



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

ESTUDIO DEL MECANISMO GENOTOXICO DE UN
CARBAMATO DE RECIENTE SINTESIS, CON EL ENSAYO DE
MICRONUCLEOS (MN) QUE UTILIZA ANTICUERPOS CREST

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A N ,
SEVERO LAZARO TLACHI SANCHEZ
Y
RAUL ZAVALA MORALES

ASESORA: DRA. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Severo Lázaro

Tlachi Sánchez

FECHA: 08-noviembre-2005

FIRMA: ~~_____~~



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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

ATN: Q. Ma. del Carmen Garcia 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 del mecanismo genotóxico de un carbonato
de reciente síntesis, con el ensayo de micronúcleos (MN)
que utiliza anticuerpos CREST,
que presenta el pasante: Raúl Zavala Morales
con número de cuenta: 9211698-4 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

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 13 de Septiembre de 2005

PRESIDENTE	<u>MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	
VOCAL	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arcen</u>	
SECRETARIO	<u>QFB, Virginia Oliva Arellano</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Marina L. Morales Galicia</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	



GOBIERNO FEDERAL
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES 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:

Estudio del mecanismo genotóxico de un carbamato
de reciente síntesis, con el ensayo de micronúcleos (MN)
que utiliza anticuerpos CREST
que presenta el pasante: Severo Lázaro Tlachi Sánchez
con número de cuenta: 9108852-5 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

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 13 de Septiembre de 2005

PRESIDENTE	MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	QFB Virginia Oliva Arellano	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Marina L. Morales Galicia	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Citogenética L-521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, en colaboración con el Laboratorio de Genética del Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y estuvo bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo y el Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar.

El diseño y la síntesis del compuesto LQM211 estuvieron a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano del Laboratorio de Química Medicinal de la FESC.

Esta investigación forma parte del proyecto PAPIIT IN205902, al cual se agradece su apoyo.

Raúl Zavala Morales

Agradecimientos:

A Dios por haberme permitido vivir hasta este momento y haber cumplido esta meta tan importante.

Agradezco a mis papas Raúl Zavala Chavero y Guadalupe Morales Valdez por haberme dado lo que hasta ahora soy, por su amor, cariño, comprensión y apoyo durante toda mi vida. Espero que el trabajo para haber llegado hasta este punto les sea de gran satisfacción a su esfuerzo por haberme sacado adelante.

A mis hermanos Héctor, Laura y Angélica por siempre haberme dado su apoyo, cariño y por todos aquellos buenos y malos momentos que hemos vivido juntos.

A mi esposa Esperanza Guillén Cabrera que me ha dado su amor y su incondicional apoyo durante todo momento y que me ha dado una hija "Odette" que es una gran satisfacción en mi vida y la cual es motivo para que siga adelante con mucha fe, esperanza y entusiasmo.

A mi abuelita Catalina, a mi tía Consuelo (Chelo), a mi tío Roberto (Beto) por su apoyo y por estar cuando los necesitaba ya sea en ocasiones de regocijo o apuro.

A mis compañeros y amigos de escuela: Mayra Hernández Páez, Ricardo Vidal Orozco (Horni), Nora Olmos Barcenas (Olimitos), Berenice Hernández Saídaña, Ma. Magdalena Gonzáles Mtz, José Raúl Rodríguez García (Gordo)

A mis compañeros de trabajo que hacen ameno el tiempo de trabajo: GFB's Karina Sandoval, Pilar Ramírez, Yuridia V. Tellez, Erica Gonzales, Saul Navarro, Rogelio Hernández, Mauricio Barrera, Aljandro Islas, Hugo Villanueva.

Severo Lázaro Tlachi Sánchez

Agradecimientos:

Agradezco antes que nada a mi padre eterno Señor Dios y San Miguel por haberme permitido vivir y darme todo lo que he conocido hasta ahora, principalmente por regalarme a esta gran familia dejando conoceros.

A mi familia.

A mi papá Antonio Tlachi Castillo por ser el héroe que siempre admirare, por ser un ejemplo de lucha y entrega, siempre donde quiera que estés gracias. A mi mamá Antonia Sánchez Garza por estar presente en cada día de mi vida y entenderme con todo ese amor que siempre nos demuestras, los amo.

A mis hermanos:

Mary por ayudarme con un consejo sin pedírselo, a Rosa por soportar siempre la vida junto a nosotros, Alma mi ayuda incondicional, Gina por estar con migo en mis peores momentos y darme la mano sin pedirlo gracias por dejarme conocerte, Christian quien aun con berrinches nos entendimos ahora mas que nunca mi guía E.T.M., Alejandro mi cómplice eterno, Antonio que siempre tratar de entender aun cuando le duela, a Francisco y German, Montserrat, Lety, Mónica, Samantha, Victoria Tito y Claudio, gracias por estar conmigo y llenar mi vida, los quiero.

A Raúl Zavala, Mayra, Ricardo, Héctor, Isai, Adriana, Ana Julia Núñez, S.Guiris, Paco, Chebio, Andrés, Jorge, que son las personas con quien he crecido y están conmigo siempre que los he necesitado, enseñándome a vivir, gracias por aceptarme y dejarlos formar parte de mi vida, los quiero y lo saben.

Y a.....Alexa, la manita (C.Osorio), Dey, Paty, Ivonne, Cristina. Lety, Diego, y se me olvido alguien saben que los quiero pero no tenia espacio para ponerlos a todos, disculpen.

A los miembros del jurado les manifiesto mi agradecimiento por sus comentarios y sugerencias tan valiosas que enriquecieron esta tesis:

M.C. Marueugenia Posadas Galarza.

Dr. Sandra Díaz Barriga Arceo.

QFB Virginia Oliva Benitez.

QFB Rosalba Bonilla

QFB Marina Morales

A nuestros profesores que en algún momento de nuestra trayectoria escolar nos dieron lo más valioso de todo ser humano, el conocimiento; Rosalba Bonilla, Ángel Sosa y Marco (Inmunología especial). Así como también a Enrique Ángeles Angiano por habernos proporcionado las herramientas para realizar este trabajo, Dr. Madrigal por habernos dado un espacio y facilidades de trabajo para nuestro proyecto. Y en especial a la Doctora Sandra Díaz Barriga Arceo, que además de haber sido nuestra profesora, asesora de tesis y servicio social, es una gran persona y gran amiga que nos ha brindado su apoyo y comprensión desde el tiempo en que le conocemos.

A nuestros compañeros y amigos de escuela: Mayra Hernández Páez, Ricardo Vidal Orozco (Homi), hector zarate (toy), oswaldo, alejandro, Antonio Díaz Rueda (Torundas), Nora Olmos Barcenás (Olmitos), Adriana Games Aguilar (Calambritos), Berenice Hernández Saldaña, Ma. Magdalena González Mtz, José Raúl Rodríguez García (Gordo), Daniel Monroy, Juan Manuel Padani Sangrador (pat), Carlos Vasquez, claudia (cachito) Blanca Olvera, Gisela Macías, Lupita Enríques Sariñán, Martha (Patote), Ana Julia, maribel, flor, Jorge Dizzib (Padrino), isai, fernando (chaq), victor hugo (corgoni), oscar y verónica, y a todos aquellos que ya no los veo pero que fueron parte en mi vida académica.

A todos gracias.

ÍNDICE

Resumen	iii
Glosario	iv
Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vi
I. Introducción y antecedentes del tema.	1
II. Objetivos.	2
General	2
Particulares	2
III. Marco teórico de la investigación.	3
El ensayo de micronúcleos.	3
Estructura cromosómica.	11
Región centromérica	11
Acción aneugénica de la Colchicina.	16
Propiedades farmacológicas	17
Mecanismo de acción	17
La Doxorubicina sustancia clastogénica.	17
Propiedades farmacológicas	18
Farmacodinamia	18
Biotransformación	20
Mecanismo de acción	20

Propiedades terapéuticas y mecanismo de acción de los	
Carbamatos.	21
Modo de acción	22
Toxicidad	22
Fenilcarbamatos	23
Actividad antiparasitaria	24
Actividad antibacteriana	25
Inmunotoxicidad	25
Modo de acción	26
Pruebas toxicológicas	26
Pruebas Mutagénicas	26
IV. Materiales y métodos	28
V. Resultados	32
VI. Discusión	39
VII. Conclusiones	45
VIII. Bibliografía	46

GLOSARIO

ACA's: Anticuerpos anticentroméricos

ACÉNTRICO : Que no posee centrómero

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANA: Anticuerpos anti-nucleares

ANÉUGENO: Xenobiótico que produce alteración a nivel de las proteínas del huso mitótico o de la región del cinetocoro de los cromosomas y por lo tanto produce aneuploidias

ANUCLEADA: Sin núcleo

ARN: Ácido ribonucleico

CD-1: Cepa de ratones experimentales

CENP's: Proteínas centroméricas

CLASTÓGENO: Xenobiótico que produce rupturas en cualquier parte de la cadena de ADN, reflejándose como ruptura cromosómica.

CREST: Acróstico de: Calcinosis, Raynaud, Esofagea, Sclerodactilia y Telangectasia

ENC: Eritrocitos normocrómicos

EPC: Eritrocitos policromáticos

EPC/ECN: Relación eritrocitos policromáticos entre normocrómicos

EPCMN: eritrocitos policromáticos micronucleados

ESCLERODERMA: Enfermedad del tejido conectivo en la cual se produce fibrosis en diversos órganos y en los vasos sanguíneos; con frecuencia afecta brazos y manos.

HETEROCROMATINA: Cromatina inactiva, que se encuentra altamente condensada en la interfase celular por lo que se tiñe intensamente con los colorantes para ADN y cromosómicos.

HISTONAS: Proteínas básicas que son el componente principal de la cromatina.

K (-): Cinetocoro negativo

K (+): Cinetocoro positivo

LQM-211, LQM-996, LQM-919: carbamatos de nueva síntesis

(MN) MICRONÚCLEO: Cromosoma o fragmento de cromosoma condensado y rezagado en el citoplasma celular, inducidos por ruptura o al alterar el huso mitótico.

MICROTÚBULO: Estructura cilíndrica de 20-27 nm de diámetro que se encuentra en muchos tipos de células de mamíferos y que forma parte del citoesqueleto formado por la proteína tubulina.

MUTÁGENO: Agente físico, químico o biológico que produce un cambio en la secuencia de pares de bases del material genético, el cual es heredado a la descendencia.

XENOBIÓTICO: Sustancia química que normalmente no se encuentra en los sistemas biológicos, pero que pueden entrar en contacto con los organismos por diferentes vías.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1-.- Principales proteínas centroméricas estructurales	15
--	----

FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de formación de 5 micronúcleos	
Figura 2. Técnica de Inmunofluorescencia de anticuerpos CREST	10
Figura 3. Los cromosomas y sus regiones.	11, 12
Figura 4. El cinetocoro	14
Figura 5. Estructura química de la colchicina	16
Figura 6. Estructura química de la doxorubicina	18
Figura 7. Síntesis química de los fenilcarbamatos LQM-996 y LQM-919	24
Figura 8. Estructura química del derivado LQM-211	27
Figura 9. % EPC/1000 eritrocitos producidos por colchicina	32
Figura 10 % EPC/1000 eritrocitos producidos por doxorubicina	33
Figura 11 % EPC/1000 eritrocitos producidos por LQM211	34
Figura 12 Frecuencia de EPCMN en todos los grupos y tratamientos	35
Figura 13 Presencia de k+ y k- inducidos por los compuestos.	38
Figura 14 Frecuencia de k+ y k- inducidos por diferentes derivados carbámicos	38

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la capacidad genotóxica del carbamato LQM211 mediante el ensayo de micronúcleos (MN) in vivo y utilizando una técnica de inmunofluorescencia indirecta que utiliza los anticuerpos CREST, se determinó el tipo de daño cromosómico producido, ya sea aneugénico o clastogénico.

