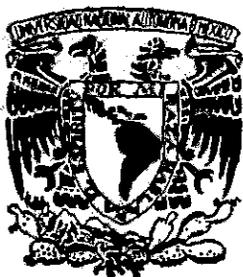


201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA**

ESTUDIOS PROFESIONALES
1120
0237

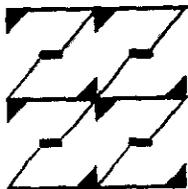
**ESTUDIO GENOTOXICO DE TRES NUEVOS
AGENTES ANTIPILEPTICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
GUADALUPE GUERRERO HERNANDEZ

DIRECTOR EXTERNO: M. en C. LOURDES ELVIA RUIZ FLORES
DIRECTOR INTERNO: DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO

**U N A M
F E S
Z A R A G O Z A**



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON

PLAZA DE ORIGEN

277548



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.

.....Caminante no hay camino
se hace camino al andar.....

Antonio Machado

Dedicatorias

Con profunda admiración, amor y respeto a la memoria de mi padre que estaría inmensamente feliz de compartir este día conmigo.

A mi madre que junto con mi padre me enseñaron el amor, la honradez, dedicación y cumplimiento que se le debe a la vida y al trabajo.

A mis hermanos por su amor y gran ayuda en muchas etapas de mi vida.

A Martín: ve..... Yo cuido al bebé.

A mis hijos por su gran amor y paciencia.

A mis familiares y amigos por su entusiasmo y ayuda.

A los amigos del CEACA: profesores, estudiantes, tesistas y de trabajo social por su amistad.

Al Director del CEACA M. en C. Alfonso Buenrostro por ayudarme a concluir esta etapa de mi vida así como a la superación constante que ella conyeva.

A la M en C. Elvia Ruíz Flores por brindarme constantemente la oportunidad de superarme en esta parte maravillosa del estudio de la Vida que es la Genética.

Al Dr. Mario Altamirano por su gran calidad humana y profesional.

Al Dir. de Empaquim, S.A. de C.V. Alberto Díaz Flores por las facilidades para la realización del manuscrito y material de apoyo del presente trabajo.

INDICE

	Pág.
INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCION	1
1. Mecanismos de Acción de los Fármacos	1
1.1. Antagonismo Farmacológico	2
1.2. Aspectos Cuantitativos de la Acción del Fármaco	2
1.3. Antagonista Competitivo	4
1.4. Antagonismo No Competitivo	4
2. Metabolismo de los Fármacos	5
3. Farmacosíntesis	9
3.1 Quiralidad y su Importancia en el Desarrollo de Fármacos	9
4. Toxicidad de los Fármacos	12
4.1 Efecto Tóxico Local	12
4.2 Efecto Tóxico Sistémico.	13
4.3 Efecto Reversible y efecto Irreversible.	13
4.4 Efecto Indeseable o Colateral.	14

	Pág.
4.5 Alergia Química.	15
4.6 Idiosincracia Química.	15
5. Introducción de Drogas Nuevas	16
6. Epilepsia	21
6.1. Fármacos Anticonvulsivos	27
6.2. Mecanismos Celulares de la Epilepsia	29
6.3. Mecanismos de Acción de los Fármacos Antiepilepticos	30
7. Genoma Celular	34
7.1. Composición y Estructura de los Acidos Nucléicos	34
7.2. Mutación	36
7.3. Mutagénesis Química	39
7.4. Bases Moleculares de la Mutación	42
7.4.1. La transformación de pares de bases	43
7.4.2. Adición o supresión de un par de bases	43
7.4.3. Supresiones y transposiciones mayores	43
7.4.4. Partición desigual de los cromosomas entre las células hijas	44
7.4.5. Mutagénesis Física	44
7.5. Manifestaciones Clínicas de la Mutación	46
7.6. La Línea Germinal Humana	48
8. Carcinogénesis	49
9. Teratogénesis	51
10. Pruebas de Genotoxicidad	52
10.1. Pruebas en ADN Aislado	53
10.1.2. Pruebas en Virus	54

	Pág.
10.3. Pruebas en Microorganismos	54
10.1.3.1. Bacterias	54
10.1.3.2. Hongos	55
10.1.3.3. Estrategias para Determinar la Actividad Genética de Metabolitos	55
10.1.4. Pruebas en Cultivos de Células de Mamíferos	56
10.1.5. Pruebas en Insectos	56
10.1.6. Pruebas en Plantas	57
10.1.7. Pruebas en Mamíferos no Humanos	58
10.1.8. Pruebas en Humanos	59
11. Prueba de Micronúcleos en <i>Tradescantia</i> (MCN-TRAD)	59
11.1 Meiosis en <i>Tradescantia</i>	61
Primera División Meiótica	62
Segunda División Meiótica	64
II. JUSTIFICACIÓN	66
III. HIPOTESIS	66
IV. OBJETIVOS	67
A. Objetivo General	67
B. Objetivos Particulares	67
V. MATERIALES Y METODOS	68

	Pág.
A. Preparación de las Soluciones de los Fármacos	68
B. Ensayo Biológico	69
1. Cultivo del Material Biológico	69
2. Ensayo para Tratamientos con Fármacos	70
3. Obtención de las Preparaciones	71
4. Observación y Registro de Micronúcleos	72
5. Análisis Estadístico	73
VI. RESULTADOS	75
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	93
VIII. CONCLUSIONES	108
IX. REFERENCIAS	109

INDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA I Alteraciones Genéticas.	38
TABLA II Mecanismos de Acción de Algunos Mutágenos.	41
TABLA III Pruebas de Genotoxicidad.	53
TABLA IV Frecuencia de Micronúcleos en Células Meióticas de Tradescantia Clon 4430 Inducidos por el Control Negativo y el Fármaco DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (DL-HEPB).	76
TABLA V Citotoxicidad Inducida por el fármaco DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (DL-HEPB) a la Concentración de 10mg/ml.	78
TABLA VI Frecuencia de Micronúcleos en Células Meióticas de Tradescantia Clon 4430 Inducidos por el Control Negativo y el Fármaco DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenilpropionamida (DL-HEPP).	81
TABLA VII Citotoxicidad Inducida por el Fármaco DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenilpropionamida (DL-HEPP) a la Concentración de 10 mg/ml.	83

TABLA VIII	Frecuencia de Micronúcleos en Células Meióticas de Tradescantia Clon 4430 Inducidos por el Control Negativo y el Fármaco DL-2-hidroxi, 2-etil, 2-fenilacetamida (DL-HEPA).	86
TABLA IX	Citotoxicidad Inducida por el Fármaco DL-2-hidroxi, 2-etil, 2-fenilacetamida (DL-HEPA) a la Concentración de 10 mg/ml.	88
TABLA X	Frecuencia de Micronúcleos en Células Meióticas de Tradescantia Clon 4430 inducidas por el Control Negativo (agua destilada) y el Control Positivo (Etil, Metano Sulfonato, 200 mM).	91
TABLA XI	Ecuaciones que Rigen el Efecto Genotóxico de los Fármacos Antiepilépticos DL-HEPB y sus dos Homólogos Inferiores DL-HEPP y DL-HEPA.	92

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1 Relación Dosis-Respuesta Farmacológica.	3
Fig. 2 Registros Encefalográficos en la Epilepsia.	23
Fig. 3 Anormalidad en la Transmisión Aminoacídica.	30
Fig. 4 Estructura Química del DL-HEPB y sus dos Homólogos Inferiores, DL-HEPP y DL-HEPA.	33
Fig. 5 Estructura Química de una Sección de ADN.	35
Fig. 6 Componentes Celulares Susceptibles a los Procesos Mutagénicos.	39
Fig. 7 Riesgos Clínicos de las Mutaciones.	47
Fig. 8 Meiosis en <i>Tradescantia</i> .	65
Fig. 9 Planta Completa de <i>Tradescantia</i> Clon 4430.	69
Fig.10 Diagrama de Flujo de la Metodología de MCN-TRAD.	74

	Pág.
Fig. 11 Curva Dosis Efecto para el Fármaco DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (DL-HEPB).	77
Fig. 12 Células Meióticas de <i>Tradescantia</i> Clon 4430 que muestran los Efectos Citotóxicos Provocados por el Fármaco, DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida(DL-HEPB), a la Concentración de 10 mg/ml.	79
Fig. 13 Curva Dosis-Efecto para el Fármaco 3-hidroxi, DL-3-etil, 3-fenil- propionamida (DL-HEPP).	82
Fig. 14 Células Meióticas de <i>Tradescantia</i> Clon 4430 que muestran los Efectos Citotóxicos Provocados por el fármaco DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenil-propionamida (DL-HEPP) a la Concentración de 10 mg/ml.	84
Fig. 15 Curva Dosis-Efecto para el Fármaco DL-2-hidroxi, 2-etil, 2-fenilacetamida (DL-HEPA).	87
Fig. 16 Células Meióticas de <i>Tradescantia</i> Clon 4430 que muestran los efectos Citotóxicos Provocados por el Fármaco DL-2-hidroxi, 2-etil, 2-fenilacetamida (DL-HEPA) a la Concentración de 10 mg/ml.	89

RESUMEN

En el mundo el número de pacientes que reciben fármacos antiepilépticos se estima que es entre 20 y 40 millones y en nuestro país existen más de un millón de personas que la padecen. Es por ello, que en 1986 la Secretaría de Salud (SSA) desarrolló un Programa Prioritario de Epilepsia debido a su impacto social y económico. En dicho programa, en coordinación con el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB-IPN) y otras instituciones más, auspician el desarrollo de la investigación en nuevos fármacos con la finalidad de obtener medicamentos accesibles económicamente para muchos enfermos que no pueden continuar sus tratamientos por su alto costo.

Muchos fármacos usados en el tratamiento de la epilepsia se han encontrado que son mutagénicos y teratogénicos en animales de laboratorio. Esto ha demostrado que algunos de estos fármacos como la fenitoina, carbamazepina y ácido valproico incrementan significativamente las frecuencias de aberraciones cromosómicas *in vivo* e *in vitro*.

Debido a que el ácido desoxirribonucleico (ADN) de todos los organismos es similar en su estructura fundamental y su mecanismo de replicación, se puede utilizar sistemas biológicos convenientes para valorar si un fármaco o un agente químico es agresivo para el material genético del humano. Entre estos sistemas se encuentra el de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* (MCN-TRAD). Se considera como una prueba altamente sensitiva, rápida y de fácil manejo para probar el potencial genotóxico de una gran variedad de agentes.

Los resultados del presente estudio muestran que la concentración de 7 mg/ml es genotóxica para los fármacos DL-HEPB y DL-HEPA con un coeficiente de determinación del 75.85% y 75.79% respectivamente y de 3 mg/ml para DL-HEPP con un coeficiente de determinación de 96.82% estos coeficientes indicaron

que una probabilidad alta de que el efecto genotóxico fué producido por los fármacos y a concentraciones mayores se observó citotoxicidad, manifestándose como alteraciones nucleares, muerte celular en un 13.52% y retraso del ciclo celular para los fármacos a la concentración de 10 mg/ml. Las concentraciones que inducen genotoxicidad a *Tradescantia*, son menores a las que se han utilizado en estudios preliminares en la terapéutica de la epilepsia.

I. INTRODUCCION

Muchos productos químicos poseen actividad selectiva útil en el tratamiento de las enfermedades, estrictamente hablando, se denominan medicamentos o drogas y su utilización forma parte de la terapéutica. Desde el punto de vista histórico, el interés en los fármacos y sus efectos se ha vinculado íntimamente con la medicina. Hoy en día la necesidad de nuevos compuestos con actividad selectiva útil para combatir la enfermedad, es el más fuerte incentivo para continuar la labor de investigación. Aunque la farmacología moderna guarda estrecha relación con la medicina, depende en gran parte de ciencias como física, química y biología básicas, para su teoría y su técnica (Bevan y col., 1982; Goldstein y col., 1995; Katzung, 1996).

