina lentamente en la orina y en las heces.

A la dosis de 6.6 mg/Kg. de albendazol la concentración en plasma de su principal metabolito, alcanza un máximo de 0.25 a 0.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La vida media del sulfóxido de albendazol en el plasma es de aproximadamente 8.5 horas.

El albendazol presenta efecto teratogénico y embriotóxico en ratas y conejos. Fue negativa la evidencia de mutagénesis y genotoxicidad en pruebas *in vitro* e *in vivo*. En estudios de toxicidad a largo plazo efectuados en ratas y ratones con dosis diarias por arriba de 30 veces la dosis recomendadas para el humano, no se observó formación tumoral relacionada con el tratamiento (Vandemecum Farmacéutico, 2002)(Merck Index, 1989).

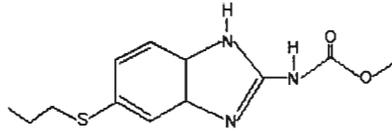


Fig. 11. Estructura química del Albendazol
(Merk Index; 1989).

MEBENDAZOL

Es utilizado para la erradicación de infestaciones intestinales debidas a nemátodos y/o protozoarios como tricocéfalos, áscaris, uncinarias oxiuros, anquilostomas, estrogiloides, giardias, trichomonas y en casos de amibiasis intestinal.

El mebendazol a concentraciones bajas, bloquea la captación de glucosa por el helminto, provocando una depresión de glucógeno y del adenosin trifosfato (ATP), necesarios para la sobrevivencia del parásito, lo que ocasiona su muerte. Aún a dosis elevadas no se afecta el metabolismo de la glucosa de los mamíferos. Por ser un medicamento prácticamente insoluble, se absorbe solo parcialmente en el tracto digestivo, 90% de la dosis aparece sin alteración en las heces. La porción absorbida se metaboliza por descarboxilación transformándose en la amina correspondiente, los metabolitos se excretan en la orina para totalizar el 10% restante.

No se han demostrado efectos teratógenicos en humanos. En ratas preñadas el mebendazol tuvo efectos teratógenicos, por lo que no se recomienda su uso durante los primeros meses de embarazo (Vandemecum Farmacéutico, 2002)(Merck Index, 1989).

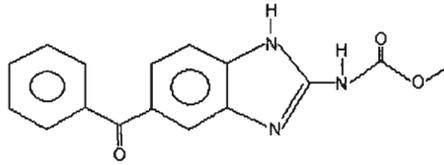


Fig.12. Estructura química del Mebendazol
(Merk Index; 1989).

METRONIDAZOL

El metronidazol se absorbe rápidamente por vía oral y su biodisponibilidad es de aproximadamente 100% alcanzando concentraciones plasmáticas máximas 1 hora después de su administración. El metronidazol administrado por vía I.V. alcanza concentraciones plasmáticas de $25\mu\text{g/mL}$ que han sido reportadas en pacientes a quienes se les ha administrado dosis de 15mg/Kg. de peso corporal, seguidas de 7.5mg/Kg. cada 6 horas. El metronidazol se distribuye en la mayor parte de los tejidos y líquidos corporales, incluyendo líquido cefalorraquídeo, bilis, saliva, líquido pleural y peritoneal, secreciones vaginales, leche materna, líquido del oído medio, líquido seminal, abscesos hepáticos y cerebrales y huesos. Cruza con facilidad barrera placentaria y hematoencefálica.

Menos del 20% del metronidazol se encuentra unido a proteínas plasmáticas. El metronidazol se metaboliza en el hígado por oxidación de sus cadenas laterales y conjugación de glucurónidos formando los siguientes metabolitos oxidativos: 1-(2-hidroxiacetil)-2-hidroxiacetil-5-nitroimidazol, el cual tiene actividad antibacteriana, es detectado en plasma y en orina; y el ácido 2-metil-5-nitroimidazol, no tiene actividad antibacteriana y no es frecuente que se detecte en plasma, pero es excretado en orina.

Pequeñas cantidades de metabolitos reducidos, acetamidas y ácido oxámico-N-(2-hidroxiacetil), han sido detectados en orina y probablemente se forman por la

flora intestinal. La vida media de eliminación plasmática es de 8 horas. Casi 60 a 80% de las dosis se excretan como compuesto de origen o sus metabolitos. Un 20% de la dosis de metronidazol se excreta sin cambios por orina; 6 a 15% se excreta por heces.

Su acción antiprotozoaria depende de su reducción química intracelular; en estas condiciones interactúa con el DNA y produce pérdida de la estructura helicoidal y rompimiento de las cadenas. Estas acciones inhiben la síntesis de ácidos nucleicos y producen muerte celular. El fármaco es activo en sitios intestinales y extraintestinales. Actúa contra la mayor parte de bacterias anaerobias y protozoarios, incluyendo *Bacteroides fragilis*, *B. Melaninogénicus*, *Fucobacterím*, *Vermiollena*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Entamoeba histolytica*, *Tricomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* y *Balantidium coli*.

Una revisión de la evidencia disponible hecha en 1983, por Roe, concluyó que el metronidazol podría ser usado sin temor de riesgo carcinogénico o mutagénico y que aparentemente está libre de potencial teratogénico. Sin embargo un estudio posterior demostró que el uso del metronidazol en forma crónica, en animales, puede llegar a ser carcinogénico; por lo que se deberá evitar su uso en forma indiscriminada (Vandemecum Farmacéutico, 2002)(Merck Index, 1989).

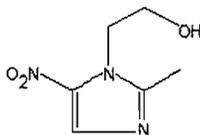


Fig.13. Estructura química del Metronidazol
(Merk Index; 1989).

III. OBJETIVO E HIPÓTESIS

OBJETIVO

El objetivo de la presente investigación fue realizar la primera evaluación del daño al DNA, con el ensayo cometa, a un grupo de 4 derivados carbámicos, en comparación con compuestos empleados como antiparasitarios de primera elección con la finalidad de establecer si son candidatos factibles en la terapéutica humana.

HIPÓTESIS

Si el efecto genotóxico mostrado por los compuestos derivados del ácido carbámico, evaluado mediante el ensayo cometa muestran un comportamiento igual o menor a los antiparasitarios de primera elección y cercano al control negativo entonces podemos identificar un compuesto líder con la finalidad de que pueda ser utilizado como una alternativa terapéutica para las infecciones intestinales provocadas por parásitos.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

IV. MATERIAL Y MÉTODO

Material.

- * Tubos de ensaye para centrífuga
- * Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml
- * Pipetas pasteur
- * Tubos de ensaye
- * Vasos de pp. de 50, 100 y 150 ml
- * Puntillas para micropipeta
- * Matraz aforado de 50, 100, 200 y 2000 ml
- * Gradillas
- * Mechero Bunsen
- * Tripié
- * Rejilla de asbesto
- * Portaobjetos esmerilados
- * Cubreobjetos largos
- * Pinzas
- * Vasos Copplin
- * Probeta de 100 ml
- * Propipetas
- * Tubos eppendorf

Reactivos

- * NaCl (Cloruro de sodio)
- * EDTA
- * Tris
- * NaOH (Hidróxido de sodio)
- * HCl (Ácido clorhídrico)
- * Tritón X-100
- * DMSO (Dimetil sulfóxido)
- * Medio McCoy 5A modificado

- * PBS (Solución buffer de fosfatos)
- * Acetona
- * AN (Agarosa normal) y LMPA (Agarosa de bajo punto de fusión)
- * Agua desionizada
- * Agua destilada
- * Ficoll-Hypaque
- * Heparina
- * H₂O₂ (Peróxido de Hidrógeno)

Equipo

- * Centrifuga clínica
- * Microcentrifuga
- * Estufa de incubación
- * Cámara de electroforesis
- * pH-metro
- * Balanza analítica
- * Balanza granataria de doble plato
- * Microscopio de fluorescencia
- * Microscopio óptico
- * Autoclave
- * Campana de flujo laminar

Método

Preparación de la Solución del Compuesto.

- * Todos los compuestos se prepararon de la siguiente manera: Se pesó 0.005g., 0.025g. y 0.050g disolviéndose en 0.5 ml de DMSO o Acetona, según la solubilidad del compuesto, para obtener las concentraciones de 10, 50 y 100 mg/mL.

Toma de muestra.

- * Se tomó en una jeringa de plástico de 5ml, 0.1ml. de heparina en solución acuosa.
- * Con la misma jeringa se tomaron mediante punción venosa 5ml. de sangre.
- * Se mezcló suavemente la sangre con la heparina para evitar la coagulación.