Para determinar el potencial genotóxico del compuesto se utilizaron ratones de la cepa CD1, formando 8 lotes, administró el compuesto por vía intraperitoneal a las dosis de 30, 100 y 300 mg/Kg del compuesto LQM211 por cada lote; dos lotes con colchicina a la dosis de 0.6 y 1 mg/Kg como controles aneugénicos. Dos lotes se administraron con doxorubicina como controles clastogénicos dosis de 5 y 10 mg/Kg respectivamente. El octavo grupo fue el control negativo experimental con aceite de maíz que fue el disolvente y vehículo del carbamato. Los animales fueron muestreados a las 24, 30, 48 y 72 horas. Se realizaron frotis sanguíneos, se analizó la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) y la proporción de eritrocitos policromáticos entre eritrocitos normocromáticos (EPC/ENC) por 1000 eritrocitos analizados respectivamente. Se obtuvieron las dosis y tiempos de inducción de MN que permitieron el estudio del mecanismo de formación de MN producidos por Colchicina de 1mg/Kg, Doxorubicina de 10mg/Kg a las 48 horas. De tal manera que el ensayo de inmunofluorescencia indirecta se realizó administrando a grupos de 3 animales con colchicina y doxorubicina a las mismas dosis y el compuesto LQM211 a 300 mg/Kg a las 48 horas. Se evaluaron los MN inducidos, por la presencia o ausencia del marcaje de las proteínas centroméricas (K+ o K-).

Los resultados mostraron que el carbamato LQM211 no aumentó la frecuencia de EPCMN en ninguna de las dosis en los tiempos estudiados; en relación al parámetro de citotoxicidad dado por la proporción de EPC/ENC tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los grupos administrados con el compuesto.

En el estudio del mecanismo de formación de MN, la colchicina produjo un % de K+ y la doxorubicina un % de K-, marcando muy claramente la diferencia entre el mecanismo aneugénico y clastogénico respectivamente. De los escasos MN que produjo LQM211 a la dosis de 300 mg/Kg se determinó que el 20 % son K+ y 80 % K- por lo cual se concluyó que éste compuesto no es genotóxico, pero que los MN que llegaron a formarse fueron por efecto clastogénico.

INTRODUCCIÓN

Los cromosomas están expuestos a la acción de diversos agentes ambientales genotóxicos que los dañan y ocasionan fracturas o rompimientos y deficiente segregación. Estos agentes pueden ser: de naturaleza física, como lo son las radiaciones; química, como los agentes alquilantes; o biológica, como los virus. Existen mecanismos de reparación celular que tratan de subsanar el daño, pero éste puede ser tan grave, o los mecanismos de reparación no ser tan eficientes, que se produzcan alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas (Salamanca, 1993).

Los métodos cromosómicos para evaluar el daño genotóxico de diversos agentes no están considerados como una 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 extrapolados casi a cualquier especie o línea celular con respecto a las respuestas que producen los agentes genotóxicos (Salamanca, 1993).

Los estudios citogenéticos evalúan principalmente dos tipos de acciones de los agentes genotóxicos sobre los cromosomas, los cuales son: el efecto clastogénico, que es cuando el agente produce rupturas cromosómicas y la acción genotóxica S dependiente, que se suscita durante la etapa en la cual el ADN se duplica. Por esta razón los primeros estudios citogenéticos enfocados a evaluar el efecto de agentes mutagénicos sobre los cromosomas comprenden la evaluación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Sin embargo, este análisis generalmente requiere el estudio de una gran cantidad de metafases con excelentes características que consumen muchas horas de análisis microscópico por parte del investigador, por lo cual se han buscado métodos más rápidos y menos costosos para evaluar el daño cromosómico.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la genotoxicidad del carbamato LQM211 mediante el ensayo de MN *in vivo* y evaluar el tipo de daño que produce (aneugénico o clastogénico), empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta que utiliza los anticuerpos CREST para cubrir uno de los aspectos del estudio preclínico de este compuesto

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Determinar la capacidad aneugénica del carbamato, comparando la frecuencia y el tipo de MN que producen éste y la colchicina que es una sustancia de reconocida acción aneugénica.
- 2) Determinar la capacidad clastogénica del carbamato, comparando la frecuencia y el tipo de MN que producen, éste y la doxorubicina que es una sustancia de reconocida acción clastogénica.
- 3) Determinar la citotoxicidad de colchicina, doxorubicina y el carbamato, evaluando la relación: eritocitos policromáticos/eritocitos normocromáticos (EPC/1000 eritocitos) en sangre periférica de ratones.
- 4) Determinar el tipo de MN mediante la tinción con anticuerpos CREST fluorescentes para diferenciar el tipo de genotoxicidad (clastogénica y/o aneugénica) producida por el carbamato.

III. MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN.

PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

El ensayo de micronúcleos es una prueba citogenética rápida y sencilla para evaluar el efecto clastogénico de muchos compuestos. Fue desarrollada por Schmid y Heddle en la década de los setenta y tiene como fundamento el hecho de que en la anafase los cromosomas que se han roto o sufrido rezago, no migran hacia polos opuestos celulares para ser incluidos en los núcleos principales de las células hijas formadas, sino que permanecen en el citoplasma con tendencia a formar pequeñas masas o núcleos (micronúcleos) que pueden ser claramente distinguidos dentro del citoplasma (Schmid, 1975).

Los micronúcleos (MN) son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina, separados del núcleo principal y que se forman a partir de la ruptura de fragmentos cromosómicos acéntricos o bien por aquellos cromosomas que sufren un rezago anafásico, lo cual se traduce en la aparición de un pequeño núcleo en células anucleadas como los eritrocitos, o bien en el citoplasma de las nucleadas como linfocitos o espermatogonias (Salamone y Mavounin 1994).

El descubrimiento de los MN tuvo lugar cuando en 1891, Howell encontró por primera vez un MN en eritrocitos humanos, posteriormente el corpúsculo fue descrito por Jolly. De aquí surge el nombre de cuerpos de Howell-Jolly (como se les conoce en hematología), que se encuentran con cierta frecuencia, y se relacionan particularmente con padecimientos sanguíneos como las anemias megaloblástica y hemolítica (Davidsohn y Henry, 1978).

Sin embargo, fue hasta 1959 cuando Evans y colaboradores realizaron el primer intento por utilizar a los MN para monitorear el daño citogenético inducido por un agente ambiental, que en este caso se trató de los rayos gamma y los neutrones, en presencia y ausencia de oxígeno.

Al comienzo de los años setenta (Schmid y Von 1973), se iniciaron los estudios para determinar que parámetros podían ser útiles como indicadores del daño citogenético en la médula ósea de ratón *in vivo*, lo que llevó a la conclusión de que la incidencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) era un claro indicador del daño citogenético, con lo que fue posible desarrollar una prueba simple *in vivo*, donde la identificación de EPCMN permitió evaluar el grado de genotoxicidad que caracteriza a diversos xenobióticos.

Durante la eritropoyesis, por efecto de las sustancias clastogénicas y aneugénicas, se forman micronúcleos ya sea por rezago de fragmentos de cromosomas acéntricos, así como algunos cromosomas completos (Figura 1, pag 5). De esta manera el ensayo de micronúcleos *in vivo* nos permite potencialmente detectar agentes que causan rupturas cromosómicas y aquellos que actúan sobre el huso acromático. Sin embargo, este tipo de ensayo no puede diferenciar el mecanismo (aneugénico o clastogénico) de la formación de micronúcleos.

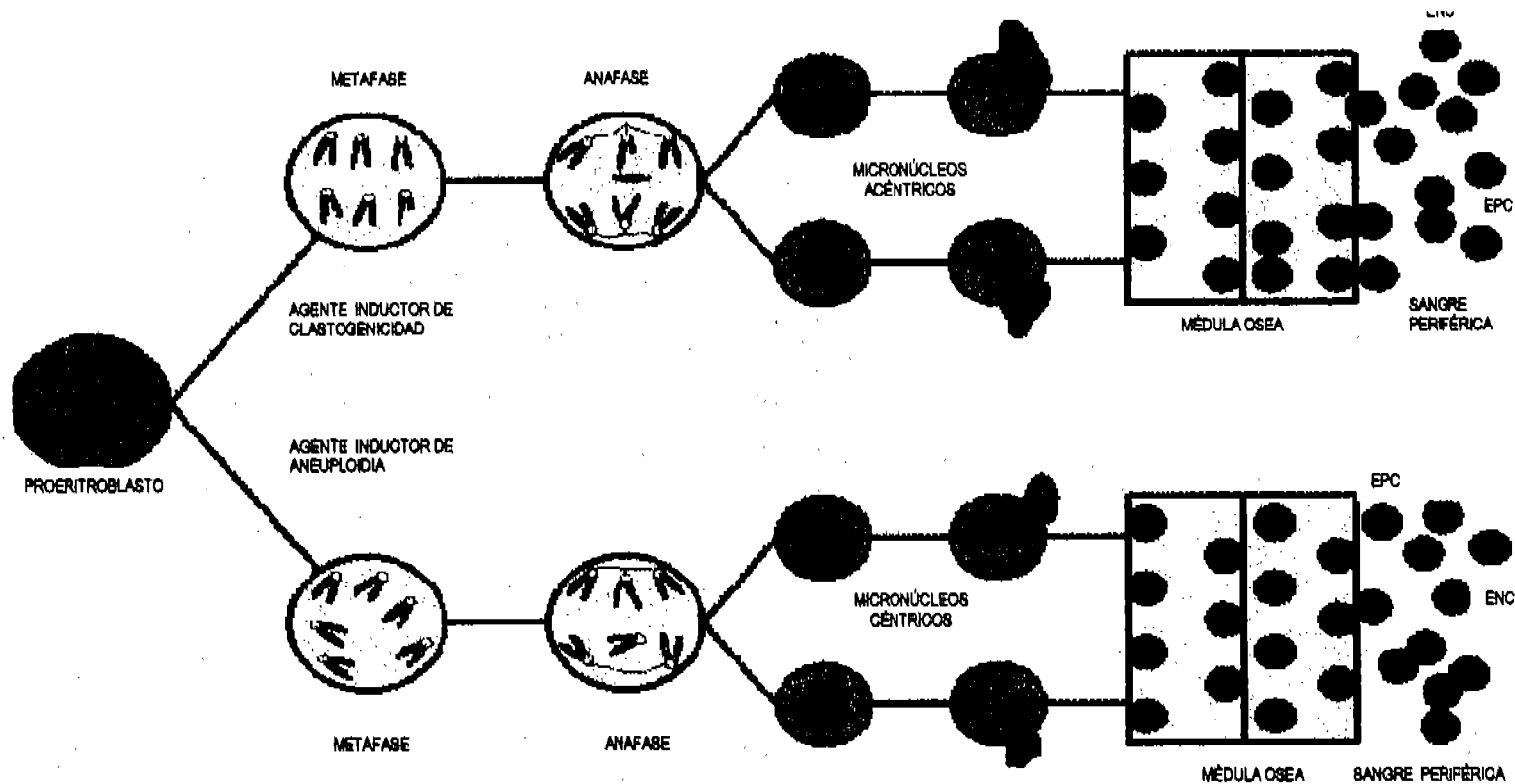


Figura 1.- Representación esquemática del mecanismo de formación de micronúcleos en eritroblastos de médula ósea resultando en la formación de fragmentos cromosómicos acéntricos y/o cromosomas rezagados.

En la figura 1 pag. 5 se muestran los 2 diferentes mecanismos de formación de micronúcleos en eritrocitos de medula ósea, originados por fragmentos cromosómicos acéntricos y cromosomas completos. En la parte superior se presenta la formación de un micronúcleo debido a la ruptura de un cromosoma por un agente clastógeno; en la parte inferior se presenta un micronúcleo, resultado de un rezago cromosómico. Es importante citar que la presencia o ausencia del cinetocoro o el centrómero en sí, hace la distinción entre los dos mecanismos de micronucleación.

Los primeros intentos para diferenciar entre los dos mecanismos de generación de micronúcleos fueron utilizando el tamaño del corpúsculo (Wakata y Sasaki, 1987), el bandeo C que marca los centrómeros, así como por la cuantificación de la cantidad de ADN (Hedde y Carrano, 1977). Sin embargo estos métodos no son muy confiables, por lo que actualmente para su estudio se emplean dos métodos moleculares citogenéticos con los cuales se puede identificar la presencia de centrómeros en micronúcleos, de tal modo que se pueda diferenciar entre micronúcleos de origen clastogénico y/o aneugénicos (Gudi y col., 1990), estos métodos son:

1) Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos CREST

2) Hibridación *in situ* con fluorescencia (técnica de FISH) con sondas de ADN paracentromérico.