De acuerdo al Diario Oficial de la Federación Mexicana del 31 de julio de 1988, la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos de la Industria Química Farmacéutica dedicadas a la Fabricación de Medicamentos, un fármaco o ingrediente activo es toda sustancia natural o sintética que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas; que no se presente en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleado como medicamento o ingrediente de un medicamento.

1. Mecanismos de Acción de los Fármacos

Los fármacos, o sustancias con actividad selectiva, actúan en algunas células y no en otras; por esta razón, deben producir su efecto en algún sitio o sistema específico destinado exclusivamente a la respuesta, o que guarda relación intrínseca con ella. Este componente de la célula capaz de reaccionar, recibe el nombre de receptor, y se define como el sitio de unión de un fármaco desde el cual

ejerce su acción selectiva (Bevan y col., 1982; Goldstein y col., 1995).

La fijación de los fármacos a los receptores puede implicar todo tipo de interacciones: iónicas, puentes de hidrógeno, hidrófobas, de van der Waals y covalentes. En la mayoría de las interacciones entre fármacos y receptores es probable que las uniones de varios tipos tengan importancia. Si la fijación es covalente, la duración del agente con frecuencia, pero no necesariamente, es prolongada. Las interacciones no covalentes de gran afinidad también pueden ser irreversibles (Goodman y Gilman, 1994; Goldstein y col., 1995).

1.1 Antagonismo Farmacológico

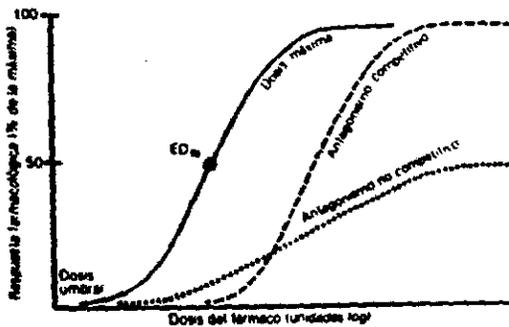
La actividad selectiva de muchos fármacos puede bloquearse o antagonizarse específicamente por acción de otros agentes. Frecuentemente, el antagonismo entre un fármaco (agonista), y su agente bloqueador selectivo o específico (antagonista), ocurre en el mismo receptor. Esta interacción se conoce como antagonismo farmacológico. Se considera que tales agentes bloqueadores específicos tienen una gran afinidad por el receptor, pero tienen poca o ninguna actividad intrínseca. A menudo ellos comparten algunos de los mismos denominadores comunes estructurales requeridos por sus agonistas. Muchas moléculas bloqueadoras son más voluminosas que las moléculas de los fármacos que antagonizan. Se supone que reaccionan con los receptores en virtud de las características de afinidad que ellas comparten con sus agonistas pero debido a su forma más voluminosa, impiden el acceso de moléculas agonistas al receptor (Bevan y col., 1982; Goldstein y col., 1995).

1.2 Aspectos Cuantitativos de la Acción del Fármaco.

La relación entre la dosis del fármaco y su efecto, es uno de los aspectos más importantes en farmacología. En la figura 1, se muestra la curva dosis-respuesta de un fármaco característico. Cuando se compara en una gráfica la

respuesta contra la dosis o el logaritmo de la dosis, la curva es casi simétrica y en forma de S. En dicha curva se observa, la dosis umbral, que es difícil de definir ya que la capacidad para medir el "cambio umbral" varía con las circunstancias y posiblemente, con el observador. La magnitud del efecto de un fármaco no aumenta indefinidamente. Hay una dosis, la dosis máxima, que produce una reacción máxima. En este caso, de nuevo, la precisión con la cual esta dosis puede estimarse, no es muy grande. A diferencia de lo señalado, la dosis del fármaco para producir su efecto en el 50% de los individuos de una población analizada para efecto máximos, se puede valorar experimentalmente con alguna exactitud y se le denomina dosis eficaz₅₀ (DE₅₀), y es una medida de la potencia del fármaco. Finalmente, el declive de la curva de dosis-respuesta nos indica la velocidad con la cual el efecto de un fármaco cambiará con la dosis. (Bevan y col., 1982; Goodman y Gilman, 1994; Goldstein y col., 1995).

Fig. 1. Relación Dosis-Respuesta Farmacológica.



Relación entre la dosis del fármaco y la respuesta farmacológica correspondiente a un agonista y el efecto de esta relación, entre un antagonista competitivo y otro no competitivo (Bevan y col., 1982).

Se han propuesto varias explicaciones referentes a la forma general de la curva de dosis-respuesta del fármaco. Se supone que una molécula del fármaco reacciona con una molécula del receptor, y que la magnitud de la respuesta está relacionada con el número de combinaciones fármaco-receptor (Bevan y col., 1982).

Esta relación es similar a la clásica ecuación de cinética de Michaelis-Menten, que describe la velocidad de reacción de una enzima en relación con la concentración del sustrato (Bevan y col., 1982; Goodman y Gilman, 1994).

1.3 Antagonista Competitivo.

Un antagonista farmacológico puede tener muy diversos efectos en la curva dosis-respuesta. Si el antagonista reacciona reversiblemente con los mismos receptores, como lo hace el agonista, ellos competirán por ocupar el mismo receptor. Su eficacia relativa dependerá de su afinidad relativa por el receptor, y de su concentración. Un antagonista farmacológico que actúa de este modo, podría desplazar la curva dosis-respuesta hacia la derecha, sin cambiar su forma, su declive o su respuesta máxima (Fig. 1). Se dice que tal antagonismo o bloqueo es competitivo o superable y aunque la respuesta a una dosis particular del agonista quedará reducida o bloqueada por un antagonista, una mayor dosis del agonista podría superar tal bloqueo y ser eficaz (Bevan y col., 1982).

1.4 Antagonismo No Competitivo

En el antagonismo no competitivo, el antagonista interfiere con el efecto producido por el agonista, sin interactuar con éste último, ni con su receptor específico. Un antagonista no competitivo actúa en alguno de los pasos de la reacción bioquímica que conduce, después de la interacción agonista-receptor, a la producción de un efecto. Si un antagonista formó un enlace más estable con su receptor, el cual no fue desplazado por una gran concentración de agonista que

actuase sobre el mismo receptor, es posible que la curva dosis-respuesta se desplace hacia la derecha y sean menores su punto máximo y su inclinación (Fig. 1), tal bloqueo se considera como no competitivo o insuperable.

Si un antagonista es la causa de este patrón de cambio en la curva de dosis-respuesta, tal situación no significa necesariamente que está actuando en el mismo receptor que el agonista. Por ejemplo, podría actuar en algún punto o fase entre la activación del receptor y el fenómeno final que causó la respuesta del efector. En los efectos de casi todos los fármacos hay una serie de reacciones en cadena entre la activación del receptor, y la respuesta, las que representan muchos sitios posibles del efecto del fármaco (Bevan y col., 1982).

2. Metabolismo de los Fármacos.

Todos los organismos tienen mecanismos que permiten transformar a las sustancias químicas y alterar de este modo su toxicidad. Estos mecanismos, que en la mayoría de las ocasiones actúan disminuyendo la toxicidad, ocurren a través de la acción de enzimas, las cuales se encuentran en varios órganos y tejidos. La extensión a la cual un agente químico puede ejercer su efecto adverso puede depender de la capacidad de biotransformación del organismo. Si un agente químico es tóxico por sí mismo y es biotransformado en un producto inactivo, cuando más rápido sea biotransformado, menor será el efecto observado a una dosis dada.

Por otro lado, si es biotransformado en un compuesto más tóxico, a mayor velocidad del proceso de biotransformación, mayor será el efecto nocivo. Sin embargo, algunos compuestos no sufren cambios en el organismo y en este caso los procesos de biotransformación no tienen influencia en la toxicidad.

Los procesos de biotransformación se realizan principalmente en el hígado, por intermedio de las enzimas localizadas en los microsomas hepáticos, aunque en otros órganos o tejidos como la sangre, riñón, pulmón y placenta también pueden ocurrir este tipo de procesos.

Otras reacciones de biotransformación ocurren con enzimas no

actuase sobre el mismo receptor, es posible que la curva dosis-respuesta se desplace hacia la derecha y sean menores su punto máximo y su inclinación (Fig. 1), tal bloqueo se considera como no competitivo o insuperable.

Si un antagonista es la causa de este patrón de cambio en la curva de dosis-respuesta, tal situación no significa necesariamente que está actuando en el mismo receptor que el agonista. Por ejemplo, podría actuar en algún punto o fase entre la activación del receptor y el fenómeno final que causó la respuesta del efector. En los efectos de casi todos los fármacos hay una serie de reacciones en cadena entre la activación del receptor, y la respuesta, las que representan muchos sitios posibles del efecto del fármaco (Bevan y col., 1982).

2. Metabolismo de los Fármacos.

Todos los organismos tienen mecanismos que permiten transformar a las sustancias químicas y alterar de este modo su toxicidad. Estos mecanismos, que en la mayoría de las ocasiones actúan disminuyendo la toxicidad, ocurren a través de la acción de enzimas, las cuales se encuentran en varios órganos y tejidos. La extensión a la cual un agente químico puede ejercer su efecto adverso puede depender de la capacidad de biotransformación del organismo. Si un agente químico es tóxico por sí mismo y es biotransformado en un producto inactivo, cuando más rápido sea biotransformado, menor será el efecto observado a una dosis dada.

Por otro lado, si es biotransformado en un compuesto más tóxico, a mayor velocidad del proceso de biotransformación, mayor será el efecto nocivo. Sin embargo, algunos compuestos no sufren cambios en el organismo y en este caso los procesos de biotransformación no tienen influencia en la toxicidad.

Los procesos de biotransformación se realizan principalmente en el hígado, por intermedio de las enzimas localizadas en los microsomas hepáticos, aunque en otros órganos o tejidos como la sangre, riñón, pulmón y placenta también pueden ocurrir este tipo de procesos.

Otras reacciones de biotransformación ocurren con enzimas no

microsomales, como sucede con los naftoles, DDT y arsénico. Dado que las enzimas son necesarias, las deficiencias en algunas proteínas específicas, cofactores o deficiencias enzimáticas genéticas juegan un papel importante en la velocidad de estos procesos.

La biotransformación de los compuestos químicos tóxicos puede realizarse en dos fases. Las reacciones de la primer fase (Fase I) incluyen aquellas que pueden ser clasificadas como reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. Estas reacciones están sujetas a muchas variaciones dependiendo de los grupos químicos a ser atacados y de las estructuras químicas relacionadas a esos grupos.

En la segunda fase (Fase II), ocurren a menudo reacciones de conjugación, las cuales son consideradas como reacciones de síntesis.

Durante las reacciones de la Fase I, los compuestos pueden formar grupos reactivos tales como -OH, -NH₂, -COOH y -SH a través de los cuales pueden ocurrir las reacciones de la Fase II. Si los agentes químicos tóxicos poseen en su origen alguno de esos grupos reactivos, estos pueden ir directamente a la Fase II sin necesidad de sufrir los cambios en la Fase I.

Algunos agentes químicos tóxicos, sin embargo, pueden ser biotransformados completamente por las reacciones de Fase I, ya que debido a sus propiedades químicas y físicas, no requieren las reacciones de conjugación. El benceno es un ejemplo de un agente químico tóxico que requiere de ambas fases de biotransformación (Sipes y Gandolfi, 1991).

La mayoría de los fármacos sufre transformaciones metabólicas, son numerosas y diversas las reacciones bioquímicas que hay que considerar al estudiar el metabolismo de los mismos. En el organismo los fármacos sufren cuatro tipos de reacciones. Estas son las reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y síntesis (conjugación). Las reacciones oxidativas incluyen la oxidación alifática, hidroxilación aromática, N-desalquilación O-desalquilación, S-tilación, desaminación, formación de sulfóxidos, desulfuración, N-oxidación y N-hidroxilación (Bevan y col., 1982; Goldstein y col., 1995).