Aislamiento de Linfocitos Humanos.

- * Se realizó el aislamiento de linfocitos humanos por gradiente de Ficoll-Hypaque en proporción 1:1 (sangre: Ficoll), centrifugando 30min a 2000rpm (Fig. 12).
- * Se realizaron 2 lavados con medio McCoy 5A modificado, centrifugando en cada lavado 10 min. a 1000rpm.

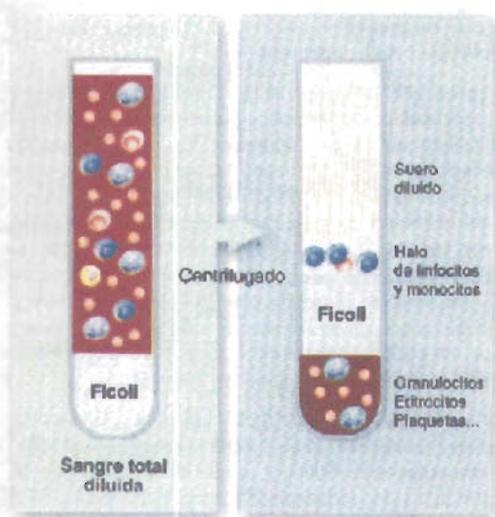


Fig.14. Separación de células mononucleares de sangre periférica mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Regueiro; 2002).

Viabilidad celular

- * Una vez obtenida la suspensión de los linfocitos (1ml.), se realizó la cuenta viable (% de viabilidad celular), colocando 0.1ml de la suspensión celular y 0.9ml. de azul de tripán (0.5%), se mezcló y se cargó el hemocitómetro.
- * Se ajustó la suspensión a 350 000cél/ml en cada microtubo de prueba. Se destinaron 4 tubos eppendorf de prueba para cada concentración del compuesto, así como para el control positivo y el control negativo, de los cuales 3 se utilizaron para preparar laminillas en las que posteriormente se evaluaría el efecto genotóxico y 1 tubo eppendorf se empleó para monitorear la viabilidad celular en cada concentración de prueba, al igual que en los controles.

ENSAYO COMETA

Preparación de laminillas

- * Se colocó la suspensión celular en un tubo eppendorff y se adicionó la cantidad adecuada para tener la concentración de $200\mu\text{M}$ de H_2O_2 (testigo positivo) en un volumen total de 1ml. Al testigo negativo se les agregó $50\mu\text{L}$ de Acetona o DMSO, en base al volumen agregado de los compuestos y la solubilidad de estos. Los tubos de prueba se les realizó el mismo procedimiento, sustituyendo el H_2O_2 por el compuesto a sus diferentes concentraciones.
- * Se colocaron las muestras en incubación a 37°C durante 60min.
- * Se tomó un tubo eppendorf, de cada una de las muestras, para realizar conteo viable como se describe anteriormente.
- * Se preparó una cámara con solución de lisis pH 10 (NaCl 2.5M, Na_2EDTA 100mM, Tris 10mM, NaOH 10N, Tritón X-100 y DMSO) y se colocó en refrigeración.
- * Se rotuló un lado del portaobjetos, se colocó una capa de $150\mu\text{L}$ de agarosa normal 0.75% por la parte completamente esmerilada y se colocaron sobre paquetes congelantes.

- * Después de la exposición, se centrifugaron los tubos durante 1min.
- * Se decantó la mayor cantidad posible de sobrenadante, y se resuspendió la pastilla de cada tubo en 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA) 0.5% A 37°C y se colocaron como capa sobre cada laminilla previamente preparada
- * Se dejó solidificar la agarosa y después se removieron los cubreobjetos con cuidado y se colocaron las laminillas verticalmente en la solución de lisis fría; colocando los vasos Coplin en el refrigerador durante 24-48hrs.

Corrimiento de Electroforesis.

- * Se retiraron suavemente los portaobjetos de la solución de lisis y se colocaron en la cámara de electroforesis.
- * Se llenó la cámara con el buffer de electroforesis pH 13, recientemente preparado, hasta que cubrió los portaobjetos (evitando la formación de burbujas sobre la agarosa) y se dejaron en estas condiciones durante 25min. (unwinding)
- * Se corrió la electroforesis durante 25min a 25V y 300mA ajustando con el incremento o disminución del nivel de buffer de electroforesis.
- * Una vez terminada la electroforesis se levantaron los portaobjetos de la cámara y se gotearon hasta cubrirlos con buffer de neutralización por al menos 5min., repitiendo este procedimiento dos veces más.
- * Se conservaron los portaobjetos en cámara húmeda hasta 72hrs. a 4°C.

Tinción de las preparaciones.

- * Se adicionó a las laminillas 20-30 μ L del colorante de yoduro de propidio (5 μ g/ml) y se montaron con un cubreobjetos.

Evaluación del daño al DNA.

- * Las observaciones se realizaron usando un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560nm y un filtro barrera de 590nm, usando un micrómetro ocular y el objetivo de 40X.
 - Las evaluaciones se realizaron en 50 células por cada concentración del compuesto, así como el testigo positivo y negativo; dichas evaluaciones fueron:
- * Medida del diámetro del núcleo celular
- * Medida de la longitud del núcleo celular.

Análisis estadístico.

- * La relación longitud / diámetro se obtuvo a partir de los valores del análisis celular microscópico en el que se midió la longitud y el diámetro de cada una de 50 células en los diferentes grupos experimentales.
- * Los grupos de 50 resultados fueron tratados estadísticamente.

V. RESULTADOS

El porcentaje de viabilidad nos mostró, que derivados carbámicos, y a que dosis poseen efecto citotóxico; esto se realizó con el fin de asegurar que la evaluación del daño al DNA, es causada exclusivamente por los derivados carbámicos (Tabla 4).

TABLA 4: Porciento de Viabilidad mediante la Prueba con Azul de Tripán.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (μM)	% DE VIABILIDAD
LQM 901	2.38	99.4
	11.91	95.6
	23.82	94.7
LQM 904	2.17	80.0
LQM 930	2.55	99.5
	12.75	99.2
	25.51	97.8
LQM 996	2.50	96.5
	12.53	92.2
	25.06	91.7
METRONIDAZOL	2.92	99.1
	14.60	98.0
MEBENDAZOL	1.69	98.9
	8.46	97.3
	16.93	97.0
ALBENDAZOL	1.85	98.5
	9.42	97.3
	18.84	97.0
TESTIGO POSITIVO (H_2O_2)	200	92.5
TESTIGO NEGATIVO	5% (v/v)	91.2

La relación que se muestra en las medias de la relación longitud total de la imagen/diámetro del núcleo (L/D), de los diferentes derivados carbámicos, nos permite explicar el grado de daño que causan estos al DNA (efecto genotóxico) en base a la dosis a la que fueron expuestos los linfocitos (Tabla 5).

TABLA 5. Relación Longitud total de la imagen / diámetro del núcleo (L/D)

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN μM	RELACIÓN L/D (media y desviación estándar)
LQM 901	2.38	1.42 0.085*
	11.91	1.75 0.41*
	23.82	1.40 0.21*
LQM 904	2.17	1.37 0.22*
LQM 930	2.55	1.39 0.18*
	12.75	1.30 0.13*
	25.51	1.39 0.18*
LQM 996	2.50	1.04 0.08*
	12.53	1.08 0.15*
	25.06	1.14 0.17*
METRONIDAZOL	2.92	1.02 0.07*
	14.60	1.17 0.33*
MEBENDAZOL	1.69	1.13 0.20*
	8.46	1.05 0.11*
	16.93	1.17 0.07*
ALBENDAZOL	1.88	1.0 0.00
	9.42	1.0 0.00
	18.84	1.01 0.04
TESTIGO POSITIVO (H ₂ O ₂)	200	2.50 0.00
TESTIGO NEGATIVO	5% (v/v)	1.00 0.00

*= diferencia estadística significativa con respecto al testigo negativo. P=HSD-Tuckey $\alpha=0.05$ (Daniel; 2002).