Los anticuerpos contra proteínas centroméricas fueron encontrados y aislados de pacientes con escleroderma de la variante denominada CREST, de aquí que se conozcan con tal nombre. Los anticuerpos fueron caracterizados por Cox y colaboradores (1983). Ellos encontraron tres proteínas centroméricas diferentes, denominadas CENP-A, B y C

respectivamente. Posteriormente fueron identificadas otras proteínas que se conocen como CENP-D, E Y F (Mitchell 1996).

Estos anticuerpos son utilizados eficientemente en la detección de cinetocoros en MN, la prueba se basa en la consideración de que un cinetocoro positivo contiene un cromosoma completo y que un cinetocoro negativo es solo un fragmento cromosómico (Terditt y col 1994).

Se han encontrado dos principales ventajas que presentan el método de detección de cinetocoros con anticuerpos CREST sobre el método de FISH y es que este último 1) no diferencia entre eritrocitos normocrómicos y policromáticos y 2) el costo de la técnica es más elevado.

Por otra parte, una gran desventaja de la metodología CREST es que las proteínas asociadas al cinetocoro (por las cuales tienen afinidad los anticuerpos CREST) si son visualizadas, pero no el ADN centromérico (Vademecum, 2001; Seoane y Dulout, 2001); por lo tanto, si un mutágeno induce rezago cromosómico produciendo micronúcleos por inactivación o inhibición de la formación de tales proteínas del cinetocoro, estos micronúcleos con centrómero (daño anéugeno), no pueden ser detectados por este método, pero por el método de FISH sí.

ESCLEROSIS TIPO CREST

La Esclerosis Sistémica Progresiva variante CREST, conocida anteriormente como Escleroderma, es una enfermedad predominante en la mujer de edad media, sin incidencia familiar ni predilección racial. El nombre de la variante se basa en un acrónimo de las 5 afecciones principales que presentan los pacientes:

- Calcinosis cutis.
- Raynaud fenómeno de
- Esofagea hipomotilidad
- Sclerodactyly- escleroderma
- Telangectasia.

La enfermedad también puede aparecer en la infancia con manifestaciones similares al adulto desarrollando al final la esclerosis sistémica progresiva del tejido conjuntivo. En los casos de escleroderma se presentan alteraciones cromosómicas, con ruptura de cromátidas, translocaciones y deleciones de carácter adquirido mas no hereditario, asociados con un factor sérico de fractura (Mole-Bajer,1990;Berkow,1986) La esclerosis sistémica es una enfermedad de causa desconocida. Su característica esencial es el depósito excesivo de colágena que da lugar a la producción de distintos factores de crecimiento de los fibroblastos. Alteraciones inmunitarias como vasculares desempeñan un papel importante en la fibrogénesis (Kahaleh,1992; LeRoy,1992). Existen abundantes datos sugestivos de que la inmunidad humoral también esta alterada. Prácticamente todos los pacientes con escleroderma tienen anticuerpos antinucleares (ANA) que reaccionan ante diversas dianas intracelulares (Sontherimer y Col.,1991) y se han descrito dos dianas más o menos específicas de la esclerosis múltiple. Una de ellas dirigida contra la ADN topoisomerasa I, la cual es muy específica. Dependiendo del método utilizado, se encuentra en el 28 al 70% en pacientes con esclerosis sistémica difusa. La otra diana son las proteínas del centrómero, de aquí que, los anticuerpos anticentroméricos, aparecen entre el 22 a 36% de los pacientes. El hecho de mayor importancia es que el 96% de los que tienen dichos anticuerpos tienen síndrome de CREST. Por tanto estos anticuerpos,

al contrario del anti ADN topoisomerasa se encuentran casi exclusivamente en los enfermos que presentan formas de esclerosis sistémica limitada. Es raro detectar los dos tipos de anticuerpos en el mismo paciente.

Utilizando los anticuerpos CREST se ha podido determinar que existen xenobióticos que actúan de diferente manera sobre los cromosomas, tal es el caso de la colchicina y la doxorubicina, como se explicará más adelante.

En las fotografías que aparecen a continuación fig. 2 (pag. 10) pueden observarse las imágenes características de las preparaciones utilizadas para la prueba de MN de sangre periférica procesada con la técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos CREST. En el procedimiento se utiliza Ioduro de propidio que permite la diferenciación de EPC y de ENC; en el anticuerpo secundario, que pone de manifiesto que al anticuerpo primario esta unido a su blanco, con una anti IgG humana conjugada con fluoresceína.

TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA CON ANTICUERPOS CREST

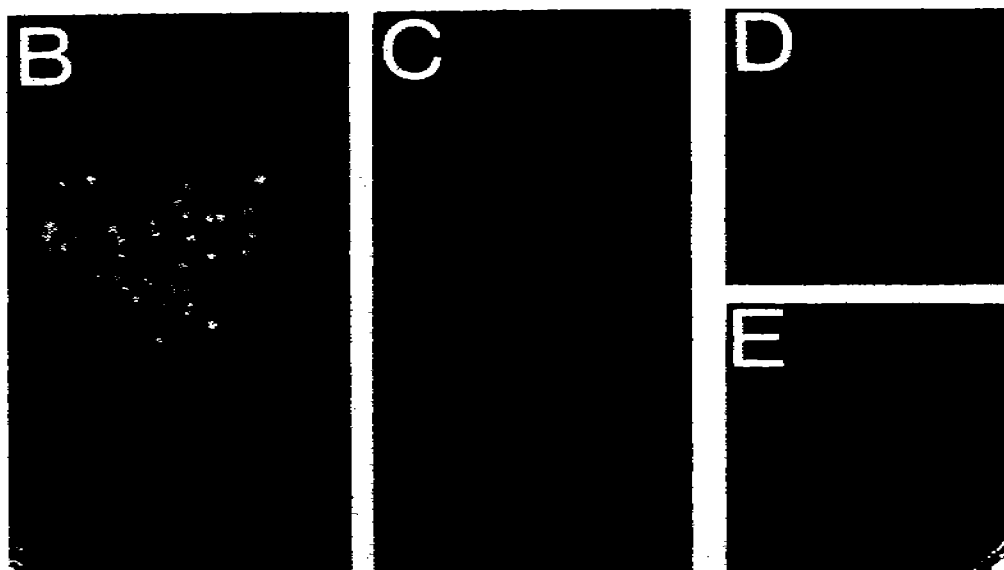


FIGURA 2. En la figura B se aprecia a una célula con sus cromosomas intactos dentro del núcleo celular, en la cual los centrómeros se tiñen de color amarillo. En la figura C eritrocitos policromáticos con cinetocoros positivos K(+) y cinetocoros negativos K(-) anaranja/amarillo/rojo en el centro. D eritrocito policromático con centrómero y E eritrocito normocromático con centrómero.

ESTRUCTURA CROMOSÓMICA

REGIÓN CENTROMÉRICA.

Las entidades físicas del núcleo celular, donde residen los genes en sitios específicos, son los cromosomas; estructuras compuestas de cromatina, formadas por ADN unido a proteínas, principalmente histonas, recibiendo este nombre porque tienen la propiedad de teñirse con ciertos colorantes (Figuras 3a y 3b pag. 11 y 12 respectivamente). Cada especie animal y vegetal tiene un complemento cromosómico propio y característico en cuanto al número y forma. Con una ampliación microscópica, los cromosomas se observan como estructuras alargadas simétricas constituidas por dos elementos idénticos que reciben el nombre de cromátidas hermanas las cuales contactan entre sí, en una constricción que recibe el nombre de centrómero (Díaz Barriga y Bonilla, 2001; Solari, 1999).



FIGURA 3a. CROMOSOMA

CROMOSOMAS HUMANOS

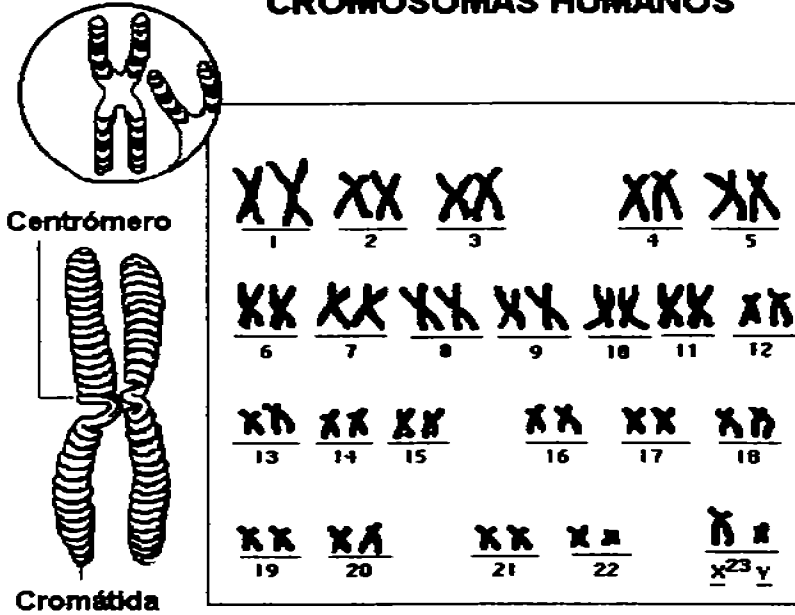


FIGURA 3b. LOS CROMOSOMAS Y SUS REGIONES.

En la Figura 3a, pag 11 se presenta un cromosoma con sus diferentes regiones que lo forman y en la pag. 12 figura 3b se tiene la representación esquemática del cariotipo humano.

El centrómtero se define desde el punto de vista citológico como una constricción primaria, la cual es requerida para la apropiada segregación de los cromosomas en los procesos mitóticos y meióticos. Adicionalmente, éste sirve como punto de anclaje para ambas cromátidas hasta su disociación en la anafase y como sitio para la interacción cromosómica con el huso acromático (Karp,1996).

El ADN centromérico se clasifica como alfa satélite (secuencias de alta repetición) y consta de unidades repetitivas de aproximadamente 170 pb que pueden alcanzar en conjunto varias megabases, pero cuya secuencia es específica de cada cromosoma. A nivel proteico, los centrómeros son diferentes de otras regiones cromosómicas, pero muy similares entre sí. Desde la duplicación de las cromátidas en fase S hasta su separación en anafase, la unión entre las cromátidas hermanas se estabiliza por dos grupos de proteínas. Las proteínas ligantes de cromatina (CliPs por su nombre en inglés) se mantienen en filamentos proteicos perpendiculares al eje longitudinal de los cromosomas, en la zona de unión de las cromátidas.

La región centromérica, en general, comprende el centrómero propiamente dicho, o constricción primaria que está constituida por ADN alfoide (que es la parte asociada a las cromátidas hermanas); y los cinetocoros (uno de cada lado del centrómero en la metafase) que son elementos cupuliformes que se observan en la mitosis y en los cuales se insertan los microtúbulos (Solari, 1999). La estructura fina del cinetocoro es típicamente trilaminar, con su placa o lámina interna apoyada sobre la cromatina central del centrómero (Figura 4 pag 14). El cinetocoro es esencialmente de estructura proteínica, en la cual se distingue ADN solo en su placa interna (Mitchell, 1996; Sullivan, 1996).

En la región más periférica de los centrómeros se ha identificado una proteína con actividad ATPasa, la dineína, a la cual se adjudica un papel funcional en el movimiento. También kinesina, otra proteína relacionada con los microtúbulos, parece asociada a los centrómeros de ciertos organismos (Solari, 1999).