El sitio principal de metabolismo de los fármacos es el hígado, aunque también participan otros tejidos como la corteza suprarrenal, la mucosa intestinal y el riñón. El metabolismo oxidativo de muchos fármacos y también de hormonas

esteroides está mediado por enzimas que se localizan en la fracción microsomal del hígado de los mamíferos y consisten en fragmentos del retículo endoplásmico. La obtención de esta parte microsomal se obtiene por homogenizado del hígado, y el homogeneizado se centrifuga, la fracción microsomal que así se obtiene contiene una familia de hemoproteínas conocidas como citocromos P-450, que actúan como una oxidasa terminal de diversas reacciones oxidativas que sufren los fármacos. El término P-450 se refiere a la capacidad de la forma reducida de la hemoproteína para reaccionar con el monóxido de carbono, dando lugar a un complejo con un máximo de absorción a 450 nm (Bevan y col., 1982; Goldstein y col., 1995).

Una característica de casi todas estas transformaciones es la de que los productos metabólicos (metabolitos) son más polares que los fármacos originales. Esto tiene una consecuencia importante en la excreción biliar y renal, y se puede tener también un significado evolutivo. La implicación evolutiva es que los sistemas metabolizadores de fármacos se han desarrollado, como adaptaciones a la vida terrestre. En los peces y otros organismos marinos, los compuestos liposolubles pueden pasar fácilmente a través de las branquias al medio ambiente acuático y los peces (con algunas excepciones) carecen de enzimas oxidativas metabolizadoras de fármacos y no pueden formar glucurónidos ni ésteres del ácido sulfúrico. Los anfibios acuáticos también son incapaces de oxidar compuestos extraños, pero pueden formar glucurónidos y ésteres del ácido sulfúrico. Los reptiles, las aves y los mamíferos tienen los mecanismos enzimáticos necesarios para aumentar la polaridad de los compuestos liposolubles y obtener así su excreción más rápida. Los insectos tienen enzimas con funciones análogas pero que difieren en muchas formas de las de los vertebrados (Goldstein y col., 1995).

Las enzimas azo y nitro reductasas tienen una distribución algo distinta en la serie filogenética que los sistemas oxidativos microsomales. Estos como las enzimas oxidativas están presentes en los reptiles terrestres, las aves y los mamíferos. A diferencia de las enzimas oxidativas, también se encuentran en los peces teleósteos. Los anfibios y los peces elasmobranquios tienen sólo actividad de azo reductasa (Goldstein y col., 1995).

En los mamíferos hay una gran diferencia en el metabolismo de fármacos

entre las diferentes especies, pero no parece existir una explicación adecuada para estas diferencias. Las velocidades de metabolismo pueden diferir, aún cuando las vías sean las mismas, y diversas especies pueden tener también vías metabólicas enteramente distintas para el mismo fármaco. Un ejemplo de variación en la velocidad metabólica lo proporciona el estudio de un bromociclohexenil derivado del ácido barbitúrico. Originalmente este compuesto se sintetizó en un intento por obtener un barbitúrico que se metabolizara con rapidez en el hombre. Se probó en perros con resultados muy prometedores, pero resultó que era metabolizado muy lentamente en el hombre (Goldstein y col., 1995).

Las sustancias con altos coeficientes de partición lípido/agua que pasan fácilmente a través de la membrana, también difunden con facilidad en sentido contrario, de la orina tubular al plasma, a través de las células tubulares y, por tanto, dichas sustancias tienden a tener un aclaramiento muy bajo y una persistencia prolongada en el organismo. Si este fármaco se metaboliza a un compuesto más polar, uno con un coeficiente de partición mucho más bajo, su resorción tubular será muy reducida. Por ejemplo, la oxidación de un grupo metilo a carboxilo podría hacer que un fármaco fuera susceptible de ser eliminado por las vías renal o biliar y esta simple alteración metabólica podría reducir la vida media biológica del fármaco de muchas horas a unos cuantos minutos (Goldstein y col., 1995). Los factores biológicos tales como la especie animal, edad, sexo, peso, diferencias genéticas, estado de salud, condiciones metabólicas (reposo, trabajo) y estado de nutrición son factores que se deben considerar en la biotransformación. La edad, también influye en el metabolismo de los fármacos. Se sabe que los humanos jóvenes y otros animales son más sensibles a los fármacos que los adultos, debido a que numerosos sistemas de enzimas cambian mucho su actividad durante las primeras etapas de la vida (Kato y col., 1964; Kato y col., 1970).

Aunque la duración de la acción de fármaco tiende a acortarse por transformación metabólica, no es correcto pensar en el metabolismo del fármaco como una "destoxificación" ya que, es muy frecuente que el producto metabólico tenga una actividad biológica mayor que la del fármaco y a veces el metabolito es la molécula con actividad farmacológica (Goldstein y col., 1995).

3. Farmacosíntesis

El ritmo de introducción de fármacos con nuevas acciones importantes se ha acelerado en grado notable, la industria farmacéutica ha codificado y organizado los métodos necesarios para la síntesis y evaluación de nuevas drogas, mismos que regulan las organizaciones gubernamentales. La colaboración entre el gobierno, la industria, los académicos y los médicos en su práctica tiene como meta la evaluación inocua y ordenada e introducción de nuevos fármacos, en forma tal que la proporción riesgo beneficio sea satisfactoria en todas las etapas del proceso.

Los posibles fármacos pueden descubrirse en diversas formas:

- Hallazgo accidental
- Nuevos usos para viejas drogas
- Extracción de un regulador natural, de un producto animal
- Identificación empírica de sustancias químicas, en relación con un efecto deseado
- Modificación química deliberada de un agente activo conocido, para reforzar el efecto (o un efecto secundario)
- Obtención lógica de nuevos compuestos, para producir un efecto deseado (Bevan y col., 1982).

3.1 Quiralidad y su importancia en el Desarrollo de Fármacos.

La configuración de una molécula puede jugar un papel muy importante en su actividad biológica y es importante en el desarrollo de fármacos (Carvajal-Sandoval y Meza-Toledo, 1997). La configuración se refiere a la disposición en el espacio de los sustituyentes unidos a un centro de quiralidad, las moléculas que presentan quiralidad contienen átomos de carbono sustituidos por cuatro ligandos diferentes, los cuales se encuentran orientados hacia las esquinas de un tetraedro

en cuyo centro está situado el carbono (Morrison y Boyd, 1996). Cuando las estructuras representadas guardan una relación de imágenes en un espejo, se presentan moléculas quirales, y a los carbonos responsables de las configuraciones diferentes, se les denomina centros de quiralidad. Los enantiómeros son estereoisómeros que presentan un centro de quiralidad y uno es la imagen especular del otro. Los enantiómeros poseen la propiedad de desviar el plano de la luz polarizada, en igual grado pero en direcciones opuestas y se les denomina dextrorrotatorio (+) si desvía la luz en dirección de las manecillas del reloj, mientras que el levorrotatorio (-) lo desvía en sentido contrario. Las mezclas equimolares de enantiómeros son conocidas como mezclas racémicas o racematos y ópticamente son inactivas y se emplean los signos (\pm) para especificar su naturaleza racémica, es evidente que si hemos de observar actividad óptica, la molécula debe tener abundancia suficiente de uno de los enantiómeros para que la rotación neta pueda ser detectada por el polarímetro (Morrison y Boyd, 1996; Carvajal-Sandoval y Meza-Toledo, 1997; Mayes 1997).

Los compuestos producidos por síntesis son necesariamente racémicos, ya que las oportunidades para la formación de cada isómero óptico son idénticas (Mayes, 1997).

Nuestro organismo está constituido por moléculas quirales: las proteínas por ejemplo, están formadas de aminoácidos de la serie L (-), lo cual significa que todos ellos tienen la configuración L-(-)-gliceraldehído, otro ejemplo, son los azúcares como la (+)-glucosa que juega un papel de importancia extrema en el metabolismo animal y es la base de una industria de fermentación multimillonaria, sin embargo, la L-(-) glucosa ni es metabolizada por los animales, ni es fermentada por las levaduras (Morrison y Boyd, 1996). Las moléculas quirales presentes en las proteínas receptoras de los fármacos: proteínas de membranas, proteínas transportadoras, enzimas, les permiten en algunos casos enlazarse con diferente afinidad hacia los enantiómeros presentes en fármacos racémicos, lo cual podría conducir a diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas entre los enantiómeros, porque producirán cambios en la potencia o toxicidad entre ellos (Carvajal-Sandoval y Meza-Toledo, 1997).

Si de un enantiómero, tres de sus grupos interactúan con tres sitios sobre

el receptor, entonces del otro enantiómero sólo podrán interaccionar dos de sus grupos en los sitios adecuados del receptor, con lo que la activación del mismo será menor. Un ejemplo es la (-)-adrenalina, ésta molécula hace contacto con su receptor en 3 sitios a través de tres grupos: El grupo amino, el anillo de benceno con dos hidroxilos fenólicos y el grupo alcohol de la cadena lateral con lo que se tiene una respuesta óptima, mientras que el otro enantiómero, el (+), hace contacto sólo con dos grupos en la posición complementaria del receptor, con lo que se obtiene una respuesta parcial y ello, implica que su efecto vasopresor sea 20 veces menor que el que presenta la (-)-adrenalina (Easson y Stedman, 1933; Carvajal-Sandoval y Meza-Toledo, 1997).

Un ejemplo de fármaco quiral, es la talidomida, que existe en dos formas: como un compuesto dextrorrotatorio, el cual es un tranquilizante, y uno levorrotatorio, que es un poderoso agente teratogénico en ratones (Blaschke y col., 1979; Brown y Davies, 1989), no obstante, en conejos los dos enantiómeros de la talidomida son teratogénicos (Fabro y col., 1967). Lo anterior ha conducido a la especulación de que la presencia del enantiómero levorrotatorio en la talidomida racémica suministrada a mujeres embarazadas produjo niños con malformaciones, a inicios del año de 1960 (Goldstein y col., 1995; Carvajal-Sandoval y Meza-Toledo, 1997).

Aunque para los compuestos antiepilépticos no parece existir una relación entre su estereoquímica absoluta y su actividad, para algunos de ellos sí se han encontrado diferencias en las actividades biológicas de los enantiómeros presentes en un racemato. Entre estas diferencias podemos encontrar: una estereoselectividad muy alta, también llamada estereoespecificidad, en la que sólo uno de los enantiómeros es el activo; la ausencia de estereoselectividad, cuando los dos enantiómeros presentan la misma potencia; estereoselectividades diferentes, donde los enantiómeros muestran potencias diferentes. Entre otros tipos de estereoselectividad que se han observado en los compuestos antiepilépticos se encuentran: un metabolismo estereoselectivo, sinergismo entre isómeros y un metabolismo proquiral (Kaye, 1991).

4. Toxicidad de los Fármacos.

Mucho antes del nacimiento de la farmacología moderna, Paracelso (1493-1541) observó que "todas las cosas son venenosas, puesto que no hay nada sin cualidades venenosas. Es sólo la dosis lo que hace a algo venenoso". Hoy en día la rama de la farmacología conocida como Toxicología, abarca un gran campo de la investigación relacionado con un vasto conjunto de sustancias químicas y tóxicas que se utilizan en la industria, así como en los fármacos de uso terapéutico que son potencialmente tóxicos (Jauge, 1985; Manahan, 1992; Goodman y Gilman, 1994; Goldstein y col., 1995; Katzung, 1996).

La variedad y disponibilidad de los fármacos efectivos y potencialmente tóxicos ha aumentado en forma muy marcada desde el final del siglo XIX. Con el intenso desarrollo de la química orgánica sintética cada año se han venido sintetizando nuevos tipos de fármacos, y además se han introducido muchas modificaciones menores en los fármacos ya existentes (Goodman y Gilman, 1994; Goldstein y col., 1995; Katzung, 1996).

El conocimiento de la cinética y los mecanismos de acción de un agente químico tóxico nos permite comprender los efectos que estos producen en el organismo. Entre los tipos de efecto tóxico o nocivo, se pueden considerar: efecto local, efecto sistémico, efecto reversible, efecto irreversible, efecto indeseable o colateral, alergia química e idiosincrasia química (Klaassen, 1994)

4.1 Efecto Tóxico Local.

Es aquel que ocurre en el lugar del primer contacto entre el organismo vivo y el agente químico. Es el caso de las quemaduras por ácido o la irritación de las vías respiratorias por exposición al amoníaco.