GRAFICO 1 COMPUESTO LQM 901
MEDIA DE LA RELACION L/D vs. CONCENTRACION

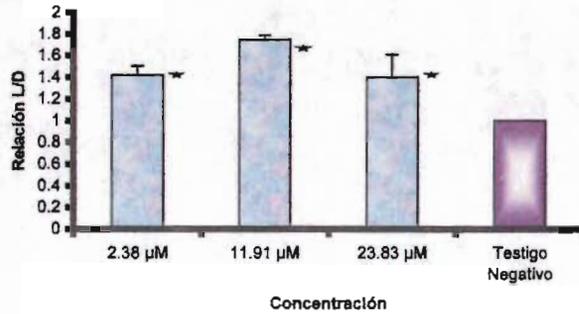
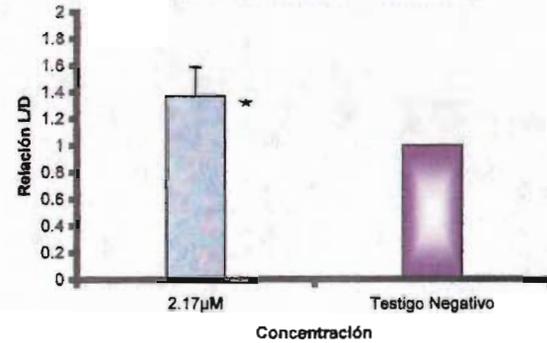