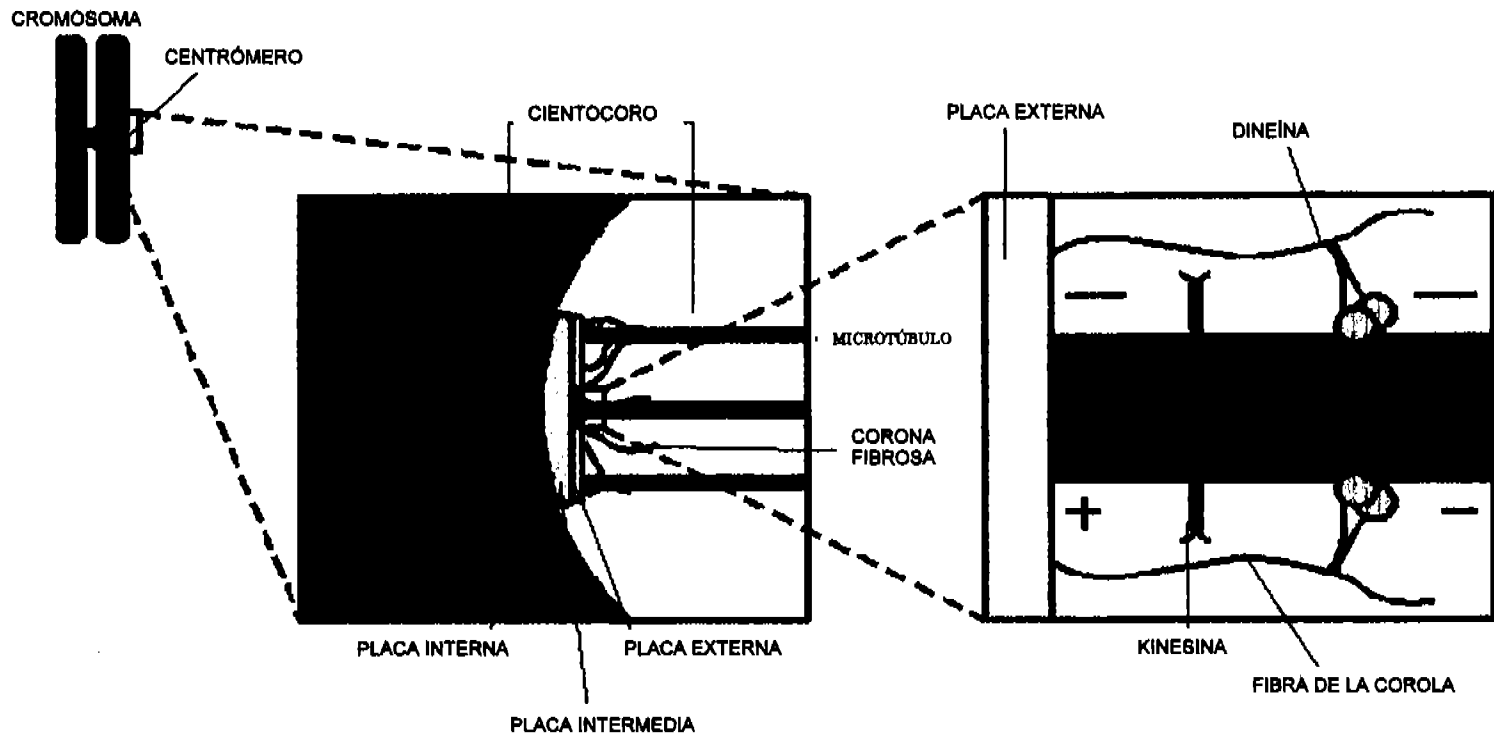


FIGURA 4. EL CINETOCORO. Representación esquemática del cinetocoro, el cual contiene una placa interna separada de la placa externa por una placa intermedia, de color verde. La placa interna consiste de una capa especializada de cromatina que está adjunta a la heterocromatina centromérica del cromosoma y la placa externa contiene las proteínas a través de las cuales se unen los microtúbulos. Asociadas con la placa está la corona fibrosa la que contiene las proteínas motoras involucradas en el movimiento cromosómico.

El suero de los pacientes con escleroderma variante CREST contienen anticuerpos los cuales reaccionan con varias proteínas centroméricas conocidas como "CENPs" localizadas dentro de la zona del complejo centrómero/cinetocoro el cual comprende, al cinetocoro, la heterocromatina y las proteínas asociadas. El estudio de las CENPs a contribuido significativamente al conocimiento actual de la bioquímica del centrómero, el cinetocoro y eventos como el movimiento de los microtúbulos en los procesos de la división celular (Earnshaw y col., 1985; Mole-Bejer, 1990; Mitchell, 1996).

Las proteínas reconocidas por los anticuerpos CREST, o anticuerpos anti-centrómicos (ACAs), son principalmente proteínas estructurales que han sido aisladas y purificadas; sus características y localización son descritas en la tabla 1 (pag 15) (Mitchell, 1996).

Tabla 1.- Principales proteínas centroméricas.

Tipo de proteína	Tamaño (kDa)	Localización	Características
CENP-A	17	Centrómero general	Variante de la Histona H3
CENP-B	80	Región central	Se asocia al ADN afloide
CENP-C	140	Placa interna del cinetocoro	Presente solo en cinetocoros activos
CENP-D	50	Cinetocoro	Regulador de condensación cromosómica
CENP-E	312	Placa interna del cinetocoro	Proteína asociada al movimiento de los cromosomas y de los microtúbulos
CENP-F	400	Placa externa del cinetocoro	Iniciador del ensamblaje del centrómero y del cinetocoro

COLCHICINA (ACCIÓN ANEUGENICA)

La colchicina es un alcaloide, cuya estructura química se presenta en la figura 5 pag.16, que se extrae del *Colchicum autumnale* (azafrán de otoño o azafrán de los campos). El nombre químico es (s)-N-(5,6,7,9-Tetrahidro-1,2,3,10 tetrametoxi-9-oxobenzol [a] Heptalen-7-il) acetamida.

La colchicina bloquea la formación de los microtúbulos al unirse a los monómeros de la tubulina evitando su polimerización, por tanto se emplea para detener la división celular en la mitad de la metafase por interrupción de las fibras del huso acromático (Bennington,1991). A consecuencia de esta acción, los cromosomas completos pueden quedar rezagados y formar un MN en el citoplasma. Debido a estas características, la colchicina se utiliza en el ensayo de MN como un agente aneugénico positivo (Eastmond y Truker,1989). Las células con mayor actividad de división y metabolismo son las primeras en afectarse. Las células normales y cancerosas se afectan de la misma manera. Esta acción no es específica de la colchicina, pues la presentan otros alcaloides de la *vinca*, como lo son los antineoplásicos vincristina y vinblastina.

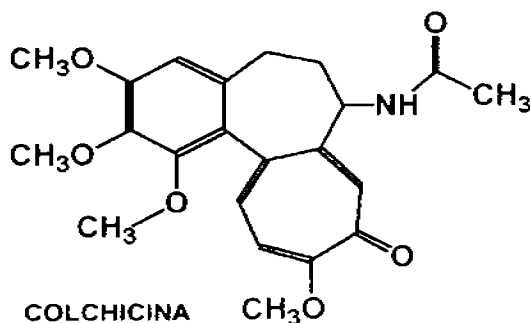


Figura 5.- Estructura química de la Colchicina

Propiedades farmacológicas: la Colchicina es utilizada en el tratamiento preliminar en la gota como antiinflamatorio, no es analgésico ni alivia otros tipos de dolor y se ha observado que causa neuropatías en los pacientes tratados. Es utilizada como agente antimitótico y se ha empleado ampliamente para estudiar los aspectos normales y anormales de la división celular, así como funciones celulares (Bennington,1991).

Mecanismo de acción: la colchicina tiene la capacidad de conjugarse a la proteína microtubular (tubulina), por lo que se trastorna la función del huso mitótico y causa la despolimerización y la desaparición de los microtubúlos fibrilares, lo cual trae consigo su actividad antiinflamatoria y antimitótica (Bennington,1991).

DOXORRUBICINA (SUSTANCIA CLASTOGENICA)

Por otro lado, la doxorubicina, cuya estructura se presenta en la figura 6 pag.18, se intercala entre las bases del ADN y esto causa la ruptura de las cadenas; además genera también radicales libres, éstos producen alteración de la membrana celular *per se*, por lipoperoxidación que genera más radicales libres y especies oxidantes que en un ciclo, seguirán dañando al ADN y las membranas de otras células. En consecuencia, este xenobiótico es utilizado como un compuesto de reconocida acción clastogénica (Bennington,1991).

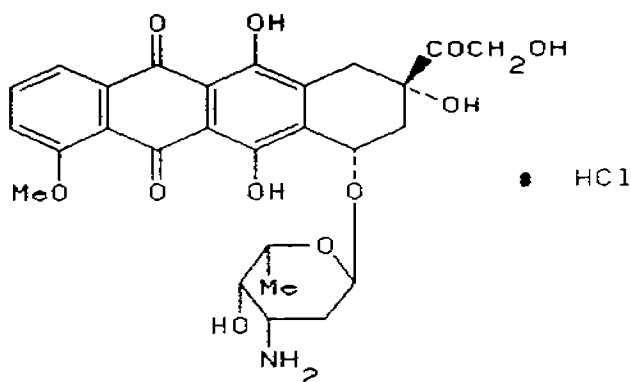


Figura 6.- Estructura química de la Doxorubicina.

Propiedades Farmacológicas.

Es un glucósido tipo antraciclina obtenido de *Streptomyces peucetius*, es específico de la fase S del ciclo de división celular. Su actividad antineoplásica puede implicar unión al ADN al intercalarse entre los pares de bases e inhibición de la síntesis de ADN y ARN por desorden del molde e interferencia estérica. No atraviesa la barrera hematoencefálica. Se une a los tejidos en gran proporción, se metaboliza en forma rápida en el hígado (1 hora) y produce un metabolito activo, el adriamicinol. La biotransformación posterior también es hepática. Se elimina por vía biliar 50% inalterado y 23% como adriamicinol, y por vía renal menos de 10%, hasta la mitad como metabolitos (Vademecum, 2001).

Propiedades farmacodinámicas: Aunque se sabe que las antraciclinas pueden interferir con un número de funciones bioquímicas y biológicas dentro de las células eucarióticas, el mecanismo citotóxico exacto de la

doxorubicina y/o sus propiedades antiproliferativas no han sido completamente elucidadas. Una vez que la droga ha penetrado dentro de la célula se une en su mayoría a la cromatina. A nivel molecular la doxorubicina puede formar un complejo con el ADN por intercalación de sus anillos planos entre los pares de bases de nucleótidos, la consecuencia de esta intercalación son serios desarreglos en la síntesis del ADN, síntesis de ARN dependiente de ADN y síntesis de proteínas. Sin embargo, las concentraciones de doxorubicina requeridas para ejercer su efecto antiproliferativo a través de estos mecanismos parece ser algo mayor que aquél que se logra en el sitio del tumor en la práctica clínica, tal intercalación puede desencadenar la fragmentación del ADN por la topoisomerasa II, dando como resultado serios desórdenes en la estructura terciaria del ADN. Este efecto es observado con concentraciones de la droga, las cuales han sido encontradas dentro del intervalo terapéutico clínico. La doxorubicina está involucrada en reacciones de oxidación/reducción, ciertas reductasas celulares dependientes de NADPH son capaces de reducir la doxorubicina a una semiquinona libre de radicales, que puede reaccionar con el oxígeno molecular para generar compuestos citotóxicos altamente reactivos, como el superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno. La formación de radicales libres ha sido implicada en la cardiotoxicidad de la doxorubicina (Vademecum, 2001).

Otro sitio de acción para la doxorubicina puede ser a nivel de membranas, ya que la droga puede unirse, por ejemplo, a los lípidos de la membrana celular y afectar varias funciones.

La citotoxicidad y/o la actividad antiproliferativa de la doxorubicina puede resultar como una consecuencia de alguno de los mecanismos mencionados y puede haber otros.

Los estudios de cinética celular han demostrado que la doxorubicina es activa a través del ciclo celular incluyendo la interfase. Los tejidos rápidamente proliferativos como los tumores tisulares (pero también la médula ósea, el aparato gastrointestinal, la mucosa oral y los folículos pilosos) son por lo tanto, los más sensitivos a los efectos antiproliferativos de la doxorubicina.