4.2 Efecto Tóxico Sistémico.

Para que este efecto se manifieste, se requiere que el agente tóxico sea absorbido y distribuido a un lugar distante del sitio de ingreso, donde se produce el efecto. La mayoría de los agentes químicos producen un efecto tóxico sistémico, pero en algunos casos, además de éste, puede haber un efecto local.

Tanto el acetaldehído como el formaldehído producen irritación severa del tracto respiratorio, además de inducir cambios hematológicos, siendo considerados como posibles agentes químicos mutagénicos y teratogénicos.

Los agentes químicos que producen toxicidad sistémica no producen igual grado de toxicidad en todos los órganos y generalmente se evidencia una mayor toxicidad en sólo alguno de los órganos o tejidos. Estos sitios son denominados órganos o tejidos blanco, donde un agente químico determinado manifiesta su toxicidad. El órgano o tejido blanco no es siempre el sitio donde existe la concentración más elevada de la sustancia.

El órgano blanco más frecuente involucrado en la toxicidad sistémica es el sistema nervioso central. También son importantes el sistema circulatorio, sangre y sistema hematopoyético, órganos tales como riñón, hígado, pulmón y en piel. En los músculos y los huevos es donde se presentan con menor frecuencia los efectos tóxicos sistémicos.

4.3 Efecto Reversible y efecto Irreversible.

En general, el efecto reversible es aquel que disminuye con la eliminación del agente químico del organismo. Un efecto reversible verdadero no causará un efecto residual cuando la sustancia que lo provocó es eliminada completamente del organismo. Es el caso del uso de medicamentos cuando se administran en dosis terapéuticas. Que un efecto sea reversible depende del órgano o sistema de que se trate, de la toxicidad del agente químico, la duración de la exposición, la cantidad total de la sustancia en el organismo en un tiempo específico, la edad y en general el estado de salud.

El hígado tiene gran capacidad de regeneración y la mayoría de los efectos son reversibles. En la intoxicación crónica por tetracloruro de carbono se produce cirrosis hepática irreversible, mientras que en la intoxicación aguda por este compuesto. Existe regeneración hepática y los efectos son revertidos. También en el niño muchos de los efectos nocivos son reversibles. En el caso del sistema nervioso central, por el hecho de que las células nerviosas no pueden ser reemplazadas, el daño es irreversible. Las personas que presentan enfermedades renales o hepáticas son más susceptibles al efecto producido por un agente químico, sea éste reversible o irreversible, debido a que la posibilidad de que esté disminuida la capacidad de eliminación de la sustancia del organismo o modificada su biotransformación.

4.4 Efecto Indeseable o Colateral.

El efecto indeseable o colateral es aquel producido por un medicamento que no es el efecto terapéutico esperado, cuando se administra el fármaco en las dosis recomendadas. Por ejemplo, la sequedad en la boca es un efecto colateral de la atropina cuando es utilizada como medicamento.

No existe una frontera bien definida entre lo que se considera efecto indeseable en el uso de un fármaco y efecto realmente tóxico. Algunos efectos colaterales de los medicamentos se pueden considerar como tóxicos. En antibiótico cloranfenicol puede producir anemia aplásica, leucopenia y trombocitopenia, lo cual se considera un efecto tóxico tardío producido por este medicamento ya que la intoxicación ocurre semanas después de haber interrumpido el consumo de dicho antibiótico.

Los efectos carcinógenos de las sustancias químicas por lo regular tienen un largo periodo de latencia y a veces transcurren 20 o 30 años para que surjan neoplasias. Efectos tan tardíos no pueden evaluarse durante un periodo razonable de estudio inicial de una sustancia química, por lo que existe la necesidad urgente de crear pruebas confiables para la detección de dicha toxicidad y de vigilar de una manera sistemática los efectos a largo plazo de los medicamentos distribuidos en

el mercado y otras sustancias químicas.

A fin de saber si una sustancia química es o no un carcinógeno químico genotóxico o no genotóxico potencial para el ser humano, se realizan dos tipos de estudios de laboratorio. Uno permite saber si la sustancia química es mutágena o no mediante la prueba de Ames, que utiliza *Salmonella typhimurium* y puede detectar en días carcinógenos genotóxicos (no promotores). El segundo tipo de investigación consiste en alimentar animales de laboratorio (ratones o ratas) con la sustancia química en dosis grandes durante toda la vida, permitiendo detectar promotores y también carcinógenos genotóxicos mediante necropsias y estudios histopatológicos.

4.5 Alergia Química.

Es una reacción adversa producida por un agente químico como consecuencia de una sensibilización previa por la sustancia o una que tiene una estructura química similar. No debe usarse el término hipersensible debido a que se reserva esta denominación para el efecto que evidencian aquellas personas situadas en el principio de una curva dosis-respuesta. Por tanto, el término reacción alérgica o de sensibilización, debe ser utilizado para describir el estado en que es necesaria una exposición previa al agente químico, para producir un efecto a través de la formación de un anticuerpo.

La exposición a un determinado agente químico por un individuo previamente sensibilizado a esa sustancia, produce una reacción antígeno-anticuerpo con las manifestaciones típicas de la alergia, desde cutáneas hasta el choque anafiláctico.

4.6 Idiosincrasia Química.

Es una reactividad anormal a determinados agentes químicos como consecuencia de una deficiencia genética. El efecto cualitativo es el mismo, pero

se produce con dosis extremadamente bajas o extremadamente altas. Existe un grupo de personas, por ejemplo, varones de raza negra (cerca del 10%) presentan anemia hemolítica grave cuando reciben primaquina. Es porque tienen deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa eritrocítica. La resistencia regida por mecanismos genéticos a la acción anticoagulante de la warfarina se debe a una alteración en la epóxido reductasa de vitamina K (Klaassen).

Por tanto, los efectos tóxicos de los fármacos pueden ser clasificados como farmacológicos, patológicos o genotóxicos (alteraciones del ADN) y su incidencia y gravedad están relacionadas, al menos en cierto intervalo, con la concentración del compuesto tóxico en el organismo. Los efectos farmacológicos usualmente desaparecen cuando la concentración de una sustancia química en los tejidos es disminuida mediante su excreción por el organismo. Los efectos patológicos y genotóxicos pueden ser reparados. Si estos efectos son severos, puede producirse la muerte en poco tiempo; si una lesión más sutil en el ADN no es reparada, puede presentarse un cáncer luego de varios meses o años en animales de laboratorio o en una década o más en el hombre. Muchas sustancias no son tóxicas por sí solas pero son activadas por biotransformación en metabolitos tóxicos. La respuesta tóxica depende, entonces, del equilibrio entre la velocidad de formación y la destrucción del metabolito tóxico (Goodman y Gilman, 1994; Goldstein y col., 1995; Katzung, 1996).

5. Introducción de Drogas Nuevas

La mayoría de las drogas que se usaban en la medicina primitiva se obtenían de las plantas. Estas sustancias naturales se empleaban como infusiones, de cocciones o cataplasmas y llegaron a la medicina en forma accidental o por medio del herborista. Las plantas utilizadas como drogas eran bastante inocuas y relativamente libres de efectos tóxicos o eran tan tóxicas que sus efectos letales eran bien conocidos (Paulus, 1982; Swinyard, 1992).

Las drogas que se usaron en la medicina del siglo XIX eran sustancias

se produce con dosis extremadamente bajas o extremadamente altas. Existe un grupo de personas, por ejemplo, varones de raza negra (cerca del 10%) presentan anemia hemolítica grave cuando reciben primaquina. Es porque tienen deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa eritrocítica. La resistencia regida por mecanismos genéticos a la acción anticoagulante de la warfarina se debe a una alteración en la epóxido reductasa de vitamina K (Klaassen).

Por tanto, los efectos tóxicos de los fármacos pueden ser clasificados como farmacológicos, patológicos o genotóxicos (alteraciones del ADN) y su incidencia y gravedad están relacionadas, al menos en cierto intervalo, con la concentración del compuesto tóxico en el organismo. Los efectos farmacológicos usualmente desaparecen cuando la concentración de una sustancia química en los tejidos es disminuida mediante su excreción por el organismo. Los efectos patológicos y genotóxicos pueden ser reparados. Si estos efectos son severos, puede producirse la muerte en poco tiempo; si una lesión más sutil en el ADN no es reparada, puede presentarse un cáncer luego de varios meses o años en animales de laboratorio o en una década o más en el hombre. Muchas sustancias no son tóxicas por sí solas pero son activadas por biotransformación en metabolitos tóxicos. La respuesta tóxica depende, entonces, del equilibrio entre la velocidad de formación y la destrucción del metabolito tóxico (Goodman y Gilman, 1994; Goldstein y col., 1995; Katzung, 1996).

5. Introducción de Drogas Nuevas

La mayoría de las drogas que se usaban en la medicina primitiva se obtenían de las plantas. Estas sustancias naturales se empleaban como infusiones, de cociones o cataplasmas y llegaron a la medicina en forma accidental o por medio del herborista. Las plantas utilizadas como drogas eran bastante inocuas y relativamente libres de efectos tóxicos o eran tan tóxicas que sus efectos letales eran bien conocidos (Paulus, 1982; Swinyard, 1992).

Las drogas que se usaron en la medicina del siglo XIX eran sustancias

naturales que se extraían tal como estaban de las plantas, animales y minerales. Los principios activos fueron aislados y adoptados en medicina en gran medida en forma empírica. Por ejemplo, el opio y la morfina se usaban para paliar el dolor; la digital y otros glucósidos cardíacos en el manejo de la insuficiencia cardíaca y el edema y la quinina en el tratamiento del paludismo. Aunque estos agentes o algunos de sus derivados sintéticos todavía se usan, primero se utilizaron en el hombre sin previa evaluación de laboratorio (Paulus, 1982; Swinyard, 1992).

Con el advenimiento de los nuevos métodos de la química orgánica en las últimas décadas del siglo pasado y las primeras de éste, se pudo elucidar la estructura de los productos naturales farmacológicamente activos y sintetizar el principio activo o una molécula modificada que conservaba las propiedades farmacológicas de la sustancia original. Con posterioridad se procuró sintetizar moléculas en las que se preservaban o se acentuaban las propiedades farmacológicas del producto original, pero reduciendo los efectos colaterales tóxicos. Esto condujo a la síntesis de agentes con estructuras novedosas cuyas propiedades farmacológicas se determinaron mediante estudios en animales de laboratorio. Este enfoque resultó ser muy provechoso y condujo a millares de potentes drogas sintéticas nuevas (Paulus, 1982; Swinyard, 1992).

En sus inicios, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) no contenía ningún control sobre la introducción de drogas nuevas. Simplemente decía que las drogas transportadas en el comercio interestatal no podían estar adulteradas ni rotuladas de manera engañosa. Fue la industria farmacéutica la que inició los ensayos preclínicos de las nuevas drogas en animales de laboratorio. Con el correr de los años las pruebas de laboratorio destinadas a verificar la eficacia y la toxicidad mejoraron de manera incesante (Paulus, 1982; Swinyard, 1992).

La primera legislación específica encaminada a salvaguardar la inocuidad de las drogas fue desencadenada por una tragedia, la comercialización de un elixir de sulfanilamida en dietilenglicol. Esto hizo que se modificase la Ley de Alimentos, Drogas y Cosméticos en 1938 para requerir que las firmas que proyectasen comercializar un nuevo producto farmacéutico debían presentar una Solicitud para Drogas Nuevas (New Drug Application, NDA). Esta ley estableció que, para que

se pueda aprobar la comercialización de una droga, se debe demostrar que es inocua al utilizarla de la manera que se indica en las instrucciones. No hacía falta demostrar que la eficacia que se le atribuía era real (Swinyard, 1992).