GRAFICO 2 COMPUESTO LQM 904
MEDIA DE LA RELACION L/D vs. CONCENTRACION



GRAFICA 3 COMPUESTO LQM 930
MEDIA DE LA RELACION L/D vs. CONCENTRACION

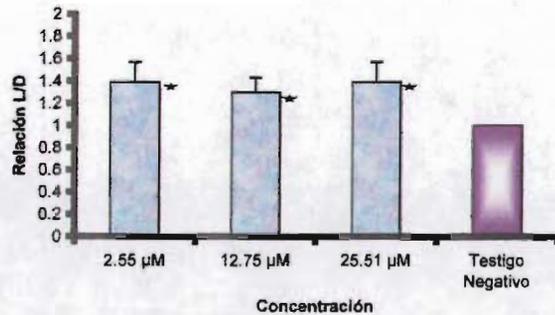


GRAFICO 4 COMPUESTO LQM 996
MEDIA DE LA RELACION L/D vs. CONCENTRACION

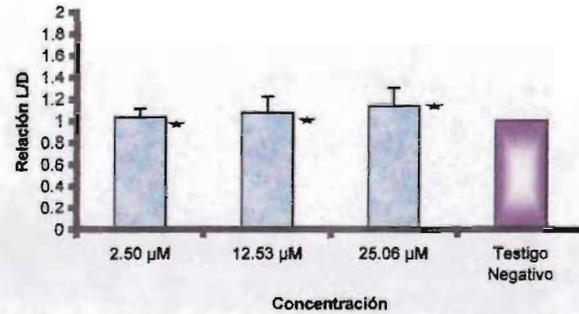


GRAFICO 3 METRONIDAZOL
MEDIA DE LA RELACIÓN L/D vs. CONCENTRACIÓN

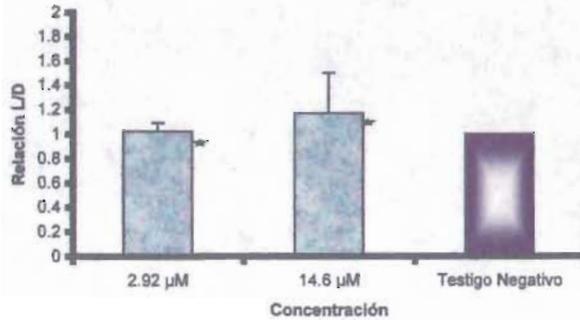


GRAFICO 6 MEBENDAZOL
MEDIA DE LA RELACIÓN L/D vs. CONCENTRACIÓN

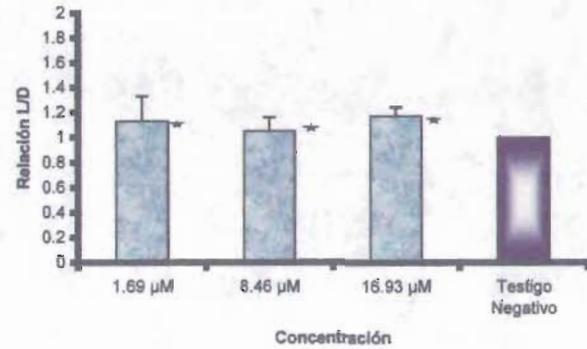


GRAFICO 7 ALBENDAZOL
MEDIA DE LA RELACIÓN L/D vs. CONCENTRACIÓN

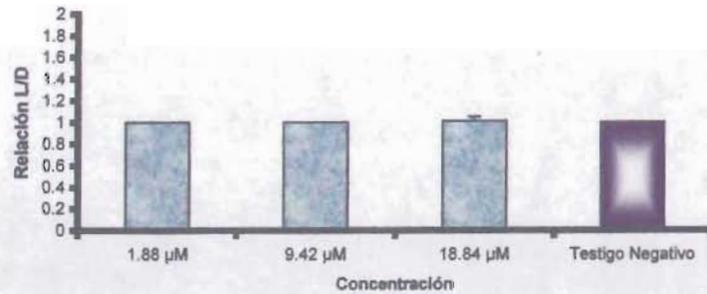


GRAFICO 8 COMPUESTO LQM 901
% DE CÉLULAS vs. RELACIÓN L/D

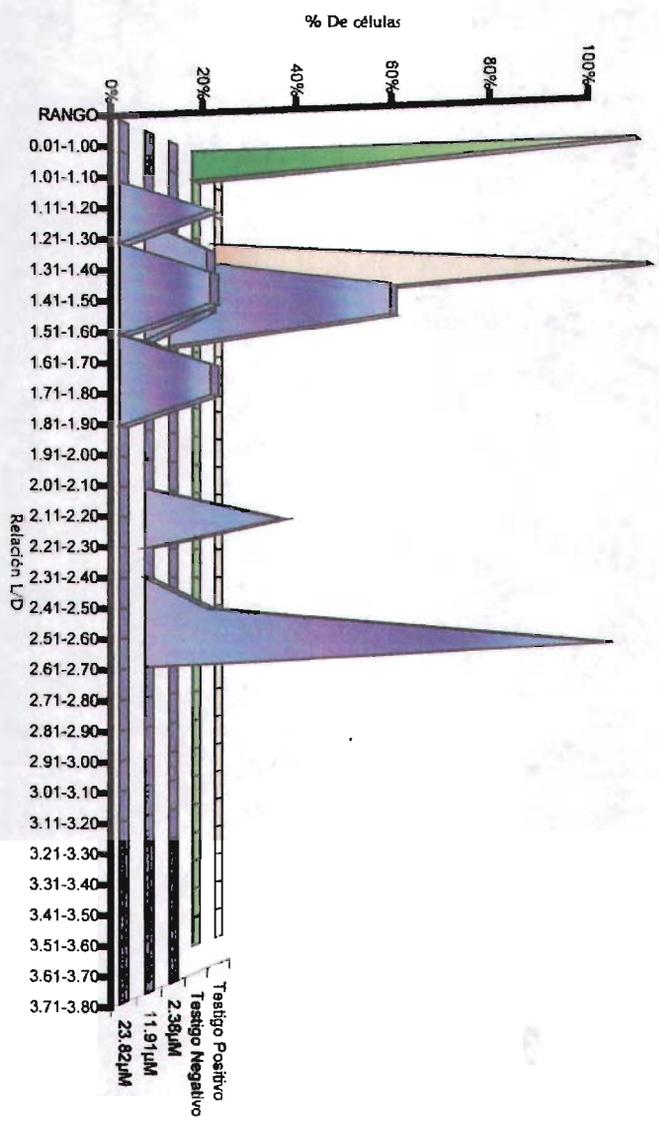