Biotransformación: La doxorubicina es metabolizada principalmente por el hígado. El principal metabolito de la doxorubicina es el 13-OH-doxorrubicinol, producido por aldo-ceto-reductasas, las cuales poseen un cierto grado de actividad antitumoral. La doxorubicina y el 13-OH-doxorrubicinol predominan en la orina y en la bilis. Otros metabolitos presentes en cantidades detectables en el plasma son las agliconas de doxorubicina y el 13-OH-doxorrubicinol (Vademecum, 2001).

Mecanismo:

Esta antraciclina reacciona con los microsomas específicamente con la citocromo P-450 reductasa en presencia del fosfato de nicotinamin-adenin-dinucleótido reductasa formando un radical semiquinona intermediario, el cual puede reaccionar con el oxígeno y producir un radical anión superóxido. Estos pueden formar puentes de hidrógeno y radicales peróxido e hidroxilo, con alta destructividad celular. La transferencia de electrones intramoleculares de la semiquinona intermediaria da por resultado la generación de otros radicales y éstos a potentes agentes alquilantes (Vademecum, 2001).

Las antraciclina pueden también interactuar con las membranas celulares y alterar sus funciones, esto es evidencia de que juegan un papel importante en la acción antitumoral y en la toxicidad cardiaca causada por antraciclina (Vademecum, 2001).

CARBAMATOS

Los carbamatos son ésteres o sales del ácido carbámico (ácido aminometanoico) que presentan la fórmula general H_2NCOOR . Los pesticidas carbamatos han sido usados comúnmente por que son más biodegradables que los insecticidas organoclorados y tienen una toxicidad dérmica mas baja que los pesticidas organofosforados comunes.

Existen tres clases de carbamatos, los plaguicidas 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 radicales aromáticos o alifáticos y los carbamatos funguicidas que contienen el grupo bencimidazol.

Los carbamatos insecticidas son frecuentemente usados en el control de insectos, que por alguna razón no responden o se han hecho resistentes a los compuestos organofosforados; ejemplos de estos insectos son los moscos, hormigas, cucarachas, tijerillas y avispas (Hassall 1990).

Mann y Storey (1996) encontraron que los herbicidas carbámicos N-fenilcarbamato de isopropilo, N-clorofenilcarbamato de isopropilo y el Barbaran (N-clorofenilcarbamato de clorobutinilo), son útiles en la determinación del número y morfología de los cromosomas en los ápices de las raíces, debido a que contraen mejor a los cromosomas logrando una mejor separación de éstos.

MODO DE ACCIÓN

Son efectivos insecticidas 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 orgaofosforados (Maan y Storey 1996).

La acetilcolinesterasa es una estearasa que contiene serina que determina la acción del neurotransmisor acetilcolina a colina y ácido acético; por lo tanto ésta es un mediador sináptico de los impulsos nerviosos en mamíferos e insectos, por lo que una sobredosis de carbamatos producen constricción de las pupilas oculares, debido a espasmos musculares, fallas respiratorias, bajas en la presión sanguínea e inclusive paro cardiaco. Las convulsiones pueden ser de rigidez de los miembros o de rápidos movimientos involuntarios (Lu,1992; Terry y Hutsson,1999).

TOXICIDAD

La toxicidad aguda de los diferentes carbamatos va desde una alta toxicidad hasta solo ligera toxicidad o prácticamente no tóxicos. La DL50 reportada para la rata es de un rango mínimo de 1mg/Kg hasta por encima de 500 mg/Kg. Para ciertos metilcarbamatos la DL50 es de 20 veces a más de la correspondiente dosis efectiva cincuenta (DE50). Existe una relación dosis efecto, entre la severidad de los síntomas y el grado de inhibición de la colinesterasa (Hernández y col.,1990).

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

Los fenilcarbamatos, se clasifican como un pequeño grupo de funguicidas, herbicidas e insecticidas, siendo el único miembro comercial el dietofencarb. Estos compuestos ejercen su efecto inhibiendo la mitosis celular, por lo que se consideran potencialmente genotóxicos.

Algunos compuestos de esta familia que recientemente se están sintetizando en el laboratorio de química medicinal de la FESC, han mostrado una acción antimicrobiana de amplio espectro y baja toxicidad que los convierte en posibles agentes terapéuticos. Surgiendo un proyecto que se dividió en diversos estudios como lo son el diseño de moléculas, el cual consistió en un estudio teórico comparativo de cómo influyen ciertos sustituyentes presentes, en fármacos antihelmínticos: albendazol, mebendazol, fenbendazol, oxfendazol, flubendazol, oxibendazol, triaclobendazol y parbendazol, en la contribución de los orbitales HOMO y LUMO, en la densidad electrónica y en calores de formación. Se observó que los sustituyentes sobre el núcleo bencimidazólico son muy similares entre ellos, provocando variaciones en la población electrónica presente en el anillo bencénico y en el imidazol. En base a estos resultados, se obtuvieron un grupo de derivados carbámicos a los cuales se les realizó

también el estudio teórico de influencia de los sustituyentes presentes en la estructura base; encontrando gran similitud con los compuestos benzimidazólicos (Angeles y col., 1997; Angeles y col., 2000).

Entre los primeros cabamatos sintetizados y sometidos a diversos estudios estuvieron el LQM996 y LQM919 (figura 7 pag.24) que fueron caracterizados mediante las técnicas comunes de espectroscopía como son Infrarrojo, Espectrometría de Masas y Resonancia Magnética Nuclear de C13 e H1.

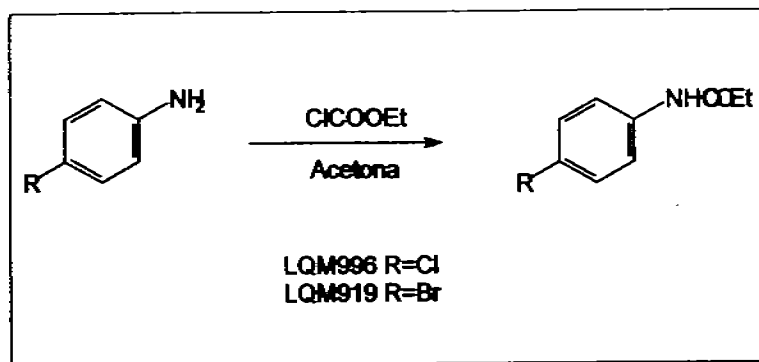


Figura 7.- Síntesis química de los fenilcarbamatos LQM996 y LQM919

De igual modo se realizaron pruebas sobre su actividad biológica que se subdividieron en:

Parasitología: actividad contra *Hymenolepis nana*, realizado en el laboratorio de Parasitología de la FES C, en ratones CD-1. 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 prazicuantel (sustancia usada como referencia), además a través de

observaciones, utilizando microscopia electrónica se evidenció la desaparición de las microvellosidades que recubren los proglótidos de los parásitos afectando su nutrición (Minero,1997).

Se evaluaron *in vitro* algunos derivados carbámicos contra *Giardia Lambdia* determinándose concentraciones efectivas entre 3.80 y 18.16 µg/mL (Jiménez et al., 2003)

Actividad antibacteriana: Esta determinación se realizó en el Laboratorio de Microbiología industrial dentro del área de postgrado en la FESC-C UNAM, empleando 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 trece géneros de bacterias Gram (-), siendo el género más sensible el de *Vibrio* (Bernal 2000).

De igual forma se realizó la determinación de la actividad antibacteriana de los derivados carbámicos contra *Helicobacter pylori in vitro*, mediante los métodos de Kirby Bauer y de dilución en agar, en donde 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 una CMI de 32 mg/mL (Patente pendiente UNAM IMPI No. RPG/11186, 2000).

Inmunotoxicidad: Se han llevado a cabo estudios para evaluar el efecto de los derivados carbámicos: en los valores hematológicos, la producción de células productoras de anticuerpos, la cantidad de subpoblaciones de linfocitos T (CD-4 y CD-8) y en la concentración de

anticuerpos totales; reportando al momento que no se han encontrado diferencias significativas en ninguna de las evaluaciones con respecto a los controles positivos (Ramírez 2005).

Modo de acción. Se realizó la evaluación *in vitro* de diez derivados carbámicos sobre la inhibición del crecimiento de *Entamoeba histolytica*, encontrándose al LQM996 como el compuesto más efectivo. Con él se están realizando las investigaciones sobre el modo de acción que tiene este compuesto sobre las amibas (Ordaz, y col., 2004).

Pruebas toxicológicas

Mutagénicas: Estas pruebas se realizaron a través de dos métodos: el de incubación y preincubación recomendadas 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 rango de nanogramos.

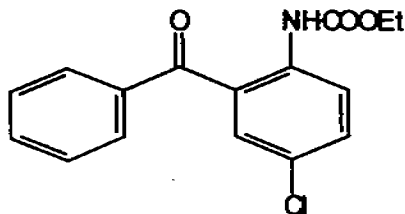
Genotoxicidad: Se han realizado diversos ensayos de genotoxicidad a varios de los derivados carbámicos, entre éstos se tiene un ensayo de micronúcleos *in vivo* realizado por Márquez (2003), donde se puso de manifiesto que estos derivados han perdido la acción sobre la tubulina y por lo tanto no son aneugénicos y que comparados con la acción clastogénica que produce la colchicina o la doxorubicina, no aumentan la frecuencia de micronúcleos.

Siguiendo con los estudios genotóxicos, al compuesto LQM211 se le realizó un primer ensayo de ICH (intercambios de cromátidas hermanas) *in vitro*, que consistió en exponer cultivos de linfocitos humanos a diferentes concentraciones del compuesto y determinar la frecuencia de ICH y la

cinética de proliferación celular. Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto que el compuesto LQM211 no es genotóxico y su comportamiento fue similar al LQM996 (Hernández, 2003). Por lo cual, en el presente estudio se ha propuesto evaluar al nuevo compuesto con la prueba de micronúcleos *in vivo* y comparar los resultados con los que se obtuvieron de los compuestos de primera generación.

Por último, se está llevando acabo el registro de la patente de los nuevos derivados carbámicos, en especial del compuesto que ha resultado hasta el momento con mejor resultado en los diferentes ensayos realizados, siendo este: el LQM-996, patente en trámite UNAM No: RPG/11186 (Dic. 2000), como antibiótico de amplio espectro contra: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba*, para parásitos como *Hymenolepis nana* y hongos (género *Tricophitum*).

Los resultados de todos estos estudios dirigieron el diseño por computadora de un nuevo compuesto, el derivado LQM211 (Figura 8 pag 27), el cual de manera teórica posee todas las características del derivado LQM996 que es el compuesto líder en todas las determinaciones biológicas realizadas, pero que se supone, presentará mayor efectividad y menor toxicidad.



LQM211

Figura 8. Estructura química del derivado LQM211

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico.

Se emplearon ratones machos cepa CD1, con un peso de 25+/- 5 a 30 gramos, proporcionados por el bioterio de ENCB del IPN.

Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico, con cama de aserrín y tuvieron libre acceso al alimento y agua, durante todo el proceso de experimentación.

Se utilizó también, una muestra de 10 ml de sangre, obtenida de una paciente donadora con escleroderma variante CREST para la obtención de suero rico en anticuerpos anticentroméricos.

Reactivos biológicos.

Anticuerpos ANA-1 (Hemagen Laboratories)

Anticuerpos anti-IgG humana - FITC de cabra (Sigma Chemical)

Suero fetal bovino (In Vitro)

Albúmina bovina (Sigma Chemical)

Reactivos químicos.

Colchicina (Sigma Chemical)

Doxorrubicina (Doxorrubicina) Solución inyectable. El frasco ampula con liofilizado contiene: Clorhidrato de doxorrubicina 10 mg

Carbamato LQM211 Lab.de Q.Medicinal FESC- UNAM

Ioduro de propidio (Sigma Chemical)

Giemsa en solución (Sigma Chemical)

Aceite de maíz (Sigma Chemical)

Metanol absoluto

Sílica Gel como desecante

Solución de antifade (Vectashield, Vector Laboratories H-1000)

Solución Buffer de Fosfato pH 7.4 y 6.8

Tween 20 (Sigma Chemical)

Nitrógeno (gas)

Ensayo de micronúcleos

Se distribuyeron los animales de experimentación en tres grupos. El grupo I fue tratado con Colchicina para lo cual, fueron administrados 3 ratones por cada dosis de 0.6 y 1.0 mg/kg de peso por vía intraperitoneal (IP). Se realizó una segunda administración respectivamente a las 24 horas, al grupo de ratones de la dosis más baja (nuevamente 0.6mg/Kg).