Al descubrirse un nuevo material con probable actividad como droga, debe hacerse el aislamiento y purificación del principio activo antes de emprender la caracterización química, física y biológica inicial, ésta se facilita mucho con los diversos instrumentos sofisticados que los químicos tienen en la actualidad. Los instrumentos y técnicas como espectrometría infrarroja, ultravioleta y de resonancia magnética nuclear, difracción de rayos X, dispersión rotatoria óptica, cromatografía líquida de alta resolución, espectrometría de masa, polarografía, y otros adelantos tecnológicos, han mejorado enormemente la exactitud y celeridad con que se pueden determinar las fórmulas estructurales. Fórmulas estructurales que hace 25 años requerían los esfuerzos combinados de cuatro o cinco químicos y sus colaboradores durante 3 o 4 años, en la actualidad se identifican en pocos días o semanas (Paulus, 1982; Swinyard, 1992).

Cuando se ha caracterizado una cantidad adecuada del material y se ha asegurado su pureza, se somete a una serie de pruebas biológicas destinadas a detectar actividad terapéutica en varios aspectos. La mayoría de estos procedimientos de selección preliminar se realizan en el animal intacto, pero se hacen pruebas *in vitro* para detectar fijación a los receptores, actividad antibiótica y actividad antitumoral o antiviral. Las drogas útiles deben ejercer un efecto terapéutico dentro de una gama de dosis que esté desprovista de efectos tóxicos e influya poco sobre los procesos corporales normales. El margen de seguridad amplio en animales de experimentación es una propiedad deseable porque sugiere que la droga se podría usar sin peligro en el ser humano (Paulus, 1982; Swinyard, 1992; Goldstein y col., 1995).

A los estudios clínicos de drogas nuevas en el ser humano se les divide en cuatro fases:

-Fase I. Farmacología clínica, es el ensayo cauteloso inicial en el hombre normal (20 a 80) que son voluntarios en los cuales se determinará la actividad farmacológica de absorción, distribución, niveles sanguíneos, biotransformación y

excreción. Así como los efectos sobre sistemas orgánicos efectores como hígado, riñón, médula ósea y corazón (metabolismo)

-Fase II. Investigación clínica, se relaciona con observaciones más detalladas de los efectos de la droga en personas que sufren la entidad o síndrome patológico (100 a 200) en el cual se anticipa que la droga ha de ser útil. Los datos obtenidos con esta pequeña cantidad de pacientes y los recogidos en los estudios de la Fase I son evaluados por la junta asesora de la compañía y se decide la conveniencia de someter a los estudios más intensivos y costosos que se requieren en la Fase III.

-Fase III. Ensayos clínicos, que consiste en estudios amplios destinados a establecer si la droga es de utilidad clínica en el estado de enfermedad o síndrome en el que se afirma que es eficaz y se realiza por medio de estudios de toxicidad crónica en animales de laboratorio en una especie de roedor y otra no roedora por un tiempo semejante al que se ha de administrar la droga a seres humanos. También es en este momento se inician los estudios de reproducción y fertilidad así como su potencial de inducir anomalías en el feto en vías de desarrollo (teratogénesis). Muchas compañías realizan estos estudios al mismo tiempo que se ensayan las propiedades mutágenas de la droga. Una vez más hay que decidir si se continúan o no los estudios con la nueva droga.

-Fase IV. Ensayos clínicos posteriores a la comercialización, sólo se hacen una vez que la FDA ha aprobado la NDA. Estos son estudios a largo plazo (10 años o más) dirigidos por médicos pertenecientes a la compañía farmacéutica. Los farmacólogos clínicos suelen dirigir los estudios de las fases I y II en un ambiente hospitalario, mientras que los estudios de la fase III, que suelen superponerse a los finales de la fase II, son dirigidos por médicos de la compañía farmacéutica y se utilizan los servicios de clínicos especializados en la enfermedad en particular y están adscriptos a un centro médico universitario, hospital docente o clínica privada. En los ensayos clínicos de poscomercialización de la fase IV participan varios clínicos en todo el ámbito comercializado aprobado.

La mutación celular inducida por la droga conduce a la muerte de la célula afectada o a la formación de un tumor. Por consiguiente, se acostumbra estimar la mutagénesis así como la teratogénesis o carcinogénesis en el momento en que se inician los estudios de toxicidad subaguda. La prueba mutágena positiva suele hacer que se desista de seguir trabajando con la sustancia investigada. Los estudios de toxicidad subaguda tienen la finalidad de determinar la gama de dosis que pueden emplearse al administrar la droga en forma prolongada y a revelar posibles efectos sobre el crecimiento y la función de los órganos del animal (Paulus, 1982; Swinyard, 1992; Goldstein y col., 1995).

Al completarse los procedimientos de selección preliminar, los estudios de toxicidad aguda y subaguda y los experimentos metabólicos preliminares, la junta asesora científica de la Compañía vuelve a revisar todos los datos experimentales y decide si la droga es lo suficientemente promisorio como para que se justifique un ensayo clínico. Si decide que sí, se debe llevar a la FDA una solicitud para emprender este ensayo. Además se dispone lo necesario para iniciar los estudios sobre toxicidad crónica. Estos estudios suelen hacerse simultáneamente con el ensayo clínico, pero deben iniciarse por lo menos 13 semanas antes de los ensayos clínicos prolongados. Los estudios de toxicidad crónica se suelen hacer con dos especies (ratas y perros) y pueden durar 2 años o más, según el uso que se piense dar a la droga. Es necesario incluir en los estudios suficientes animales como para poder sacrificar algunos, al cabo de 6 y 12 meses a los efectos de realizar estudios macroscópicos e histomorfológicos de diversos tejidos, además de los estudios químicos y hematológicos periódicos y de las observaciones diarias. Al cumplirse el período experimental los animales se sacrifican y se hace el examen macroscópico y microscópico de sus órganos internos (Paulus, 1982; Swinyard, 1992; Goldstein y col., 1995).

Las enmiendas Kefauver-Harris de 1962 tuvieron la finalidad de salvaguardar al público y evitar otra tragedia con drogas. La FDA dispuso que las nuevas entidades químicas (NCE) fuesen sometidas a ensayos preclínicos con pruebas sobre mutagenicidad, teratogenicidad, carcinogénesis y toxicidad a largo plazo pero, en particular, que los estudios clínicos proveyesen más detalles,

controles y documentación de los resultados. Además, las incesantes presiones del Congreso y de la AAD condujeron a la adopción de las Disposiciones sobre Buenas Prácticas de Laboratorio (Good Laboratory Practice Regulations), propuestas en 1976 y aprobadas en junio de 1979 (Paulus, 1982; Swinyard, 1992).

Al entrar en vigencia la enmienda de 1962 se registraron aumentos espectaculares en el tiempo requerido para completar la fase preclínica. Por consiguiente, la duración efectiva de la patente para NCE disminuyó de 16.3 años en 1960 a 6.8 años en 1981 y al mismo tiempo se produjo una disminución del 60% en la cantidad media de NCE presentadas por año en la FDA (89 a 35) y una disminución del 64% en la cantidad media de NCE-NDA aprobadas para comercializar (36 a 14). Aunque es difícil definir con exactitud las razones de estos cambios, habrían sido importantes los factores económicos (costo de la investigación en función del rendimiento previsto sobre la inversión), las reglamentaciones excesivas y las exigencias científicas (Swinyard, 1992).

A los efectos de corregir este atraso, la FDA (1982), ha modificado sus reglamentos que rigen la aprobación gubernamental de las drogas nuevas para uso humano. Los beneficios de estos cambios comprenden la economía de tiempo, dinero y recursos, pero lo más importante es que unas 200 000 personas se habrán de beneficiar por año con drogas nuevas importantes que estarán a su disposición más pronto que bajo las disposiciones y reglamentos anteriores (Swinyard, 1992).

6. Epilepsia

En el desarrollo de fármacos existe la búsqueda del mejor y más útil medicamento para el tratamiento de diversas enfermedades (Ekuani, 1992). La epilepsia afecta por lo menos a 2.5 millones de personas en los EE.UU. (García, 1997) y a unos 20 a 40 millones de personas en todo el mundo (Rall y Schleifer, 1994). La enfermedad es más común en niños que en adultos, con una prevalencia de 8 por 1,000 niños de 7 años (Smith y Reynard, 1993).

En México, más de un millón y medio de personas padecen epilepsia

controles y documentación de los resultados. Además, las incesantes presiones del Congreso y de la AAD condujeron a la adopción de las Disposiciones sobre Buenas Prácticas de Laboratorio (Good Laboratory Practice Regulations), propuestas en 1976 y aprobadas en junio de 1979 (Paulus, 1982; Swinyard, 1992).

Al entrar en vigencia la enmienda de 1962 se registraron aumentos espectaculares en el tiempo requerido para completar la fase preclínica. Por consiguiente, la duración efectiva de la patente para NCE disminuyó de 16.3 años en 1960 a 6.8 años en 1981 y al mismo tiempo se produjo una disminución del 60% en la cantidad media de NCE presentadas por año en la FDA (89 a 35) y una disminución del 64% en la cantidad media de NCE-NDA aprobadas para comercializar (36 a 14). Aunque es difícil definir con exactitud las razones de estos cambios, habrían sido importantes los factores económicos (costo de la investigación en función del rendimiento previsto sobre la inversión), las reglamentaciones excesivas y las exigencias científicas (Swinyard, 1992).

A los efectos de corregir este atraso, la FDA (1982), ha modificado sus reglamentos que rigen la aprobación gubernamental de las drogas nuevas para uso humano. Los beneficios de estos cambios comprenden la economía de tiempo, dinero y recursos, pero lo más importante es que unas 200 000 personas se habrán de beneficiar por año con drogas nuevas importantes que estarán a su disposición más pronto que bajo las disposiciones y reglamentos anteriores (Swinyard, 1992).

6. Epilepsia

En el desarrollo de fármacos existe la búsqueda del mejor y más útil medicamento para el tratamiento de diversas enfermedades (Eluani, 1992). La epilepsia afecta por lo menos a 2.5 millones de personas en los EE.UU. (García, 1997) y a unos 20 a 40 millones de personas en todo el mundo (Rall y Schleifer, 1994). La enfermedad es más común en niños que en adultos, con una prevalencia de 8 por 1,000 niños de 7 años (Smith y Reynard, 1993).

En México, más de un millón y medio de personas padecen epilepsia

(García, 1997). Sin embargo, no somos los únicos susceptibles a padecer ese mal al que en otros tiempos se le atribuyó origen divino. Individuos de todas las razas y edades son posibles candidatos a perder contacto con su medio, desmayarse, convulsionarse o ausentarse mentalmente y hasta tomarse agresivos, cuando en su cerebro se produce una descarga eléctrica anormal en células nerviosas lesionadas (Rubio y col., 1989; Rall y Schleifer, 1994).

La palabra epilepsia se deriva de una preposición griega y un verbo irregular. Quiere decir "ser sobrecogido bruscamente", "ser atrapado", o "algo que cae bruscamente sobre el individuo". Clínicamente se le define como un padecimiento crónico caracterizado por la presencia de crisis continuas de la vida de una persona (Rall y Schleifer, 1994).

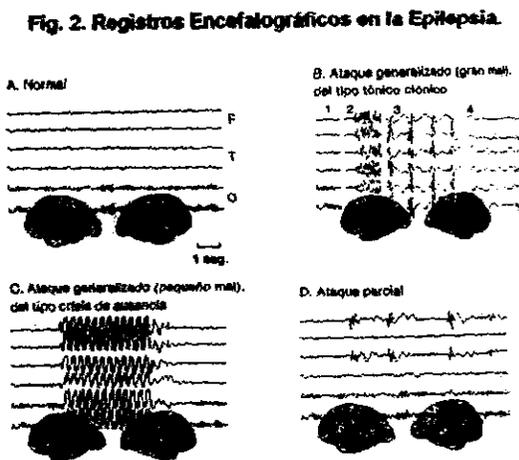
El término epilepsia es una designación general para un grupo de trastornos del sistema nervioso central (SNC) que tienen en común la repetición de episodios súbitos y transitorios (crisis) de fenómenos anormales de origen motor (convulsiones), sensorial, autónomo o psíquico. Las crisis casi siempre están correlacionadas con descargas anormales y excesivas en el cerebro que pueden ser registradas en un electroencefalograma (EEG) (Flores, 1989; Smith y Reynard, 1993; Rall y Schleifer, 1994).