GRAFICO 9 COMPUESTO LQM 904
% DE CÉLULAS vs. RELACIÓN L/D

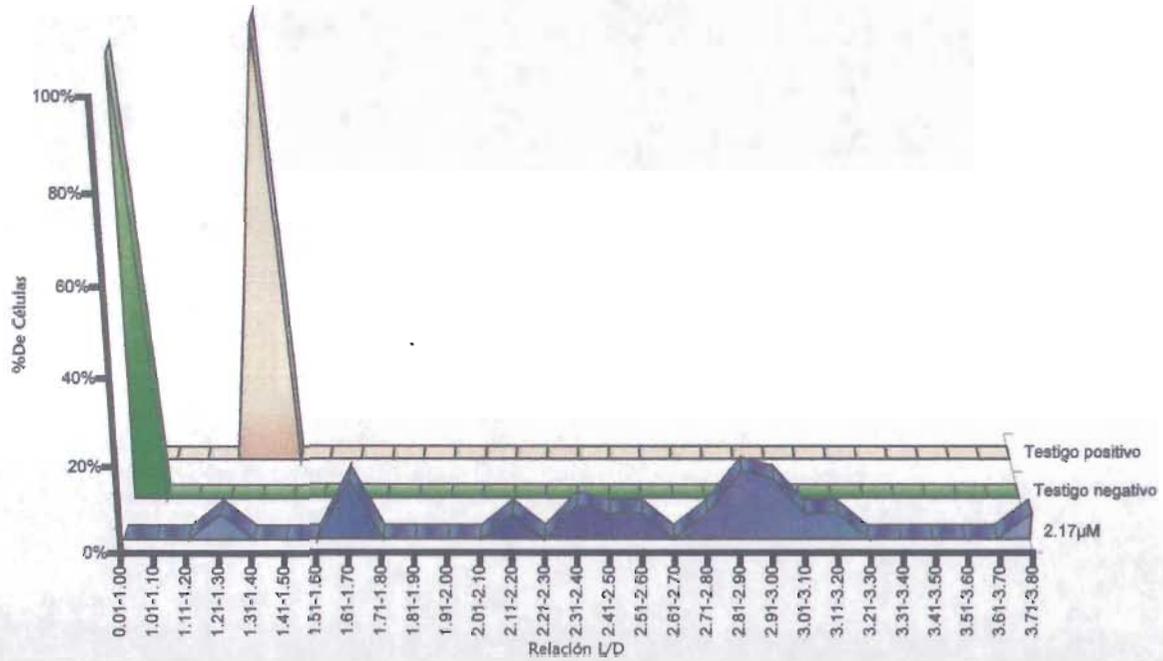


GRAFICO 10 COMPUESTO LQM 930
% DE CÉLULAS vs. RELACIÓN L/D

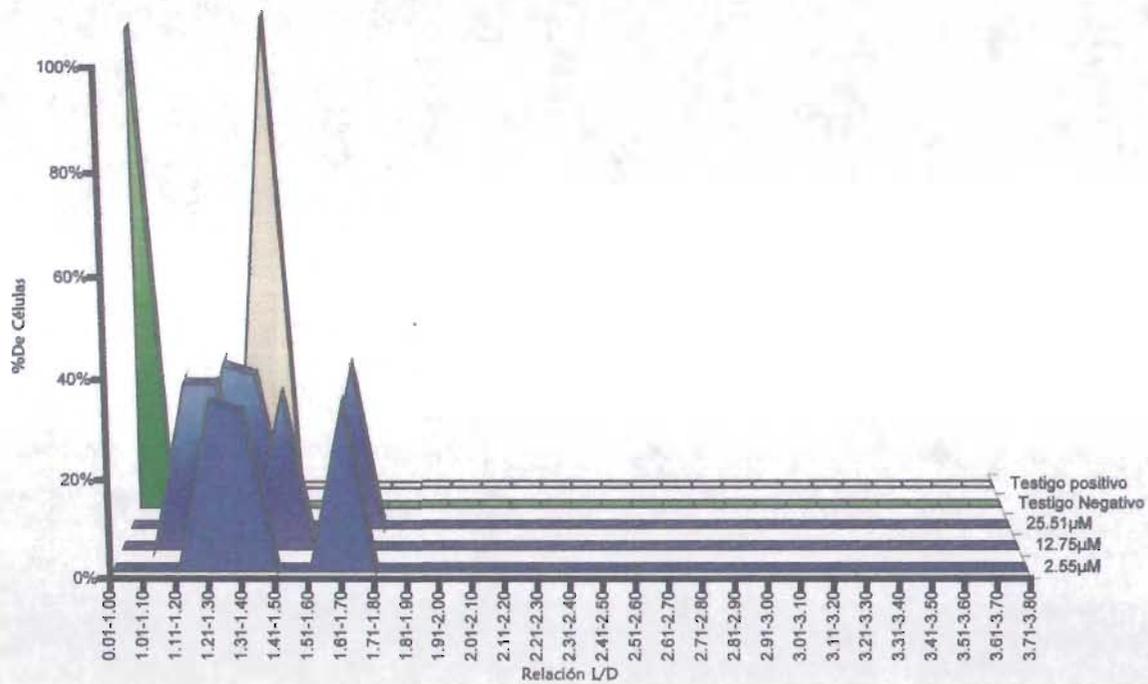


GRAFICO 11 COMPUESTO LQM 996
% DE CÉLULAS vs. RELACIÓN L/D

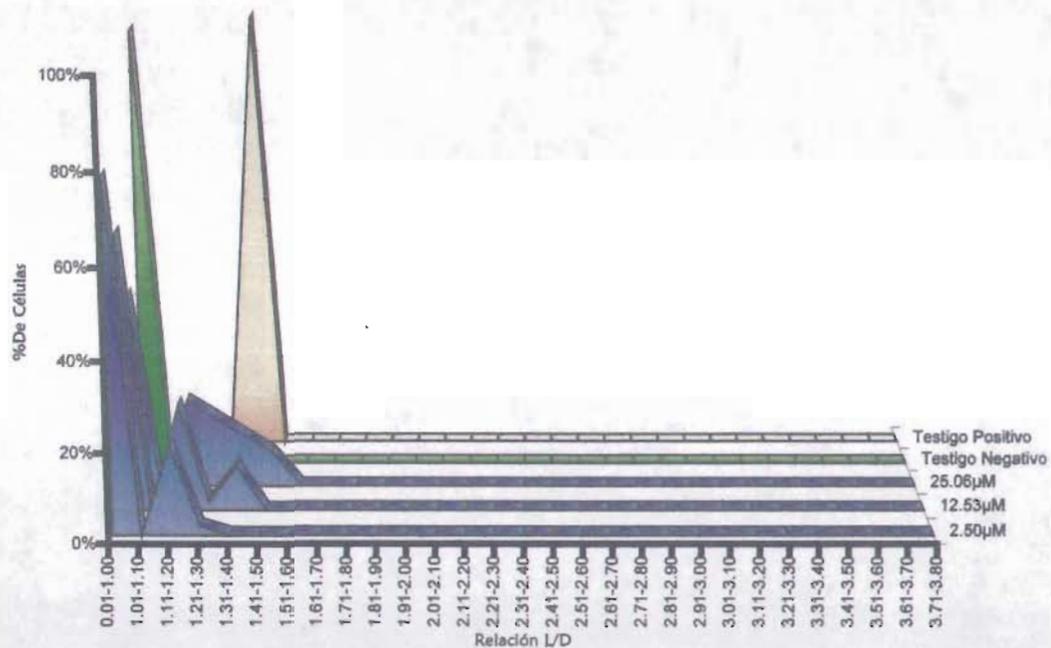


GRAFICO 12 ALBENDAZOL
% DE CÉLULAS vs. RELACIÓN L/D

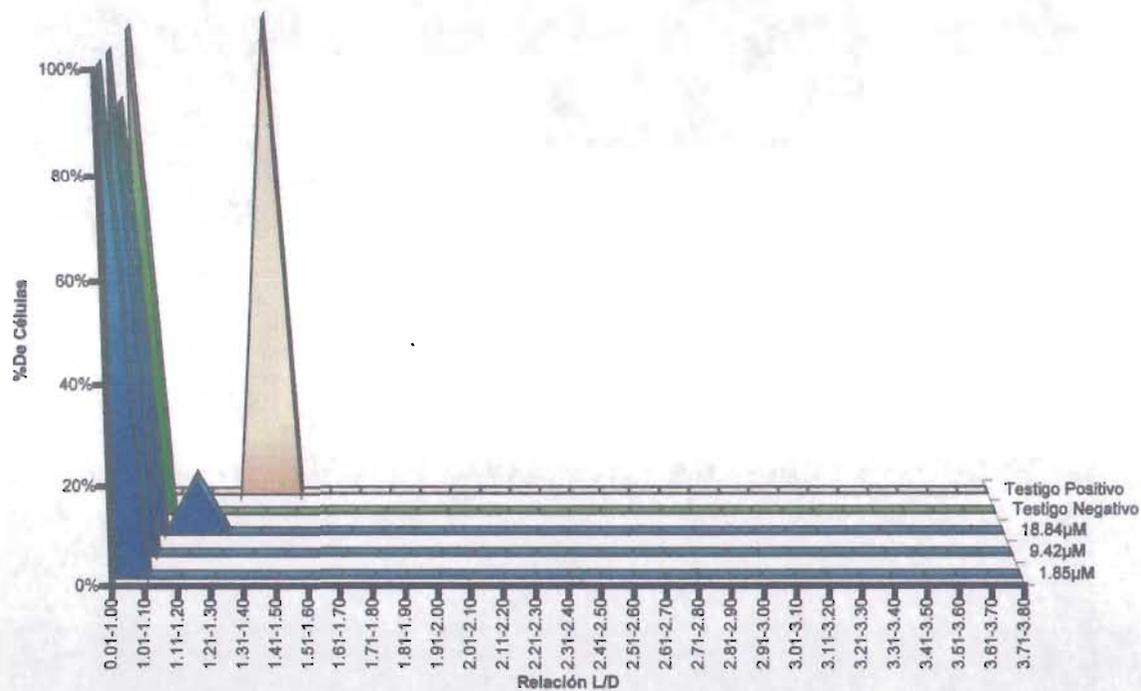


GRAFICO 13 METRONIDAZOL
% DE CÉLULAS vs. RELACIÓN L/D

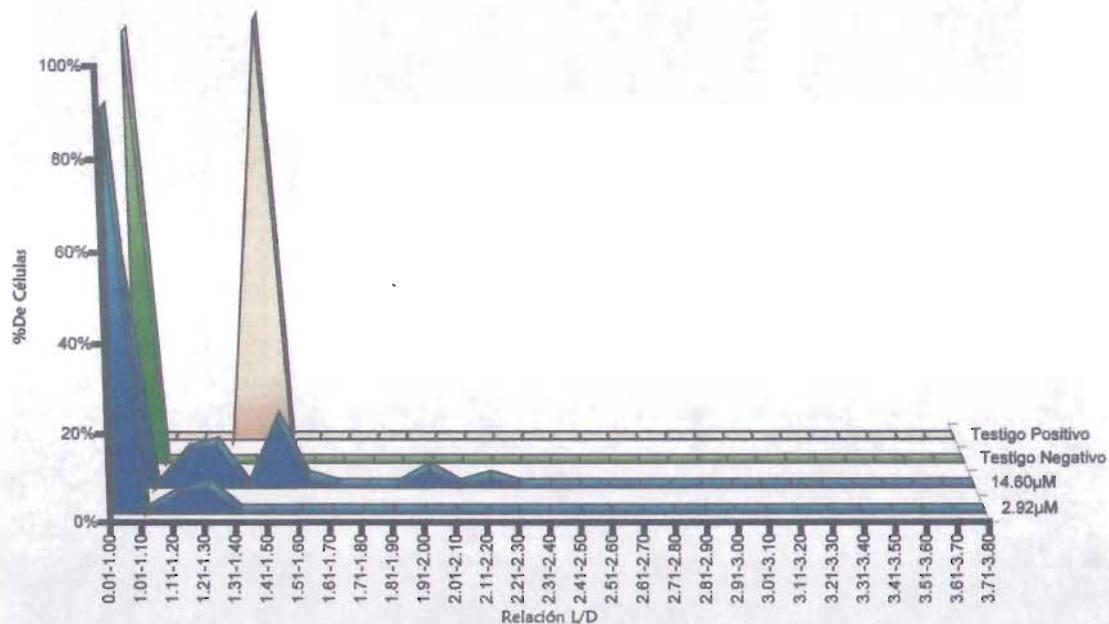


GRAFICO 14 MEBENDAZOL
% DE CÉLULA vs. RELACIÓN L/D

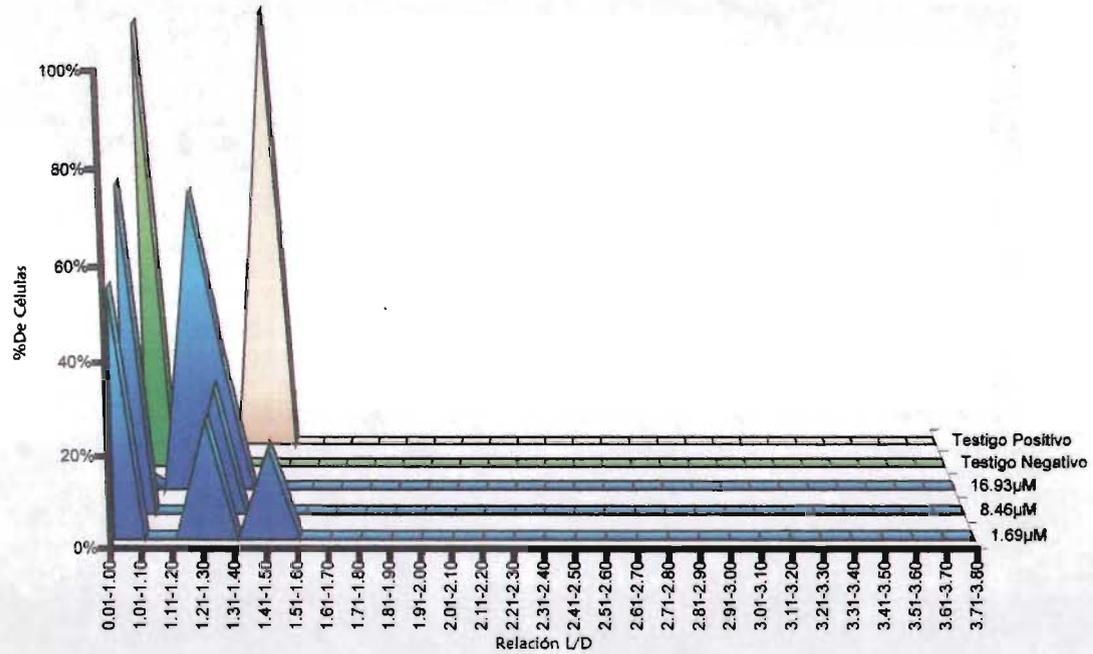


GRÁFICO 15: COMPARATIVO DE DISTRIBUCIÓN DE DAÑO DE LOS COMPUESTOS CARBÁMICOS

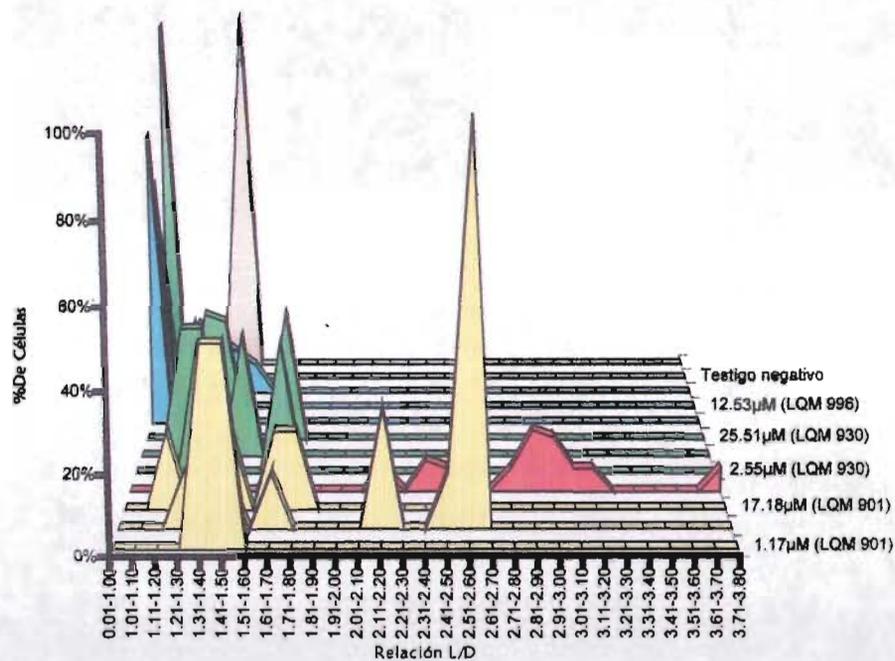
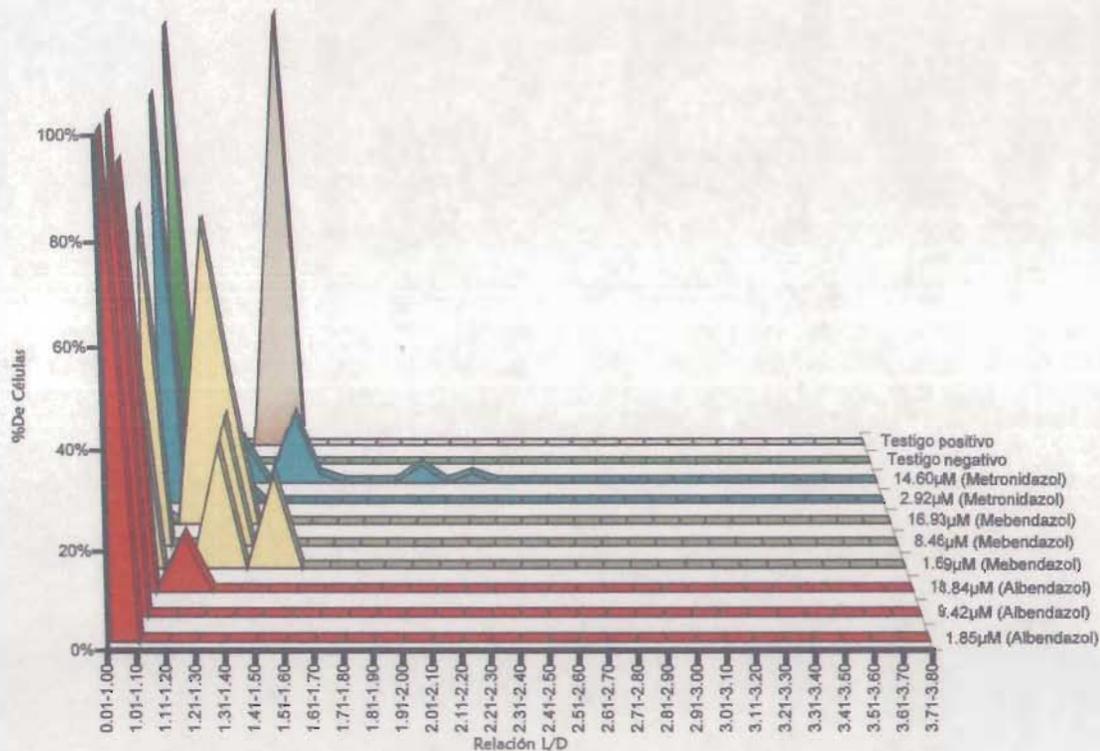