Al grupo II conformado por 6 ratones, se le administró Doxorrubicina, tres de ellos con la dosis de 5 mg/kg, y otros tres con 10 mg/kg de peso por vía intraperitoneal (IP). Se realizó una segunda administración a las 24 horas, al grupo de los ratones de la dosis más baja (nuevamente 5 mg/Kg).

Al grupo III se le administró el compuesto LQM211, para lo cual se emplearon 12 ratones que se distribuyeron en 4 grupos de 3 ratones cada uno y se administraron de la siguiente manera: con dosis en mg/kg de peso: 0 (testigo), 30, 100 y 300 por vía oral (VO).

Todos los animales fueron muestreados en los siguientes tiempos: 0, 24, 30, 48 y 72h, realizando frotis de sangre periférica obtenida de la cola de ratón y teñidos con colorante de Giemsa en buffer de fosfatos pH=6.8. Para la evaluación de la frecuencia de MN en sangre periférica de los ratones tratados, las laminillas fueron fijadas durante 5 minutos en metanol absoluto y se tiñeron durante 15 minutos con el colorante de Giemsa 1:10 diluido en buffer de fosfatos con un pH de 6.8, por último las laminillas se lavaron con agua corriente y se secaron al aire para su lectura en microscopio óptico.

Por cada ratón, cada dosis y en todos los horarios se determinó la frecuencia de EPCMN por cada 1000 EPC y la relación entre eritrocitos

policromáticos (EPC) y eritrocitos normocrómicos (ENC) por cada 1000 eritrocitos. El análisis estadístico se realizó con el programa INSTAT 2.

La siguiente parte de nuestra investigación, que a continuación se describe, se realizó con la dosis y el tiempo en el cual se observó la mayor cantidad de MN y la menor citotoxicidad por parte de todos los compuestos administrados.

Se utilizaron 3 lotes de 3 animales cada uno, los cuales se administraron de la siguiente manera:

Lote A: Colchicina Dosis única de 1 mg/Kg

Lote B: Doxorrubicina Dosis única de 10 mg/Kg

Lote C: LQM211 Dosis única de 300 mg/Kg

La muestra de sangre de la cola de los animales se tomó a las 48 horas en todos los casos y los frotis sanguíneos de los ratones se prepararon con una gota de suero fetal bovino (SFB) y se guardaron en atmósfera de nitrógeno en refrigeración hasta su tratamiento y análisis.

Técnica de Inmunofluorescencia para MN utilizando los anticuerpos CREST. (Collins y col; 1992)

Se ensayaron tanto anticuerpos provenientes del suero de una paciente femenina de 45 años con escleroderma variante CREST, como anticuerpos comerciales de Hemagen Laboratories. En el primero de los casos, se tomaron 10 ml de sangre que se mantuvieron en tubo a temperatura ambiente hasta que se formó el coágulo y entonces se procedió a separar el suero. A éste se le adicionó azida de sodio en una proporción de 1:10 y se guardó a -70°C en criotubos de 1 ml.

Independientemente del origen de los anticuerpos, se determinó la frecuencia de EPCMN con cinetocoro (K+) y los EPCMN cinetocoro (K-) de la siguiente manera, según la metodología de Collins y col., 1992:

Las laminillas a analizar se dejan previamente a temperatura ambiente, posteriormente se les da un tratamiento inicial a 37°C con solución PBST/ 2% BSA (solución buffer de fosfatos-Tween conteniendo 2% de albúmina bovina) durante 15 minutos, se les adicionó el anticuerpo primario (suero de la paciente o comercial) dejándolas por 45 minutos a 37°C. Se escurrieron y enjuagaron con solución PBST (solución buffer de fosfatos-Tween) para después adicionarles anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (anti IgG humana-FITC de cabra) y se dejaron nuevamente por 45 minutos a 37°C, después se enjuagaron con solución PBST, se protegieron siempre de la luz y posteriormente se tiñeron con yoduro de propidio en solución de antifade para su lectura en microscopía de epifluorescencia.

Los eritrocitos normocrómicos y policromáticos se observaron de la siguiente manera: los ENC de color verde, los EPC de color anaranjado y los núcleos de los leucocitos color rojo; los MN de color rojo intenso, y los cinetocoros (K+) por la fluoresceína color verde, por tal motivo los EPCMN K+ se observaron de color verde-amarillo, resultado de la combinación de los colores anteriormente descritos. Se registraron 100 EPCMN y se clasificaron en K+ ó K- y se estimó la acción del compuesto. Sí este es aneugénico existirá mayor cantidad de K+ y de ser clastogénico habrá mayor cantidad de K- (Salamanca,1993; Eastmond y Tucker, 1989; Seoane y Dulout, 2001).

RESULTADOS

En los resultados de los EPC/1000 eritrocitos obtenidos para cada uno de los ratones sometidos a los tratamientos de Colchicina y Doxorubicina respectivamente; se observó que la Colchicina en la dosis de 0.6 mg/kg presentó una citotoxicidad bastante notoria por que hubo una disminución en la frecuencia de EPC desde las 24 horas teniendo su máxima disminución a las 48 horas. Se presentó el mismo comportamiento con la Colchicina a dosis de 1.0 mg/Kg, teniendo diferencias en la respuesta, la cual es más marcada en la dosis de 0.6 mg/kg debido a la doble administración a las 24 horas de tratamiento. En ambos casos se tiene la máxima inducción a la 48 horas; y a las 72 horas se presentó recuperación más acentuada en la dosis de 0.6 mg/kg. La recuperación sin embargo, se presenta de forma más lenta en la dosis de 1.0 mg/kg. (fig. 9 pag.32)

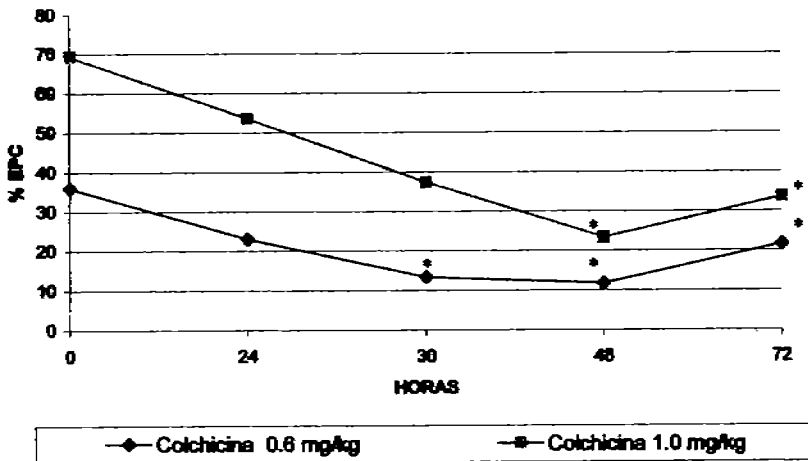


Figura 9. % de EPC/1000 eritrocitos producidos por colchicina.
*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al tiempo cero.

Por otra parte, cuando se administró Doxorubicina a dosis de 5 mg/kg se observó un incremento en la frecuencia de EPC/1000 eritrocitos a las 30 horas y disminuyó a las 48 horas y continuó hasta las 72 horas. A la dosis de 10 mg/kg de peso, se presentó el mismo comportamiento en los diferentes tiempos. Cabe mencionar que algunos animales de experimentación a las 72 horas murieron, por lo que los datos fueron tomados de los que quedaron vivos. (fig. 10 pag 33)

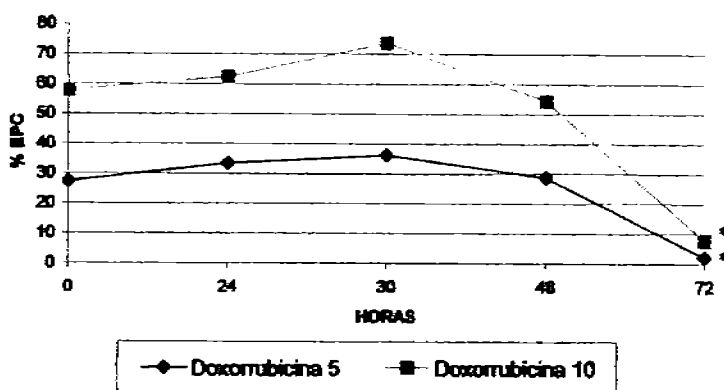


Figura 10. % de EPC/1000 eritrocitos producidos por Doxorubicina. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al tiempo cero.

La relación de EPC/1000 eritrocitos para el compuesto LQM211 a la dosis de 30 mg/kg no presentó disminución significativa en ninguno de los tiempos, solo una muy discreta a las 48 horas. En las dosis de 100 y 300 mg/kg se presentó el mismo comportamiento, siendo mas marcado, en la dosis de 300 mg/kg; las tres dosis presentaron un incremento hacia la recuperación después de 72 horas (fig. 11 pag 34).

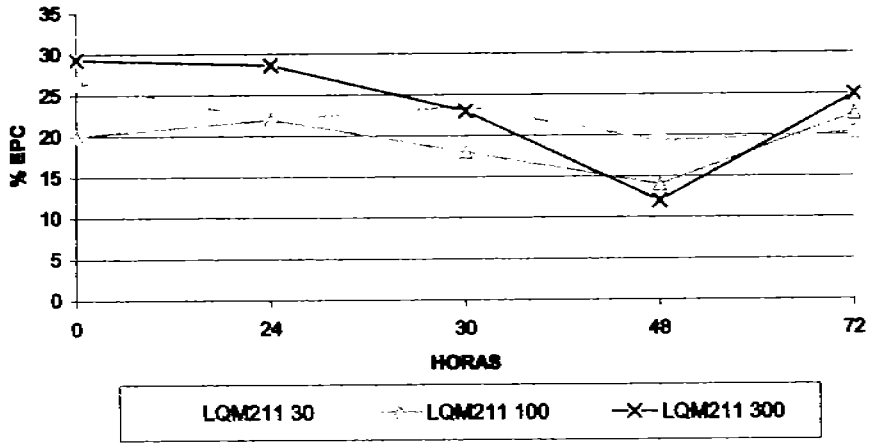


Figura 11. %de EPC/1000 eritrocitos producidos por LQM 211.
 No hubieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al tiempo cero.

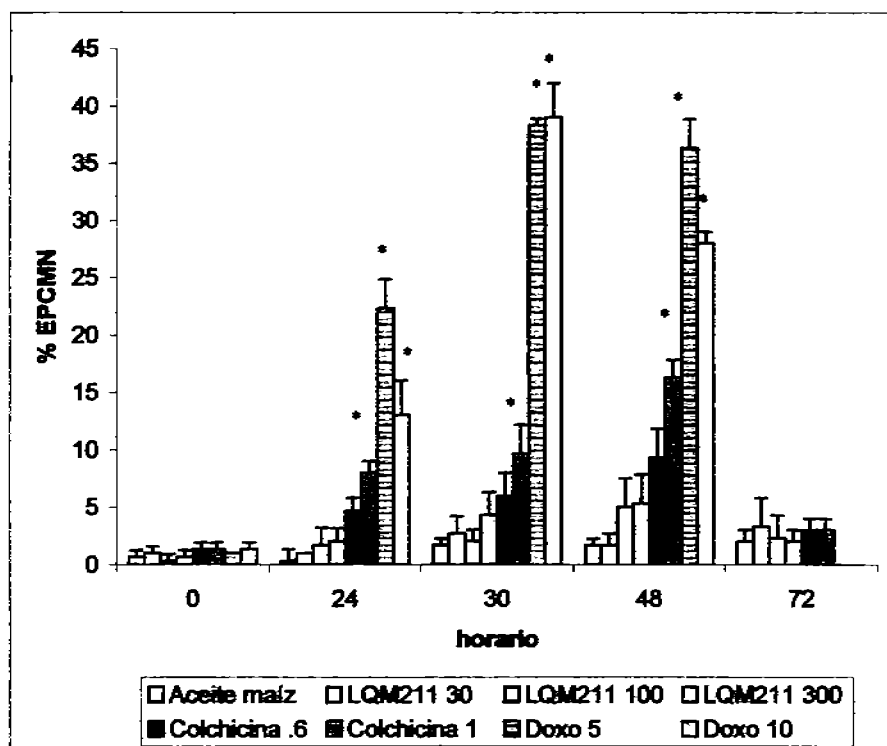


Figura 12. Frecuencia de EPCMN en todos los grupos y tratamientos.
 *Diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles.