El conocimiento de las epilepsias es muy antiguo y se ha descrito en distintas formas, de acuerdo a la cultura y costumbres de la época. Para los romanos era enfermedad sagrada y si ocurrían crisis durante reuniones o actos electorales, éstos se suspendían. Al respecto, Hipócrates (468-377 a. C.) escribió "La Enfermedad Sagrada" primer tratado sobre la epilepsia, donde el padre de la medicina situaba el origen del mal en el cerebro e incluso fue uno de los pioneros al descubrir variaciones generalizadas y focales. Algunas centurias después, Galeno (129-199 d. C.) describió a la epilepsia como una enfermedad caracterizada por pérdida intempestiva del conocimiento, acompañada de convulsiones (Rubio y col., 1989; Makdonado, 1992).

En México, Martín de la Cruz, médico azteca del siglo XVI, hizo algunas referencias en el Códice Badiano (1556) al tratamiento de la epilepsia. Sin embargo, fue hasta 1802 cuando Herberd anotó algunas características clínicas que se presentan en forma diferente en niños y adultos. Jean Etienne Dominique

Esquirol, propone en 1815 los términos "gran mal" y "pequeño mal", los cuales actualmente ya no tienen validez. Apenas en 1989 fue aprobada la clasificación moderna de las epilepsias, las cuales en un principio se dividen en dos grandes grupos: crisis parciales y generalizadas. De ahí se ramifican al menos 30 subcategorías. La electroencefalografía introducida por Hans Berger en 1929, permitió observar el primer registro gráfico de la corteza cerebral, responsable de todas las funciones conocidas: memoria, facultad de pensamiento, conciencia, etc. y que contiene los centros para la visión, olfato, audición, equilibrio, tacto, gobierno muscular, entre otras (Rubio y col., 1989; Maldonado, 1992).

Numerosos estudios han establecido que la actividad eléctrica del cerebro normal se registra en forma de ondas, las cuales según su forma y frecuencia se describen como ritmos alfa, beta, teta y delta. Las descargas eléctricas, en este caso de las células nerviosas, se producen a intervalos regulares y no en forma continua. En las crisis epilépticas ocurre todo lo contrario. Durante ellas las descargas se registran simultáneamente en determinado número de células cerebrales, lo cual refleja en el electroencefalograma por la aparición de ondas cerebrales anormales, amplias, breves y puntiagudas, como se muestra en la figura 2 (Rang y Dale, 1992).



Registros EEG en la epilepsia. Las zonas frontal (F), temporal (T) y occipital (O) en ambos hemisferios. (Rang y Dale, 1992).

Dichas descargas, suscitadas sin razón aparente, pueden extenderse de súbito, a una velocidad explosiva desde las neuronas lesionadas a otras partes del cerebro y suprimir por minutos sus funciones. Es entonces cuando se pierde la conciencia e incluso aparecen espasmos (Rang y Dale, 1992).

Los ataques epilépticos comienzan frecuentemente con síntomas localizados, por ejemplo: calambres en la mano, giro súbito de la cabeza o de los ojos hacia un lado; o bien se presentan sensaciones especiales tales como embotamiento en una parte del cuerpo, destellos de luz o sensaciones peculiares de olfato y gusto (auras). En ocasiones los síntomas son subjetivos y de difícil descripción: aberración del pensamiento, sensación súbita de bienestar o compasión, etcétera. (Rubio y col., 1989; Maldonado, 1992).

Todos estos síntomas precoces indican el lugar del cerebro donde se origina la excitación patológica. El ataque se detiene o extiende hasta provocar desmayos y convulsiones generalizadas o bien, éstas pueden presentarse sin mayor trámite (Maldonado, 1992).

La epilepsia es catalogada como síndrome (conjunto de síntomas) y a diferencia de las enfermedades, donde siempre se conoce su origen y de acuerdo a las señales que las acompañan es factible establecer pronósticos, puede tener numerosas causas y además se desconocen los cambios que sobrevendrán durante su curso (Rubio y col., 1989; Maldonado, 1992).

El tratamiento casi siempre tiene éxito en 80 por ciento de los casos, cuando el paciente obedece al pie de la letra las instrucciones de su médico. Al administrarse fármacos (actualmente existen ocho antiépilépticos de primera línea) únicamente se controla el síndrome. Al otro 15 por ciento se le debe administrar combinaciones de dos o tres medicamentos y el cinco por ciento restante son tratables mediante intervenciones quirúrgicas (Maldonado, 1992; Porter y Meldrum, 1996).

La epilepsia tiene una frecuencia considerable desde el punto de vista epidemiológico, mediante estudios estadísticos se ha identificado que en nuestro

país, aproximadamente el dos por ciento de la población padece ese problema y aunque parece una cifra pequeña, si se obtienen números absolutos tan sólo en la Ciudad de México, en la cual habitan 18 millones de personas, se obtienen 360 mil epilépticos (Maldonado 1992).

Por ello, en 1986 se hicieron gestiones ante la Secretaría de Salud (SS) y se consiguió que la epilepsia fuera considerada como un padecimiento prioritario, dado su impacto social y económico. Así nació el Programa Prioritario de Epilepsia, el cual ya cuenta con doce centros de atención integral. Cinco de ellos se localizan en la Ciudad de México y, los demás se encuentran diseminados en San Luis Potosí, Morelia, Puebla, Durango y Toluca (Maldonado, 1992).

Dicho programa, en coordinación con el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB-IPN) y otras instituciones más, auspician el desarrollo de la investigación en nuevos fármacos, con los cuales se espera obtener medicamentos accesibles económicamente para muchos enfermos que no pueden continuar sus tratamientos ante su elevado costo (Maldonado, 1992).

Las dramáticas manifestaciones de las crisis epilépticas han motivado a hombres de ciencia de todos los tiempos a buscar incesantemente el tratamiento adecuado. Paracelsus (1493-1541) fue uno de los primeros en utilizar el ácido sulfúrico para mitigar los sufrimientos de presos por el supuesto mal divino (Rubio y col., 1989; Maldonado, 1992).

Cuando comenzó el siglo XIX, se utilizaron sales de cinc, cobre, iodo, así como opio, morfina y belladona. En 1857, sir Charles Lockoc trató algunos pacientes con bromuro de potasio, el cual inhibe la líbido (Rubio y col., 1989; Maldonado, 1992; Porter y Meldum, 1996). Un año después, Clouston demostró la efectividad de dicha sustancia en 29 epilépticos, en los que disminuyeron considerablemente las crisis (Rubio y col., 1989; Maldonado, 1992).

En el siguiente paso en la terapia anticonvulsiva ocurrió en 1912, cuando se obtuvieron algunos éxitos con un sedante denominado fenobarbital. Para 1937, se inició una investigación sistemática con diversas drogas parecidas a dicho sedante (Maldonado, 1992; Porter y Meldum, 1996).

En las últimas décadas, diversos fármacos han probado su utilidad en el tratamiento de epilepsias. Uno de ellos, casi siempre identificado como DFH (difenilhidantoína, Dilantin) es aún de los más utilizados. Sin embargo, estudios en laboratorio han revelado que ese anticonvulsivo reduce la habilidad mental, provoca defectos en columna vertebral, enfermedades congénitas del corazón, labio y paladar hendido y otras anomalías craneanas así como del esqueleto (Lander y Eadie, 1990; Maldonado, 1992; Chamorro y Salazar, 1996; Porter y Meldrum, 1996).

En México, investigadores del Instituto de Neurología y Neurocirugía, realizan proyectos encaminados a detectar nuevos y mejores fármacos, pues desgraciadamente, los utilizados hasta hoy, ocasionan efectos colaterales adversos, como lesiones en estructuras cerebrales, hepáticas, en el bazo o en la producción de células sanguíneas (Maldonado, 1992).

Otros problemas se originan por la administración sistémica (vía sanguínea, oral, muscular o peritoneal). Con ella, se irriga prácticamente a todo el organismo con anticonvulsivos para alcanzar una dosis adecuada en el sistema nervioso, lo cual puede parecer absurdo, si se toma en cuenta que aquéllos deben dirigirse a una región específica del cerebro y no al corazón o al hígado (Maldonado, 1992).

Uno de los objetivos más importantes para estos investigadores, es administrar fármacos en la región específica del cerebro donde se va a disminuir la actividad epiléptica o bien, incrementar los propios mecanismos inhibitorios del órgano. Así se evitaría también irrigar innecesariamente otras de sus áreas sanas, las mismas que pueden volverse aún más epileptogénicas al recibir, sin causa, anticonvulsivos.

Actualmente la tecnología, el conocimiento del sistema nervioso y la experiencia de los neurocirujanos brindan la posibilidad de abordar cualquier sitio del sistema nervioso mediante la cirugía esterotóxica (situar un punto en el espacio).

Entre los puntos de acción donde supuestamente se llevan a cabo las acciones de los fármacos se encuentran la amígdala y el hipocampo (sistema límbico), se sabe que ellos son los responsables de aproximadamente el 50% de las crisis. Sin embargo, el problema más importante se sitúa en el lóbulo temporal,

aquí, el sujeto tiene manifestaciones de lengüeteo, movimientos musculares en las manos, e incluso agresividad (Maldonado, 1992).

En cuanto a la actividad antiepiléptica generado por el mismo cerebro, se sabe que la sustancia negra o la formación reticular son capaces de influir y hasta detenerla. Según el doctor Alvarado (investigador del Instituto de Neurología y Neurocirugía), es posible utilizar a los mismos neurotransmisores que son las sustancias producidas por el cerebro encargadas de llevar mensajes de una neurona a otra para inhibir un ataque, tal es el caso de la dopamina (Maldonado, 1992).

Existen otras sustancias químicas en las que los científicos tienen puestas sus esperanzas. Algunas ya son conocidas, sin embargo, se les trata de obtener mayores ventajas, mientras otras son totalmente novedosas. Los experimentos se realizan sobre todo en ratones, por el enorme conocimiento que se tiene de su estructura cerebral y porque en cierta medida tienen relaciones anatómicas con el humano (Paulus, 1982; Maldonado, 1992). En esos "ratoncillos de indias" se incrementa la excitación neuronal a partir de estímulos diarios, breves, repetidos, hasta que se produce la descarga epiléptica (sistema kindling). Existen otros modelos más estudiados en los que se simulan convulsiones con sustancias químicas o electroshocks (Paulus, 1982; Maldonado, 1992; Rall y Schleifer, 1994).

6.1 Fármacos Anticonvulsivos.

Entre los factores que se deben considerar en la planeación de drogas se encuentran los que intervienen en su modificación molecular (metabolismo) y en su distribución. Así, para las drogas con actividad anticonvulsionante que deben actuar en el sistema nervioso central, se debe planear una estructura química con características tales que la solubilidad anticipada sea favorable a los lípidos, pero conservando una moderada solubilidad en el agua (Carvajal, 1989).

Los medicamentos anticonvulsivos se emplean primordialmente en el tratamiento de la epilepsia, pero también son eficaces para controlar las convulsiones debidas a otras causas, por ejemplo, tumores intracraneales,

traumatismos o uremia. Debido a que la mayor parte de los pacientes que son tratados por estados epilépticos reciben más de un medicamento y el tratamiento continúa por muchos años, la toxicidad crónica de los medicamentos anticonvulsivos es de particular importancia (Meyers y col., 1982).

Cada anticonvulsivo tiene indicaciones para trastornos específicos según el tipo de ataques, convulsiones o ataques apopléticos. Las convulsiones o ataques pueden ser de origen desconocido (idiopático) o secundarios a alguna condición orgánica o adquirida. Cuando se conoce la etiología de los ataques, a menudo el tratamiento se dirige también hacia la causa subyacente (Orizaga, 1987).