GRÁFICO 16: COMPARATIVO DE DISTRIBUCIÓN DEL DAÑO DE ANTIPARASITARIOS DE PRIMERA ELECCIÓN



VI. DISCUSIÓN

El estudio de la citotoxicidad es una parte integral del análisis del cometa puesto, que la citotoxicidad produce las rupturas de los filamentos del DNA aumentando la migración, por ello se recomienda que el análisis del cometa no se deba realizar en las muestras que presentan una citotoxicidad mayor al 20% (Carbonell et al., 1994).

En base a los resultados se observa que el compuesto LQM 904, tiene una gran citotoxicidad, por lo que sólo se trabajó la concentración más baja que es de $2.17\mu\text{M}$, la cual presenta una viabilidad del 80%.

Este compuesto presenta como sustituyente un átomo de Bromo, el Bromo por densidad electrónica desestabiliza la cadena de DNA, el grupo metilo de la Timina es remplazado por el átomo de Bromo, ejerce su actividad mutagénica que aumenta por el gran poder de movilización de electrones del Bromo comparado con el grupo metilo de la Timina, dando como resultado un aumento en la citotoxicidad (Lewin, B. 1997).

Los compuestos LQM 901, LQM 930 y LQM 996, no presentan citotoxicidad por lo que se trabajó con las tres concentraciones elegidas, por su parte en los antiparasitarios la citotoxicidad fue muy baja ya que se obtuvieron porcentajes del 0.9% al 3.0% de citotoxicidad (Tabla 4).

En base a los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos (LQM901, LQM904, LQM930 y LQM996), indicaron un incremento del daño al DNA, visualizado por el ensayo cometa en linfocitos, que se correlaciona con el incremento de las concentraciones.

Aunque todos los compuestos son derivados del ácido carbámico, el análisis estadístico muestra un grado de daño al DNA diferente entre ellos, considerando la media de la relación L/D en base a las concentraciones (Tabla 5).

La media de la relación L/D para el compuesto LQM 901, se observó que el daño al DNA aumenta en la concentración intermedia, no observándose un incremento en la concentración más alta como se esperaría debido a que el compuesto tuvo una ligera precipitación, y por lo tanto, suponemos que no tuvo una interacción adecuada con la célula, resultando la concentración intermedia de éste compuesto la más genotóxica de los compuestos estudiados (Grafico 1).

Para la primera concentración de todos los compuestos se observó una correlación entre LQM 901, LQM904 y LQM 930, ya que la media de la relación L/D es similar, no así en el compuesto LQM 996 ya que éste estuvo muy por debajo de las medias de los compuestos anteriores y muy cerca de la media del testigo negativo (Graficos 1, 2, 3 y 4).

Para la concentración intermedia, se observó una ligera disminución de la media de la relación L/D, en el compuesto LQM 930, y en el compuesto LQM 996, si se observó un ligero aumento en la media de la relación L/D, correlacionándose con el incremento de la concentración (Grafico 3 y 4).

Para la última concentración los valores de la media de la relación L/D, mostró un ligero aumento para el compuesto LQM 996, quedando establecida la correlación que existe entre la genotoxicidad con el incremento de la concentración. Este compuesto presenta como sustituyente un átomo de Cloro, el cual puede formar aductos en el DNA, como por ejemplo en el caso del Cisplatino, el cual también tiene como sustituyente un par de átomos de Cloro, y se ha demostrado que forma aductos en el DNA (Grafico 4) (O'Connor, J; 2001).

Para el caso del compuesto LQM 930 se observó un incremento en la media de la relación L/D, pero no existe una correlación entre daño y concentración (Grafico 3).

Para la primera concentración se observó una correlación entre el Albendazol y el Metronidazol, ambos antiparasitarios mostraron medias de la relación L/D muy semejantes al testigo negativo. En cuanto al mebendazol la media de la relación L/D resultó ser mayor a los antiparasitarios y testigo negativo (Graficos 5, 6 y 7).

Para la segunda concentración el albendazol, mostró una media de la relación L/D, semejante a la que presenta el testigo negativo, con respecto al metronidazol se observó un incremento en la media de la relación L/D que se correlaciona con el incremento de la concentración, por el contrario el mebendazol presenta una media de la relación L/D disminuida y semejante al testigo negativo (Grafico 7).

En la última concentración el albendazol presentó una correlación semejante con la media de la relación L/D del testigo negativo, para el mebendazol se observó

un incremento de la media de la relación L/D, que se correlaciona con el incremento de la concentración (Grafico 6 y 7).

En el caso del metronidazol, la concentración de $29.21\mu\text{M}$, no se trabajó debido a que, a esta concentración la precipitación que presentó el compuesto impidió la lectura de las laminillas, por lo que para evitar resultados tanto negativos como positivos falsos, estas no fueron tomadas en cuenta (Grafico 5).

De los antiparasitarios el metronidazol resultó ser el más genotóxico, esto se debió a que este compuesto induce rompimiento en cadena sencilla y doble (Edwards, 1993), intercalándose preferentemente en Adenina y Timina, y creando aductos entre Citosina y Guanina, induciendo la síntesis de reparación, provocando trasversiones (GC-CG) y rompimiento del DNA (Grafico 5) (Reitz, et al 1991; Trinh and Reysset, 1998).

Para el mebendazol y el albendazol, estos compuestos no provocan daño considerable al DNA a menos, que se manejen concentraciones muy elevadas, mayores a las terapéuticas o que se agregue fracción microsomal para metabolizarlos (Grafico 6 y 7) (Dayan, 2003).

Al comparar los resultados tanto de los compuestos como de los antiparasitarios de primera elección se observó sin lugar a dudas que el compuesto elegido como líder (LQM996), presentó una genotoxicidad menor a los compuestos y parecida a los antiparasitarios por lo que se vislumbra como una alternativa real en el tratamiento de las enfermedades parasitarias, incluyendo la provocada por el *H. pylori*.

En relación a la distribución del daño se observó que en el caso del compuesto LQM 901, la genotoxicidad que presentó la concentración de $11.91\mu\text{M}$ tiene una variabilidad en la formación de cometas de diversos tamaños, sobrepasando incluso al testigo positivo, sin embargo en la primera y última dosis no se observó éste comportamiento (Grafico 8).