La figura 12 muestra los resultados de EPCMN/1000 EPC para Colchicina a dosis de 0.6 mg/kg presentando un aumento desde las 24 horas de administración la cual tuvo su máxima a las 48 horas. Esta dosis tuvo una segunda administración a las 30 horas del ensayo. En la dosis de 1.0 mg/kg se observó el mismo comportamiento que la anterior, aumentando desde las 24 horas post administración y teniendo su máxima a las 48 horas, siendo estadísticamente significativo en este tiempo. Además presentó disminución a las 72 horas a valores casi basales.

Con lo que respecta a la Doxorubicina en dosis de 5 mg/kg (figura 12), se observó un aumento estadísticamente significativo en la relación de EPCMN/1000 EPC desde las 24 horas de administración y tuvo un máximo

a las 30 horas en donde se realizó una segunda administración de esta dosis, y a las 48 horas inició la disminución de EPCMN. En la dosis de 10 mg/kg presentó un ligero aumento de MN comparado con la dosis anterior (5 mg/kg), a las 30 horas llegó a ser de igual número y disminuyó de manera más pronunciada desde las 48 horas. En ambas dosis de Doxorrubicina se presentó la ausencia de células y MN a las 72 horas del ensayo, debido a la muerte de los animales de experimentación que presentaron una ligera coloración azul característica de anoxia.

El ensayo realizado, utilizando el suero de la paciente con síndrome CREST, dió resultados falsos negativos; debido a la inespecificidad de la señal emitida dada la gran cantidad de anticuerpos encontrados en circulación y por ende en la muestra de suero de la paciente. Se prepararon dos diluciones del suero de la paciente las cuales fueron 1:100 y 1:1000 siguiendo la metodología para teñir cinetocoros. Estas diluciones sin embargo no permitieron identificar lo que se buscaba durante el desarrollo del presente trabajo, ya que al observar a las células teñidas para identificar los cinetocoros, se observó una coloración fluorescente inespecífica en todas las células por lo que se decidió el emplear solo el anticuerpo comercial. Con lo cual se presentan los siguientes resultados

En las dosis del compuesto de ensayo el LQM211 (ver fig 12, pag 35) no se presentó aumento significativo en el número de micronúcleos en ninguna de las dosis experimentales, sólo se apreció un discreto aumento dentro de niveles normales en las dosis de 100 y 300 mg/kg.

CINETOCOROS

En los resultados del ensayo para diferenciar el tipo de micronúcleos que se producen a través de los cinetocoros positivos y negativos se encontró que en la Colchicina el 20% de todos sus micronúcleos fueron cinetocoros positivos K(+) siendo el 70 % restante cinetocoros negativos K (-) (fig. 13 pag 38).

Doxorrubicina no presentó cinetocoros positivos K(+) de tal manera que el 100% de sus micronucleos fueron negativos K(-).

Con respecto a LQM211 en el cual solo a las dosis de 300 mg/kg se produjeron escasos micronúcleos siendo solo el 1 % cinetocoro positivo K(+) siendo el resto cinetocoros negativos (K-). (fig. 13 pag 38).

En la figura 14 (pag 38), puede observarse que otros compuestos de la familia de estos carbamatos LQM 996 Y LQM 919 producen el mismo tipo de micronúcleos, o sea por clastogenicidad.

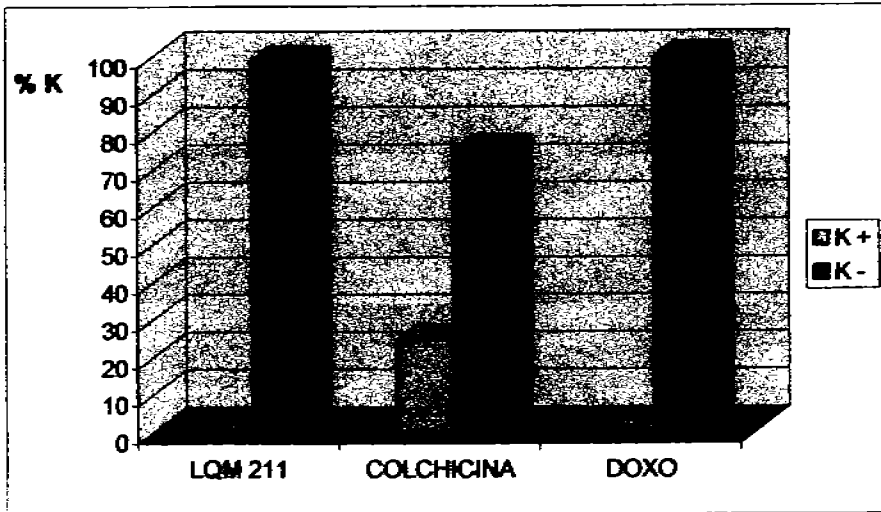


Figura 13. Presencia de cinetocoros K+ y K- producidos por los compuesto experimentales. De acuerdo a esto el mecanismo de formación de MN del compuesto LQM211 es de tipo clastogénico.

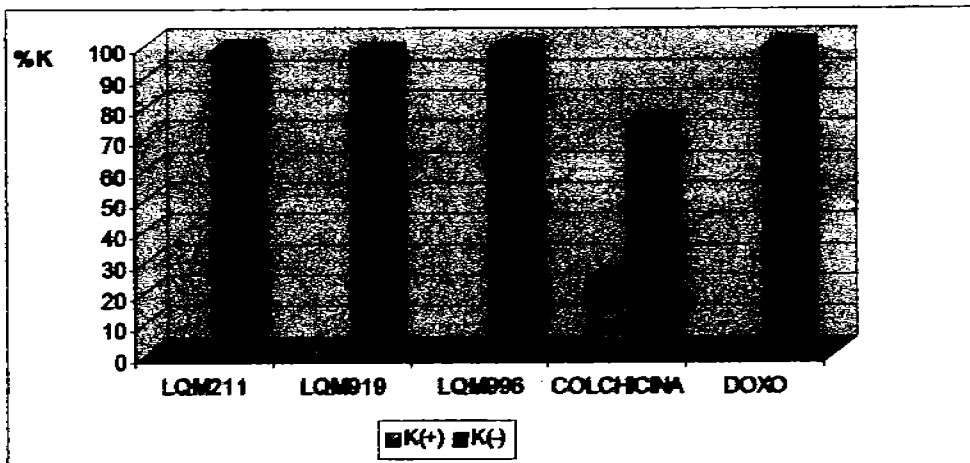


Figura 14. Frecuencia de los cinetocoros K+ y K- producidos por diferentes derivados carbámicos en los cuales se hace evidente el efecto clastogénico para todos los compuestos LQM

DISCUSIÓN.

La evaluación de los diferentes compuestos sobre la actividad mitótica medular, se realizó mediante la cuantificación de la relación EPC/1000 eritrocitos, es decir, la proporción de células jóvenes, producidas y liberadas durante el tiempo de exposición de los xenobióticos, por lo que un incremento en su número sugiere un daño a la médula ósea lo que se traduce en una aceleración del producto eritropoyético, o bien, en caso contrario, una disminución de la relación de EPC/1000 eritrocitos indica una supresión de la actividad eritropoyética (Márquez,2003).

En diversos estudios se ha usado la cinética de EPCMN con el fin de establecer algunos parámetros farmacéuticos o aún inferencias acerca de la farmacodinamia de algunos mutágenos acorde a los análisis de inducción de EPCMN, determinados en sangre periférica dependiente de los efectos que puede causar el xenobiótico sobre la división celular, la farmacocinética del agente, requiriendo la activación metabólica y el mecanismo para la inducción de MN.

La relación entre genotoxicidad y citotoxicidad de los xenobióticos es difícil de discernir, porque varios de estos agentes que dañan el DNA tienen ambos efectos. Una posible explicación, es que, estos agentes son considerados alquilantes, reaccionan con distintas moléculas esenciales para la función y la vida de la célula, lo cual tiene gran importancia con los fármacos alquilantes antineoplásicos porque éstos son usados para la muerte celular y aún en cierto modo dañan ambos tipos de células sanas y neoplásicas. En cierto modo, los aneuploidógenos no dañan directamente el ADN, lo hacen afectando el equilibrio, por pérdida o ganancia de cromosomas y esto los hace genotóxicos por disfunción microtubular involucrada en diversas funciones celulares, siendo ésta la principal razón

por lo que se usan diversos aneuploidógenos en los tratamientos contra el cáncer.

Altas dosis de Colchicina son la causa de un decaimiento en la división celular, lo que indica que llega a ser citotóxica, dado que afecta procesos celulares dependientes de microtúbulos, particularmente requeridos en el metabolismo como transporte intracelular de vesículas y proteínas.

La Colchicina redujo el índice de EPC/1000 eritrocitos a las 48 horas de tratamiento, efecto citotóxico esperado de acuerdo a las actividades ya probadas de este antimitótico, ampliamente utilizado para realizar preparaciones cromosómicas (Hayashi y col, 1994) por su capacidad de inhibir la polimerización de los microtúbulos de tubulina (Russell y col, 1992).

Lo anterior se observa en ambas dosis administradas en el ensayo. Empleando dosis de Colchicina hubo una disminución de células que se ve reflejada con el paso del tiempo, en dosis de 1.0 mg/kg presentó una disminución en la relación EPC/1000 eritrocitos lenta al ser comparada con la dosis de 0.6 mg/kg, dado que, ésta fue una doble administración de Colchicina a las 24 horas postadministración. La caída en el índice celular se presentó a las 30 horas con respecto a la dosis de 1.0 mg/kg, sin embargo la recuperación es más rápida en la dosis de 0.6 mg/kg como se aprecia a las 72 horas que ha recuperado casi el basal, mientras que en dosis de 1.0 mg/kg la recuperación es mas lenta lo que nos indica un efecto dependiente de la dosis administrada.

En cuestión a la Doxorubicina se tiene un aumento en la relación EPC/1000 eritrocitos en ambas dosis, que se hace evidente desde las 30 horas de administración, siendo mas evidente en la dosis de 5.0 mg/kg

que tuvo al igual que la colchicina de menor dosis una doble administración a las 24 horas, y por tanto aumentó significativamente el número de MN a las 30 horas. Lo anterior hace suponer que este aumento se presentó debido a una respuesta del organismo por compensar el efecto que la Doxorubicina produjo sobre la médula ósea al deprimirla de manera violenta. Como se sabe, este compuesto es usado durante las terapias para combatir el cáncer, lo cual evidencia un decaimiento en la relación EPC/1000 eritrocitos a las 48 horas en ambas dosis, por lo que resultó difícil encontrar EPC en circulación. Además se vió acompañado este decaimiento con la muerte de algunos ratones después de 48 horas (como se comentó en las sección de resultados fig 9 pag. 32 para colchicina y fig 10 pag. 33 para doxorubicina). Los animales presentaron un color ligeramente azul en orejas y lengua amoratada al igual que en otras mucosas, es por esta razón que no se obtuvieron datos suficientes para continuar con el comportamiento a las 72 horas y solo se presentaron los resultados de los animales sobrevivientes.

En ambos compuestos colchicina y doxorubicina utilizados como testigos positivos se observó un comportamiento que va en línea con los efectos sobre las células, el aumento en los MN y la disminución de EPC (fig 12 pag 35). Solo que en doxorubicina el efecto fue más crítico y condujo a la muerte de los animales en experimentación; mientras que en Colchicina se sobreviene la recuperación después de las 48 horas.