Los anticonvulsivos previenen o reducen la frecuencia o gravedad de los ataques de epilepsia idiopática o los ataques secundarios a medicamentos, hipoglucemia, hipomagnesemia, meningitis, eclampsia, encefalitis, síndrome de retiro del alcohol o lesión cerebral relacionada con un accidente.

Por lo general, los anticonvulsivos se absorben bien en el aparato gastrointestinal y se distribuyen extensamente en los tejidos, incluyendo el sistema nervioso central. Metabolizados por el hígado, se excretan por los riñones (Orizaga, 1987).

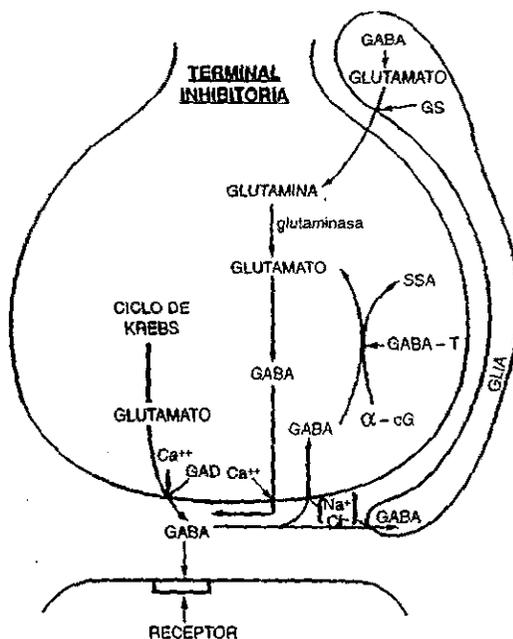
Los agentes antiepilépticos pertenecen a diversas clases químicas. La mayoría de los fármacos empleados antes de 1965 están relacionados estrechamente desde el punto de vista estructural con el fenobarbital, el miembro más antiguo de esta clase terapéutica. Entre ellos se encuentran las hidantoínas, los desoxibarbitúricos, las oxazolindionas y las succinidas. Los agentes introducidos después de 1965 incluyen las benzodiazepinas (clonazepam y clorazepato), un iminoestilbeno (carbamazepina) y un ácido carboxílico de cadena ramificada (ácido valproico). Se han publicado recopilaciones de las relaciones estructura-actividad de éstas y otras clases de compuestos. En laboratorios industriales y mediante el Antiepileptic Drug Development Program of National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke se han estudiado muchos miles de compuestos (Rall y Schloifer, 1994).

6.2 Mecanismos Celulares de la Epilepsia

La anomalía neuronal que subyace en la epilepsia no se conoce completamente. Debido a la imposibilidad de realizar estudios detallados en pacientes epilépticos humanos, se están estudiando diferentes modelos de epilepsia en animales. Entre los animales utilizados se incluyen una gran variedad de razas genéticas que muestran características similares a las de la epilepsia, por ejemplo un ratón que sufre convulsiones leves en respuesta a determinados sonidos, mandriles que tienen crisis inducidas por medio de estímulos luminosos y perros beagles que heredan genéticamente una anomalía muy similar a la epilepsia humana (Rang y Dale, 1992).

Los intentos para encontrar una base neuroquímica común para la epilepsia humana y la experimental no han sido fructíferos, aunque se han encontrado algunos indicios. La búsqueda se ha centrado de forma primordial en el posible déficit en la transmisión inhibitoria mediada por el ácido gamma-aminobutírico (GABA), glicina o taurina, o en la hiperactividad de un transmisor excitatorio, tal como glutamato o aspartato (Rang y Dale, 1992; Smith y Reynard, 1993). Los estudios sobre el contenido en aminoácidos de áreas de la corteza extirpadas en pacientes con epilepsia focal sugieren que es el foco en sí mismo el que es, de alguna manera, deficiente en glutamato, mientras que los niveles de glutamato son superiores a lo normal en las áreas que lo circundan, zonas que pueden tener un papel durante las crisis. El contenido de GABA no se afecta. Asimismo, parece que no existen alteraciones importantes en la actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis o degradación de los aminoácidos, ni en el número de receptores de glutamato o GABA, tanto en el cerebro de los pacientes como en varios modelos de epilepsia en animales. No existen pruebas directas evidentes a favor de que una anomalía en la transmisión aminoacídica fuera la causa subyacente de la crisis (Fig. 3)

Fig. 3. Anormalidad en la Transmisión Aminoacídica



GS, glutamina sintetasa; alfa-KG, alfa-cetoglutarato; SAA, semialdehído succínico

Tapia, 1979

6.3 Mecanismos de Acción de los Fármacos Antiepilepticos.

Los fármacos anticonvulsivos de uso común actúan preferentemente:

-Reduciendo la excitabilidad eléctrica de las membranas celulares, posiblemente a través de un bloqueo dependiente del uso de los canales del sodio.

-Favoreciendo la inhibición sináptica mediada por GABA. Esto puede conseguirse por una mayor acción postsináptica del GABA, inhibiendo la GABA-transaminasa, o con fármacos que tengan actividad como agonistas del GABA directos (Rang y Dale, 1992).

Se conocía que en algunos estados convulsivos se hallaba alterada la biosíntesis del GABA y que la administración de dosis altas del mismo tenía una clara actividad anticonvulsionante. La razón para administrar dosis altas del aminoácido se atribuye a la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica para el GABA. El análogo cíclico del GABA (la 2-pirrolidiona) presenta una actividad anticonvulsionante mayor que la del GABA aparentemente porque penetra mejor la barrera hematoencefálica y es hidrolizado *in situ* a ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Carvajal, 1989).

También se sabía que la principal vía catabólica de GABA es la transaminación con el ácido alfa cetoglutarico y que la inhibición de esta reacción con la hidroxilamina o el ácido aminooxiacético produce un aumento en los niveles del GABA y contrarresta el efecto convulsionante de varios agentes, aunque la máxima acción anticonvulsionante no coincide con el nivel GABA cerebral más alto (Carvajal, 1989).

Con base en lo anterior, cabe pensar que sería posible obtener un efecto anticonvulsionante si se inhibiera la transaminasa del GABA. Se planeó la preparación de compuestos análogos del aminoácido con sustituyentes en la posición gamma, que al inhibir a la transaminasa de la indispensable expulsión de un protón del átomo de carbono vecino al grupo amino evitaría la transaminación. Así, se proyectó sintetizar los compuestos con sustituyentes hidrofóbicos etilo y fenilo en el carbono gamma, para que permitieran la formación de uniones hidrofóbicas y también para disminuir la excesiva polaridad del GABA, que limita su penetración a través de la barrera hematoencefálica por libre difusión. La síntesis se llevó a cabo por:

a) Una condensación de Stobbe entre el succinato de dietilo y la , la propiofenona y la benzofenona;

b) La descarboxilación a los aductos por medio del tratamiento con

ácido bromhídrico y obtención de las lactonas (gamma lactonas correspondientes) y

c) La formación de las lactamas por tratamiento líquido a presión en una autoclave (bomba parr) (Carvajal y col., 1964; Carvajal, 1989; Meza-Toledo col., 1990)

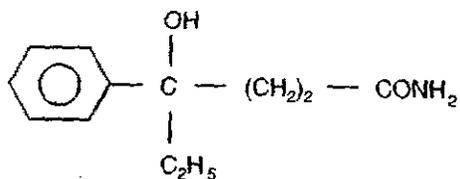
El Dr. Carvajal, autor de los compuestos originalmente designados como 5-etil, 5-fenil, 2-pirrolidona (denominada EPP) y el análogo con grupo metilo en vez de etilo, al que se llamó MPP, y colaboradores demostraron que estos nuevos fármacos poseían una marcada actividad anticonvulsionante en animales de experimentación (Carvajal y col., 1964; Martínez de Muñoz y Oscos, 1977; Velasco-Suárez, 1979).

En 1981 Castellano y colaboradores confirmaron la estructura de hidroxiamida acíclica por difracción de rayos X y la designaron 4-hidroxi, 4-fenil-hexanamida. El autor de estos compuestos, al considerar que forman parte de una serie de hidroxiamidas acíclicas, propone que el antes denominado EPP debe llamarse 4-hidroxi, 4-etil-4-fenil butiramida (HEPB).

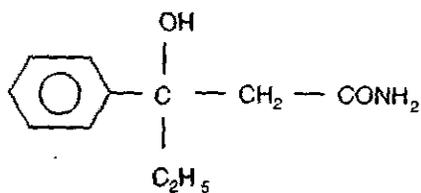
Posteriormente se sintetizaron dos homólogos inferiores del HEPB: el 3-hidroxi, 3-etil-3-fenil propionamida (HEPP) y el 2-hidroxi, 2-etil, 2-fenil acetamida (HEPA) cuyas estructuras químicas se muestran en la Fig.4 (Meza-Toledo y col., 1990), los cuales han sido evaluados por su poder anticonvulsionante ante varios modelos de epilepsia experimental en donde los tres compuestos han demostrado tener un amplio espectro de acción antiepiléptica (Godínez y col., 1996).

Fig.4 Estructura Química del DL-HEPB y fórmulas de sus homólogos DL-HEPP y DL-HEPA
(Meza Toledo y col., 1990)

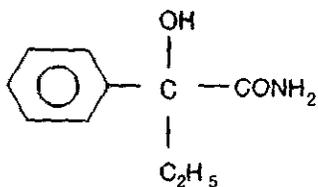
HEPB



HEPP



HEPA



7. Genoma Celular

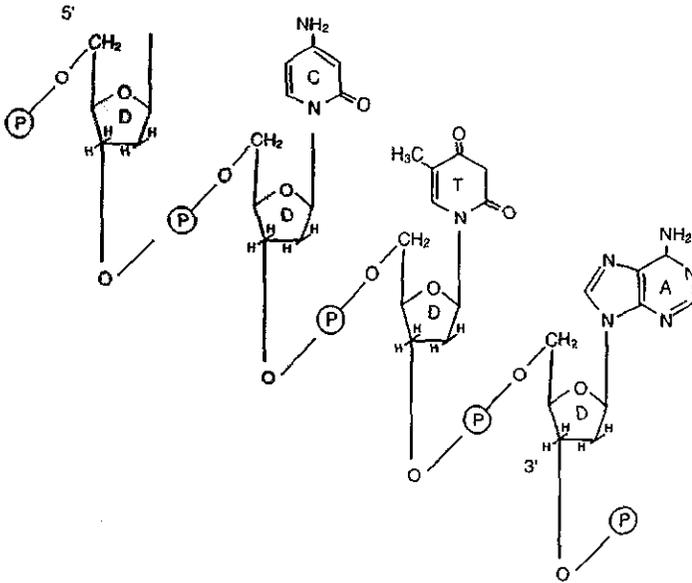
7.1 Composición y Estructura de los Ácidos Nucleicos

Químicamente, los genes están constituidos de ácido desoxirribonucleico, que se abrevia ADN. El ADN fue aislado de los núcleos de células en el siglo pasado; en 1869, un científico suizo, Friedrich Miescher, hizo una separación química de las partes de las células de pus que había colectado en el hospital de las heridas de los pacientes. Digiriendo el citoplasma externo, Miescher obtuvo núcleos celulares y de estos núcleos extrajo un material gelatinoso al que llamó nucleína. Esta era una sustancia que se teñía fuertemente con colorantes básicos, de modo que se le consideró como un ácido, el ácido nucleico (Winchester, 1977; Curtis y Barnes, 1994; Kimball, 1996).

Los ácidos nucleicos son cadenas de nucleótidos unidos covalentemente. Cada nucleótido está constituido por un grupo heterocíclico de átomos de carbono y nitrógeno (base nitrogenada), un azúcar de cinco carbonos en forma de anillo (pentosa) y un grupo fosfato. La estructura de las bases nitrogenadas puede consistir en: moléculas heterocíclicas de nueve átomos llamadas purinas (adenina y guanina); y de moléculas heterocíclicas de seis átomos denominadas pirimidinas (citosina, timina y uracilo). La ribosa es el azúcar presente en el ARN, y la 2-desoxirribosa en el ADN. Además, el ARN difiere del ADN en que la timina es sustituida por el uracilo (Winchester, 1977; Curtis y Barnes, 1994; Kimball, 1996; Rodwell, 1997).