En el compuesto LQM 904, la genotoxicidad mostró una gran variabilidad, formando cometas que se distribuyen casi en su totalidad, fuera del rango del testigo positivo (Grafico 9).

El compuesto LQM 930, presentó una genotoxicidad con distribución uniforme, formando cometas que se encuentran en el rango del testigo negativo y positivo (Grafico 10).

El compuesto LQM 996, presentó una genotoxicidad gradual conforme a las concentraciones, que van desde un comportamiento similar al testigo negativo y cercano al positivo (Grafico 11).

En el caso de los antiparasitarios, estos mostraron una genotoxicidad con distribución uniforme, entre el testigo negativo y positivo, excepto el Metronidazol en la concentración más alta trabajada, que mostró una genotoxicidad que sobrepasa al testigo positivo, no considerado significativo (Graficos 12, 13 y 14).

Al realizar la evaluación del daño al DNA, con el Ensayo Cometa, a 4 derivados carbámicos (LQM 901, LQM 904, LQM 930 y LQM 996), se logró identificar un compuesto líder (LQM 996), ya que éste mostró un comportamiento de genotoxicidad semejante a los antiparasitarios de primera elección y muy cercano al testigo negativo, basándonos en la relación L/D que determina el grado de genotoxicidad por la formación de cometas y en la distribución del grado de daño que se obtuvieron por la variación en el tamaño de los mismos, y significativamente menor a los demás compuestos carbámicos estudiados, por lo que se vislumbra como una alternativa real en el tratamiento de las enfermedades parasitarias y también de las provocadas por *H. pylori*.

Además se a observado que en diversas pruebas que se han realizado a los derivados carbámicos, al utilizarlos como antiparasitarios en el laboratorio de parasitología de la FES Cuautitlan bajo la asesoría del MVZ Pablo Martínez L., se estudio la actividad contra *Hymenolepis nana* en ratones CD1. Los resultados mostraron que los compuestos probados a dosis de 5, 10 y 50mg/kg presentaron una eficacia del 85-95% de actividad antiparasitaria, siendo muy similar esta respuesta a la del prazicuantel (testigo), además, mediante microscopía electrónica se evidencio la desaparición de las vellosidades que recubren los proglótidos de los parásitos lo que afectaba la nutrición del organismo (Minero, 1997).

Por otro lado se evaluaron *in vitro* algunos derivados carbámicos contra *Giardia lamblia*, y se determino una concentración efectiva entre 3.80 y 18.16µg/ml,

por la Doctora Enedina Jiménez C., del Hospital Infantil de México (Jiménez et al, 2003).

Cuando se utilizan como antibacterianos como en el caso del Laboratorio de Microbiología Industrial del Posgrado de la FES Cuautitlan bajo la asesoría de la M. en C. Stella Reginensi, empleando la técnica de difusión en caja, utilizando sensidiscos impregnados con 500 y 2000µg de los derivados carbámicos. Se evaluaron 18 cepas provenientes de muestras clínicas y pertenecientes a la colección ATCC, las cuales son agentes infecciosos gastrointestinales. Los resultados mostraron que los derivados carbámicos tienen efectividad contra 13 géneros de bacterias Gram negativas al utilizar 2000µg, dentro de los cuales el género *Vibrio* figuró como el más sensible (Moreno, 1997; Bernal, 2000).

En el Laboratorio del Doctor Andrés Romeo R., en la FES Cuautitlán, se determinó la actividad de los derivados carbámicos contra *Helicobacter pylori*, mediante los métodos de Kirby Bauer y de dilución en agar, la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 12.33 a 14mm de diámetro. En el caso del compuesto LQM 996 se obtuvo una CMI de 32mg/ml (Márquez, 2002).

Actualmente, se realiza la evaluación *in vitro* de 10 derivados carbámicos sobre la inhibición del crecimiento de *Entamoeba histolytica*, estos estudios se realizan en el departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, por la M. en C. Cynthia Ordaz, bajo la dirección de la Doctora Mireya de la Garza Amaya. Hasta ahora, los resultados muestran que los compuestos en estudio presentan una gran actividad inhibitorio, en particular el compuesto LQM 996, al compararlo con el efecto del metronidazol (Márquez, 2002).

En las pruebas toxicológicas mutagénicas se realizó la prueba de revertentes en *S. Typhimurium*, mediante la prueba de Ames y de preincubación, por parte de la Doctora Miriam Arriaga del Hospital Juárez de la SSA. Los derivados carbámicos no fueron mutagénicos a concentraciones mayores de 250µg, en comparación con el metronidazol, que es mutagénico en concentraciones de nanogramos (Márquez, 2002).

Se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad de algunos derivados carbámicos mediante la prueba de micronucleos bajo la dirección de la Doctora Sandra Díaz Barriga A. y el Doctor Eduardo Madrigal B., en el Laboratorio de Genética de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, los resultados mostraron que los compuestos LQM 996 y LQM 181 presentaron genotoxicidad a partir de una dosis de 30mg/kg. También se evaluó el mecanismo de formación de MN, mediante la utilización de tinción de anticuerpos CREST que detecta cinetocoros en los MN encontrándose que en los escasos MN que producen los nuevos derivados carbámicos son por ruptura y no por efecto aneugénico (Márquez, 2002).

Bajo la dirección de la Doctora Sandra Díaz Barriga A., en el Laboratorio de Citogenética de la FES Cuautitlán UNAM, se realizó el estudio del potencial genotóxico de los fenil-carbamátos mediante la técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas *in vitro*. Obteniendo como resultados que estos no alteran ciclo celular, no interfieren con a división celular y no aumentan el número de ICH, en comparación con el metronidazol usado como testigo a las mismas concentraciones (25, 75 y 150µg/ml); por lo tanto no presentan efectos genotóxicos, ni citotóxicos (Hernández, 2003).

En pruebas de inmunotoxicidad se llevan a cabo estudios para evaluar el efecto de los derivados carbámicos respecto a los valores hematológicos, en la producción de células productoras de anticuerpos, en la cantidad de subpoblaciones de linfocitos T (CD4 y CD8) y en la concentración de anticuerpos totales. No se a encontrado diferencia significativa en las evaluaciones realizadas con respecto a los testigos positivos (Márquez, 2002).

VII. CONCLUSIÓN

Al realizar la evaluación del daño al DNA, con el Ensayo Cometa, a 4 derivados carbámicos (LQM 901, 904, 930 y 996), se logró identificar un compuesto líder (LQM 996), basándonos en la relación L/D que determina el grado de genotoxicidad por la formación de cometas, y en la distribución del grado de daño que se obtuvieron por la variación en el tamaño de los mismos, ya que éste mostró un comportamiento de genotoxicidad semejante a los antiparasitarios de primera elección y muy cercano al testigo negativo y significativamente menor al comportamiento de los demás compuestos carbámicos estudiados.

Así como en los estudios realizados *in vitro* mediante las pruebas de actividad antiparasitaria, antibacteriana, mutagénicas y de inmunogenotoxicidad a los compuestos carbámicos donde el compuesto LQM 996 ha dado mejores resultados como antibiótico de amplio espectro, contra el género *Vibrio*, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Helicobacter pylori*, como antiparasitario contra protozoarios como *Giardia lamblia* y *Entamoeba*, contra céstodos como *Hymenolepis nana* y contra hongos del género *Tricophyton* (Márquez, 2002).

VIII. REFERENCIAS

1. -Anderson, D., Jenkinson, P., Dewdney, R., Francis, A., Godbert, P. y Butterworth, K. (1989). Chromosome aberrations, mitogen induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral from 106 control individuals in the U.K. population. *Mut. Res.* 204:407-420.
2. -Ballantyne, B. (1993) General & Applied Toxicology. 1a. Ed. Vol. 2 ED. Stockton, U.S.A. pp. 893-955.
3. -Bello, J. y López de Cerán, A. (2001). Fundamentos de ciencia toxicológica. Ed Díaz de Santos. España. pp 128-143.
4. -Bernal, Sandra (2000). Evaluación de algunos productos derivados del ácido carbámico como agentes antimicrobianos. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
5. -Calderón, B. (2001), Estudio de la susceptibilidad antimicrobiana que presentan bacteria de importancia clínica ante una serie de 4-R-fenilcarbamatos de metilo. Tesis de Licenciatura. FESC-UNAM.
6. -Carbonell et al. (1994). Mitotic arrest induced by fenvalerate in human lymphocyte cultures. *Toxicology Letters*, 48: 45-48.
7. -Collins, A., Dathie, S. y Dobson, V. (1993) direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*. 14: 1733-1735.
8. -Córdoba, D. (2002) Toxicología. 4ª. Ed. ED. El Manual Moderno. Bogotá, Colombia. pp. 111-112.
9. -Daniel, W. (2002). Bioestadística. Base para el análisis de las Ciencias de la Salud. 4ª. Ed. ED. LIMUSA-WILEY. México, D.F. pp. 304-317.
10. -Dennog, C., Hartmann, A., Frey, G. y Speit, G. (1996) Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis*. 11: 605-609.
11. -Di Palma, J. (1989) Drill Farmacología Médica. 2ª. Ed. ED. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. pp. 226-227.
12. -Edward, D.I., (1993). Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. Mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 9-20.