El compuesto LQM-211 no presentó efecto citotóxico con la primera dosis de 30 mg/kg, mientras que en las dosis de 100 y 300 mg/kg se presentó disminución en la relación EPC/1000 eritrocitos a las 48 horas del ensayo; ésto se debe probablemente a que los carbamatos se utilizan principalmente como insecticidas por su habilidad para inhibir la acetil colinesterasa en el sistema nervioso, produciendo entre otros síntomas,

fallas respiratorias que disminuyen el aporte de oxígeno en el organismo, es decir, producen un estado de hipoxia e incluso de anoxia. En la literatura se menciona el desarrollo de reticulocitosis en enfermedades hemolíticas crónicas, después de estados hipóxicos o de hemólisis intra vascular, debido a un reemplazo de las células eritrocitarias en la medula ósea (Terry y Hutson, 1999). Cabe mencionar que el carbamato tiene un comportamiento similar a la Colchicina al disminuir el índice celular, y el mismo mecanismo de recuperación que en Colchicina, dependiente de la dosis (comparar la tendencia que se presentan en las figuras 9 y 11 pag 32 y 34 respectivamente).

En la frecuencia de EPCMN el LQM211 (fig 12, pag 35) no presentó un aumento significativo con respecto a la Colchicina o Doxorubicina. En la dosis de 30mg/kg no presentó ningún aumento en el número de MN con respecto al aceite de maíz, mientras que en las dosis de 100 y 300mg/kg se presentó un aumento que no es considerado como significativo, pues ya que fue de 5 MN a las 48h; además, ésto condujo a pensar que el compuesto LQM211 es dependiente de la dosis como lo es la Colchicina.

Con lo que respecta a cinetocoros, el compuesto LQM211 solo presentó el 1% de cinetocoros K(+), lo que conlleva a pensar dado este pequeño porcentaje que tiene un mecanismo de formación de cinetocoros muy parecido al de Doxorubicina (cinetocoros K(-)) y no actúa sobre el centrómero; a diferencia de los resultados de la Colchicina que presenta un mayor porcentaje K(+) (fig 13 pag 38).

En comparación con otros nuevos derivados carbámicos como lo es el LQM996 considerado como el líder del proyecto, la frecuencia de EPCMN presentó la máxima inducción de MN a las 48h (Márquez,2003), que fue la misma encontrada en el compuesto LQM211 (fig 12 pag 35).

El compuesto LQM996 no presenta efecto citotóxico en las dos primeras dosis 10 y 30 mg/kg empleadas y solo presentó un incremento de la relación EPC/1000 eritrocitos en la tercera dosis evaluada de 300mg/kg a las 48 horas de la administración (Márquez, 2003).

De esta manera el compuesto LQM211 en ninguna de las dosis empleadas presentó un incremento de la relación EPC/1000 eritrocitos y por el contrario se obtuvo una disminución en la relación EPC/1000 eritrocitos en las tres dosis empleadas siendo solo apenas estadísticamente significativa en las dosis de 100 y 300mg/kg a las 48 horas de la administración evidenciando así que el compuesto no es citotóxico (figura 11 pag 34).

Con respecto al tipo de cinetocoros que genera el compuesto LQM211, se observó que de los pocos micronúcleos que se inducen, la mayor parte son cinetocoros negativo K(-) y que comparado con los compuestos ya anteriormente evaluados (LQM919 Y LQM996) no mostró diferencias estadísticamente significativas siendo así un compuesto no genotóxico (fig 14 pag 38).

Por otra parte es importante mencionar que de acuerdo con otros resultados de evaluación genotóxica experimentales como lo fue la determinación de la frecuencia de ICH's (Hernández 2003) y el presente trabajo, los carbamatos que muestran mayor beneficio y menor daño han sido LQM996 y LQM211, esto permite deducir, que puede ser efectivo su empleo en el tratamiento contra los padecimientos para los cuales fueron sintetizados, lo que representa una ventaja respecto a los efectos secundarios que acompañan a los diversos fármacos que en la actualidad se emplean.

La modificación química del compuesto LQM996 no cambió el comportamiento genotóxico de dicho compuesto, por lo que se llegó a la conclusión de que el compuesto LQM211 es una molécula adecuada para continuar los estudios farmacológicos y farmacocinéticos que permitirán introducirlo al mercado como un antibiótico.

CONCLUSIONES.

El compuesto LQM211 no resultó ser genóxico ya que no incrementó de manera significativa la frecuencia de EPCMN en ninguna de las dosis probadas.

Los escasos micronúcleos producidos por el derivado LQM211 no fueron originados por rezago anafásico (aneuploidia), sino por ruptura cromosómica (clastogenicidad) ya que la mayoría de MN producidos fueron cinetocoros negativos K(-).

El compuesto LQM211 no resultó ser citotóxico, ya que su administración no alteró la relación de EPC/1000 eritrocitos.

BIBLIOGRAFÍA.

Ángeles E., Santillán A., Martínez I., Ramírez A, Moreno E. (1994) A simple method for the synthesis of carbamates. *Synthetic Commun.* 24: 2441-2447

Ángeles, E.; Martínez, P.; Keller, J.; Martínez, R.; Rubio, M.; Ramírez G.; Castillo, R.; López-Castañares, R. y Jiménez, E.(2000) Ethyl and methylphenylcarbamates as antihelminthic agents: theoretical study for predicting their biological activity by PM3 *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 504: 141-170

Bennington, J L. (1991) *Diccionario Enciclopédico del Laboratorio Clínico*, Editorial Médica Panamericana, Argentina. pp: 212, 283, 284, 422, 423.

Berkow, R. (1986) *El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica*, Nueva Editorial Interamericana, México, pp:1114,1115,1124,1125.

Bernal, Sandra. (2000). *Evaluación de algunos productos derivados del ácido carbámico como agentes antimicrobianos*. Tesis de licenciatura. FES-Cuautitlán. UNAM.

Collins B.W., Howad D.R., y Allen J.W. (1992) Kinetochore-staining of spermatid micronuclei: Studies of mice treated with X-radiation or acrylamide. *Mutation Research.* 281: 287-294.

Davidsohn and Henry (1978). *Diagnóstico Clínico por el laboratorio*, Salvat, España, pp: 1125.

Díaz Barriga S. y Bonilla R (2001). Técnicas básicas en citogenética, México, UNAM.

Eastmond, D A y Tucker, J D (1989). Identification of Aneuploidy-Inducing Agents Using Cytocinesis-blocked Human lymphocytes and a Antikinetochore Antibody Environmental and Molecular Mutagenesis. 13 : 34-43.

Gudi R, Sandhu SS, Athwal RS. (1990) Kinetochore identification in micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes: An assay for the detection of aneuploidy-inducing agents. Mutation Research. 234: 263-268

Hassall Kenneth A. 1990. The biochemistry and Uses of Pesticides. VHC Publishers. PP 125-152

Hayashi M, Mac Gregor J.T., Gatehouse D.G., Adler I., Blakey D.H., Dertinger S.D., Krishna G., Morita T., Russo A., Sutou S. (2000). In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay: II. Some Aspects of Protocol Design Including Repeated Treatments, Integration UFT Toxicity Testing, and Automated Scoring. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35:234-252.

Heddle J.A. y Carrano A.V. (1977) The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by irradiation: Evidence that micronuclei arise from acentric fragments. Mutation Research 44:63-69.

Hernández D.A., Lombardo R.J. y Tortorelli. (1990). Toxicity of Ethylparathion on Carbaryl on Early Development of Sea Urchin. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*. 45: 734-741

Hernández, M. (2003) Estudio genotóxico de fenilcarbamatos en cultivo de linfocitos humanos por medio de frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, Tesis de licenciatura FESC-UNAM.

Jiménez, E., Flores, A., Angeles, E., Martínez, P., López, C., Castañeda, H. y Pérez, U. (2003) In vitro antiangiogenic activity of IRE-6a and IRE 7B, two ethylphenylcarbamate derivatives. *Revista de investigación Clínica*, 55: 444-447.

Kahale ,M.B. (1992) The role of vascular endothelium in fibroblast activation and tissue fibrosis, particularly in scleroderma (systemic sclerosis) and pachydermoperiostosis (primary hypertrophic osteoarthropathy). *Clinical Experimental Rheumatology*, 10 (Suppl.7)5.

Klaassen C.D. ed. (1991). Casarett and Doull's. *Toxicology the basic science of poisons*, 5ta edición, Mc Graw-Hill, USA. pp 883-905.

LeRoy, E.C. (1992) A brief overview of the pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis). *Annual Rheumatology Diseases*. 51:286.

Lu, F.C. (1992) *Toxicología Básica*. Harla, México

Maan, J. D. y Storey, W. B. (1996). Rapid action of carbamate herbicides upon plant cell nuclei. *Cytology*. 31:203-207.

Márquez, P. (2003) Actividad genotóxica de cuatro derivados carbámicos en ratón y análisis de la relación de dicho efecto con su estructura química. Tesis de maestría en Biomedicina. ENCB del IPN.

Minero Claudia E. (1997). Comparación de la eficacia anticestódica de dos principios de nueva síntesis contra el praziquantel, usando *Hymenolepis nana* como modelo en ratones. Tesis de Licenciatura FES-C UNAM.

Mitchell, A. R.(1996) The mammalian centromere: its molecular architecture. *Mutation Research*. 372:153-162.

Mole-Bajer J, Bajer AS, Zinkowski RP, Balczon RD, Brinkley BR. (1990). Autoantibodies from a patient with scleroderma CREST recognized Kinetochores of the higher plant *Haemanthus*. *Proceeding National Academic Science Cell Biology*. USA 87:3599-3603.

Ordaz C, Shibayama M, Villa-Treviño S, Arriaga-Alba M, Angeles E y De la Garza M (2004) Antiamoebic and toxicity studies of a carbamic acid derivative, and its therapeutic effect in the hamster model of hepatic amoebiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (American Society for Microbiology).

Ramadevi, G; Shahbeg, S. S. and Raghbir S. A.(1990). Kinetochores identification in micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes: An assay for the detection of aneuploidy-inducing agents. *Mutation Research*.234:263-268.

Ramírez Rivas E. (2005). Estudio inmunotoxicológico de derivados del ácido carbámico : carbametil y carbametoxi. Tesis de maestría FES-Cuautitlán-UNAM.

Russell G. Gill J. Lacey E. (1992). Binding of [3H] Benzimidazol carbamates to mammalian brain tubulin and mechanism of selective toxicity of benzimidazole anthelmintics. *Biochemical Pharmacology*. 43: 5: 1096-1100.

Salamanca, G. F. (1993) *Citogenética humana fundamentos y aplicaciones clínicas*, Ed. Médica Panamericana, México, pp:37-40, 53-60, 83-91.

Salomone, F; Mavoinin, K (1994) Bone marrow micronucleus assay: Review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 12:421-430.

Schmid, W; Von, M.(1973) The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Research*.19:109-117.

Schmid, W.(1975) The micronucleus test. *Mutation Research*.31:9-15.

Seoane, A.I.; Dulout, F.N.(2001) Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutation Research* 490:99-106.

Solari, Alberto J. (1999). *Genética humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina*, 2ª edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana.

Sontheimer, R.D., (1991). Antinuclear antibodies. Clinical correlations and biology significance. *Advance of Dermatolgy*. 7: 3.

Sullivan B.A. Swartz S. y Willard H.F. (1996) Centromeres of human chromosomes. 28:182-1191.

Tarditt, R; Lohman, P; Wogan, G.(1994) Methods to asses DNA Damage and repair. Interepecies Comparisons.

Terry R. y Hutson D. (1999). Parte dos: Insecticides and fungicides. In Metabolic Pathways of Agrochemicals. The Royal Society of Chemistry Information Services. U.S.A. 1999.

Vademecum México 2001(CD Interactivo).Aventis Bohering.

Vallarino, T. y Morales, P. (2001) Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast in vivo. Mutation Research 495: 51-59

Verma, R; Babú, A.(1995) Human chromosomes. Principles and techniques. Mcgraw Hill.

Wakata A. y Sasaki M.S. (1987) Measurement of micronuclei by cytokinesis block method in cultured Chinese Hamster cells: comparisons with types and rates of chromosome aberration. Mutation Research 71:127-131.