13. -Enciso, Susana (2000). Estudio del efecto genotóxico del Metotrexato con el ensayo cometa en linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
14. -Fessenden y Fessenden. (1983) Química Orgánica. 2a. Ed. ED. Iberoamericana, México. pp. 652-653.
15. -Fuscoe, J., Afshari, A., George, M., De Angelo, A., Tice, R. and Salman, T., et al. (1996) *In vivo* genotoxicity of dichloroacetic acid: evaluation with the mouse peripheral blood micronucleus assay and the single cell gel assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 27: 1-9.
16. -García Tamayo, F. (1997) Fundamentos de Inmunología. ED. UNAM. México, D.F. pp. 397-400.
17. -Giovannelli, L., Pitozzi, V., Riolo, S. y Piero, D. (2003). Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay. *Mut. Res.* 538: 71-80.
18. -Goldsmith, R., Heyneman, D. (1995) Parasitología y Medicina Tropical. ED. El Manual Moderno. México, D.F. pp. 1096-1098.
19. -Henderson, D. (1999). DNA Repair protocols. Eukaryotic Systems. Vol. 113 ED. Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 203-204.
20. -Hartmann, A., Herkommer, K., Gluck, M. and Spert, G. (1995) The DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with single gel test (SCG). *Environ. Mol. Mutagen.* 25: 180-187.
21. -Hernández, D., Lombardo, R., y Tortorelli. (1990) Toxicity of Ethylparathion on Carbaryl on Early Development of Sea Urchin. Bull. *Environmental Contamination Toxicology.* 45: 734-741.
22. -Hernández, Mayra (2003). Estudio genotóxico de fenilcarbamatos en cultivos de linfocitos humanos por medio de frecuencia de ICH. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
23. -Jiménez, E.C.; Flores, L.A.; Ángeles, E.; Martínez, P.; López, R. C.; Castañeda, G. H. y Pérez J. U. (2003). *In vitro* anti-giardial activity of IRE-601 and IRE-7B, Two Ethyl-Phenylcarbamate derivatives. 02-076. En Prensa.

- 24.-Kassie, F; Parzefall, N; Knasmüller, S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mut. Res.* 463: 13-31.
- 25.-Klaassen, C., Casaret, y Doull's. (1996). Toxicology the basic science of poisons. 5a. Ed. ED. McGraw-Hill. E.U.
- 26.-Lewin, B. (1997). Genes VII. ED. Oxford University Press. E.U. pp 89.
- 27.-Lu, F. Toxicología básica. ED. HARLA. México, D.F. 1992.
- 28.-Márquez, Pilar (2002). Actividad antígenotóxica de 4 derivados carbámicos en ratón y análisis de la relación de dicho efecto con su estructura química. Tesis de Maestría. ENCB, IPN. México
- 29.-McCarthy, P., Sweetman, S., McKenna, P. y McKelvey-Martin, V. (1997) Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 12: 4 209-214.
- 30.-Merck Index (1989). 11ª. Ed. ED. Merck & Co. Inc. USA. pp. 39, 982, 1051.
- 31.-Minero, C. (1997). Comparación de la eficacia anticestódica de 2 principios de nueva síntesis contra el praziquantel usando *Hymenolepis nana* como modelo en ratones. Tesis de Licenciatura. FESC-UNAM.
- 32.-Moreno, Enrique (1997). Diseño molecular y síntesis orgánica de Fenilcarbamatos de etilo con actividad antihelmíntica. Relación estructura química-actividad biológica. Tesis de Maestría. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
- 33.-Rgueiro, J.R., López, C., González, S., Martínez, E. (2002).Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune. 3ª. Ed. ED. Panamericana. Madrid, España. pp. 15, 17 y 201.
- 34.-Östling, O. y Johanson, K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 291-298.
- 35.-Pfulher, S. And Wolf, H. (1996) Detection of DNA-cross linking agents with the alkaline comet assay. *Enviro. Mol. Mutagen.* 27: 196-201.
- 36.-Reitz, M., Rumpf, M., Knitza, R., (1991). DNA single strand-breaks in lymphocytes after metronidazole. *Arzneimit-telforschung* 41: 155-156.
-

- 37.-Roitt, I. (2002) *Inmunología*, 5ª. Ed. ED. Harcourt. Madrid, España. pp. 14, 31, 243
- 38.-Ronaldi, A., De Mairinis, E., De Caterina, M. (1984) Ditiocarbamates pesticides: activity of Propineb in the micronucleus test in mice. *Mut. Res.* 135: 193-197.
- 39.-Russell, G., Gill, J., Lacey, E. (1992) Binding of [³H]Benzimidazole carbamates to mammalian brain tubulin and mechanism of selective toxicity of benzimidazole antihelmintics. *Biochemical Pharmacology*. 43: 5 1096-1100.
- 40.-Singh, N., McCoy, M., Tice, R. y Scheineider, E. (1998) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- 41.-Speit, G. And Hartmann, A. (1995) The contribution of excision repair to the DNA- effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*. 10: 555-559.
- 42.-Tice, R. (1995) The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, *Environmental Mutagenesis* (Phillips, D. H. and Venitt, S. eds), BIOS. Scientific Publishers, Oxford, UK. pp 315-339.
- 43.-Tice, R. R.; Agurell, E., et al (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen* 35: 206-221.
- 44.-Terry, R. & Hutson, D. (1999) Insecticides and Fungides. In *Metabolic Pathways of Agrochemicals*. The Royal Society of Chemistry Information Services. USA.
- 45.- Trinh, S., Reysset, G., (1998). Mutagenic action of 5-nitroimidazoles: *in vivo* induction of GC-CG transversion in two *Bacteroides fragilis* reporter genes. *Mut. Res.* 398: 55-65.
- 46.-Vademécum farmacéutico. (2002)11ava. Ed. ED. Rezza editores, S.A. Cali, Colombia.

IX. APÉNDICE

Soluciones

* Agarosas

La agarosa de normal punto de fusión se prepara al 0.75% (187mg de agarosa/25ml. de PBS), y la de bajo punto de fusión se prepara al 0.5% (125mg de agarosa/25ml. de PBS); ambas en PBS (libre de Ca^{++} y Mg^{++}).

Nota: Se sugiere la concentración de 0.75% para la agarosa normal para evitar que se desprenda del portaobjetos.

* Solución Stock de Lisis

Para preparar 1 litro:

2.5M NaCl 146.1gr.

100mM Na_2EDTA 37.2gr.

10mM Tris 1.2gr.

-Ponga a pH=10 con NaOH

-Cuando se alcanza el pH=10 todos los ingredientes se solubilizan.

Por cada vaso Copplin:

33.5ml. Sol. stock de lisis

3.7ml. de Tritón X-100

0.4ml. de DMSO

* Buffer de Electroforesis

Solución "A" 10N NaOH (200gr/500ml. H_2O)

Solución "B" 200mM EDTA (14.87gr. /200ml. H_2O)

Nota: La vida media de la solución "A" es de 2 semanas.

- * Buffer de trabajo de electroforesis

30ml. de solución "A"

5ml. de solución "B"

Aforar a 1 litro, mezclando bien.

- * Solución de Neutralización

0.4M de Tris (48.5gr./1 litro de H₂O)

-Llevar a un pH=7.5 con HCl concentrado

- * Solución del Colorante Fluorescente

Yoduro de propidio 5 μ g/ml.

- * Solución de H₂O₂ (Testigo positivo)

Solución 200 μ M

Marbete: 100ml contienen; 3.34g de H₂O₂ equivale a 982 μ mol/ml

- * Preparación de Cámara Húmeda

En un recipiente plano con tapa (vidrio o plástico), colocar en el fondo una capa de algodón y gasas, que cubra perfectamente la superficie. Ésta se humedece con agua desionizada.