Como puede apreciarse en la Fig. 5, el carbono de la posición 3' de una pentosa se enlaza con el de la posición 5' de la siguiente pentosa a través de un grupo fosfato. Por lo tanto, el nucleótido terminal en uno de los extremos tiene un grupo trifosfato libre en 5', mientras que el nucleótido terminal en el otro extremo tiene un grupo hidroxilo libre en 3'. Estos grupos libres marcan la dirección de polinucleótidos cuyas secuencias se escriben convencionalmente de izquierda a derecha de 5' a 3'. Esto es, del extremo con el carbono 5' libre al extremo con el carbono 3' libre (Barrera, 1992).

Fig. 5. Estructura Química de una Sección de ADN.



Se representa esquemáticamente la molécula del ADN, existiendo entre el par A-T sólo dos puentes (Barrera, 1992)

El modelo propuesto por Watson y Crick en abril de 1953 muestra al ADN como una doble hélice con un giro a cada 3.4 nm con un diámetro de 2 nm. La molécula se asemeja a una escalera girando sobre una columna cilíndrica imaginaria. En esta analogía los peldaños son las bases nitrogenadas

provenientes de cada una de las cadenas de la doble hélice, unidas entre sí a través de puentes de hidrógeno; los pasamanos de la escalera corresponden a los ejes de pentosa y fosfato. En la molécula puede apreciarse tanto la existencia de un canal o surco mayor en el espacio comprendido entre dos pares de crestas adyacentes de la doble hélice que se aprecian cuando se coloca el eje central (columna imaginaria) horizontalmente. En esta visión de la molécula, el surco menor se delimita por las dos crestas de cada par. El modelo también establece que las cadenas de polinucleótidos corren en dirección opuesta a la complementaria por lo que son antiparalelas. Una de las cadenas corre en la dirección 5' a 3', y la cadena complementaria de 3' a 5'. La doble hélice tiene su giro hacia la derecha y al modelo con todas estas características se le conoce como la forma B del ADN (Barrera, 1992; Barrera y de la Garza, 1997).

7.2 Mutación

Un mutágeno es un agente que induce mutación y una mutación se considera como una modificación en la secuencia de bases nitrogenadas que constituyen el material genético (ADN) (Zimmerman, 1982). Este cambio puede ocurrir en los genes (unidades de información) o en los agrupamientos de genes, denominados cromosomas (Tabla I).

Los genes son entidades que tienen una estabilidad notable, replicándose con toda precisión a través de incontables divisiones celulares, pero algunas veces ocurre algún error pequeño que da como resultado un gene mutante y un fenotipo alterado. Estos genes mutantes proporcionan la diversidad vital para las adaptaciones evolutivas, sin las cuales, en un ambiente cambiante, la mayor parte de las formas de vida se extinguirían (Curtis y Barnes, 1994, Goldstein y col., 1995; Kimball, 1996).

Las mutaciones espontáneas, aquellas que ocurren sin exposición artificial a agentes mutagénicos, son tan poco frecuentes en cualquier locus que a menudo es muy difícil obtener una estimación precisa de su tasa de ocurrencia. Se debe examinar un número muy grande de individuos antes de encontrar esas

mutaciones en cantidades que tengan significación estadística. Aún así, el conocimiento de la tasa espontánea es esencial para emplearla como punto de comparación en una investigación de los posibles efectos mutagénicos de diversos agentes ambientales (Kimball, 1996; Winchester, 1977).

Tabla I. Alteraciones Genéticas

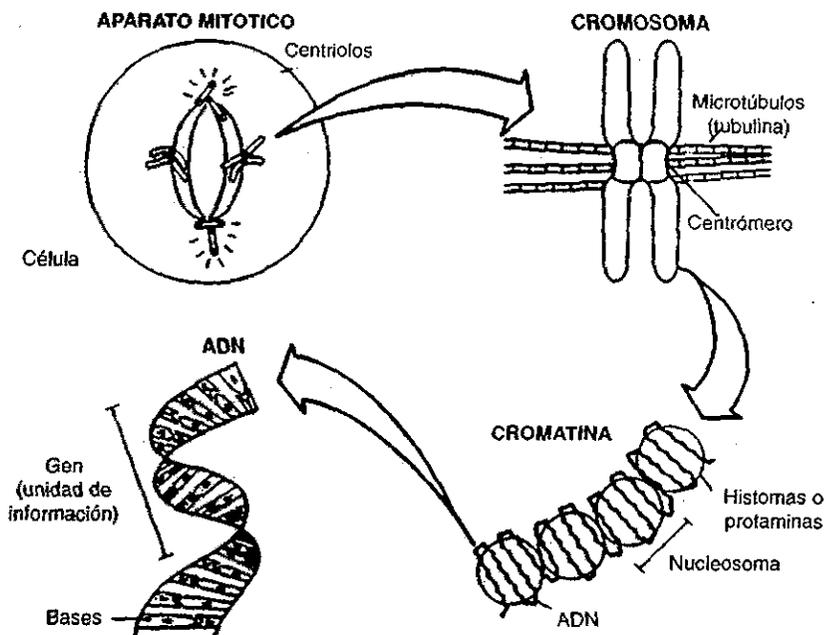
Nivel de la Mutación	Tipo de Mutación	Descripción
	Intragénica	
Alteraciones en la secuencia de bases	Sustitución de bases	Cambio de una base por otra a) Transición Purina-Purina Pirimidina-Pirimidina b) Transversión Purina-Pirimidina
	Desfasamiento	Corrimiento de la secuencia de bases por pérdida o adición
	Anomalías en el arreglo de los genes	
	Inversión	Cambio de orientación del gene, manteniendo su posición relativa respecto de otros genes
	Translocación	Cambio de posición de un gene con relación a otros genes
	Anomalías en el número de los genes	
	Eliminación	Pérdida de un gene
	Duplicación	Adquisición de una copia extra de un gene
Aberraciones cromosómicas estructurales	Rearreglos: Translocaciones, Inversiones, Anillos	Cambio en el número, posición u orientación de grupos de genes
Modificación del número de cromosomas	Aneuploidía a) Monosomía b) Polisomía	Segregación cromosómica defectuosa que resulta en pérdida o adquisición de uno o más cromosomas
	Ploiploidía	Aumento de juegos completos de cromosomas

Cortinas de Nava y col., 1980.

7.3 Mutagénesis Química

Las mutaciones pueden resultar de la acción directa de los agentes químicos sobre el material genético, o sobre otros componentes celulares ligados a él funcionalmente, como por ejemplo, los que participan en la división celular (centriolo y microtúbulos), las proteínas de la cromatina y las enzimas que contribuyen a la replicación o reparación del ADN (Fig. 6).

Fig. 6 Componentes Celulares Susceptibles a los Procesos Mutagénicos.



Cortinas de Nava y col., 1960.

En general, la acción de las sustancias está relacionada con su estructura química, aunque, a una estructura determinada puede corresponder más de una actividad. En la Tabla II, se resumen los hallazgos sobre el efecto mutagénico

principal, los orígenes y mecanismos de acción de algunos grupos de compuestos químicos (Cortinas de Nava y col., 1980).

Tabla II. Mecanismos de Acción de Algunos Mutágenos.

Tipos de Compuestos	Moléculas Susceptibles	Alteraciones en las Moléculas	Origen de la Mutación	Mutaciones Posibles	Ejemplos de Compuestos
Alquilantes (mono y poli-funcionales)	ADN Histonas Protamínas Enzimas de reparación Tubulina	Introducción de radicales alquilos. -CH ₃ . -CH ₂ -CH ₃ , entrecruzamientos inter o intra cadenas, biogruo de grupos sulfonílicos	Error en el apareamiento entre bases. despurinación, cambio en la estructura y función de las proteínas, alteración del ensamblaje de microtúbulos.	Génicas: Transiciones, transversiones, eliminaciones Cromosómica: Aberaciones estructurales y numéricas	Metilmetano sulfonato, nitrosoguanidina, clorquina, griseofulvina, dieldrin.
Análogos de bases	ADN	Sustitución de bases	Error en el apareamiento entre bases	Génicas: Transiciones Cromosómicas: Aberaciones estructurales.	2-amino-purina, bromouracilo, 5-bromodesoxiuridina.
Intercalantes	ADN	Inserción entre bases adyacentes en la doble hélice.	Alteración de la hélice Error en la replicación, la reparación y la recombinación.	Génicas: Desfasamientos, Eliminaciones. Cromosómicas: Aberaciones estructurales.	Quinacrina, acridina, proflavina, bromuro de etidio.
Desaminantes	ADN Histonas Protamínas	Eliminación de un grupo amino con introducción de un grupo hidroxilo. Entrecruzamiento inter o intracadenas.	Conversión de adenina a hipoxantina, y de citosina a uracilo. Cambio en la estructura de las proteínas.	Génicas: Transiciones, eliminaciones, desfasamientos. Cromosómicas: Aberaciones estructurales.	Acido nítrico.
Productores de radicales libres peróxidos	ADN	Sustitución de citosina por timina, posible formación de N-E-hidroxiadenina.	Error en el apareamiento entre bases.	Génicas. Transiciones Cromosómicas: Aberaciones estructurales.	Hidroxiamina.

Si un fármaco produce cambios hereditarios permanentes en una célula germinal, el resultado será una constitución hereditaria (genotipo) alterada del individuo, producto de la unión de esta célula germinal con otra. Por tanto, se introduce así un cambio persistente a la línea germinal de la especie, a menos que la alteración sea incompatible con la vida. Los cambios permanentes en el genotipo (mutaciones) se producen por radiación o por agentes químicos (mutágenos). Las mutaciones también ocurren espontáneamente por mecanismos desconocidos. En el sentido estricto de la palabra, una mutación es un cambio muy bien localizado en el material genético (también denominado "mutación puntual") que se distingue de la supresión y de otras alteraciones en el número o estructura de los cromosomas (Goldstein y col., 1995).

7.4 Bases Moleculares de la Mutación

La suma total de la información genética, que especifica la estructura, función y desarrollo de cada individuo de una especie, se encuentra codificada en el ADN. El cigoto de los organismos que se reproducen sexualmente contiene dos copias de ésta información, una derivada del espermatozoide y otra derivada del óvulo. Toda la información contenida en todos los genes está en la forma de un código lineal de palabras de 3 letras, las cuales son las 4 bases de los nucleótidos, la adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Así, la "palabra" CGG especifica una unidad de información, CAG otra, y así sucesivamente. La ordenada replicación de la información genética se asegura por el mecanismo de apareamiento de bases, por la formación de enlaces por puentes de hidrógeno en la hélice de doble filamento del ADN. Puesto que en un filamento una base dada, especifica únicamente su complementaria en el otro filamento, las letras del alfabeto de codificación son en realidad los cuatro pares posibles, el A:T, el T:A, el G:C y el C:G. El apareamiento obligatorio de una purina con una pirimidina se asegura por la distancia entre los esqueletos de desoxirribosa fosfato de las dos hélices; una pirimidina frente a otra pirimidina dejaría un espacio entre ellas y una purina frente a otra purina no se ajustaría al espacio disponible. Las relaciones

para enlaces por puentes de hidrógeno son óptimas para aparear la adenina a la timina y la guanina a la citosina. El proceso por el cual la doble hélice se desdobra durante la replicación, y cada filamento actúa como modelo para la síntesis de un filamento complementario (el mecanismo de replicación semiconservativa) garantiza que toda la información genética esté repartida igualmente entre las células hijas en cada división celular y así se transmitirá con precisión de generación en generación (Goldstein y col., 1995).

Se reconocen los siguientes tipos de mutación:

7.4.1. Transformación de pares de bases.

Un par de bases dado se puede reemplazar de tres modos. En uno de ellos la purina original se reemplaza por otra purina, la pirimidina original por otra pirimidina; este tipo de cambios se denomina transición. En los otros dos cambios posibles una purina se reemplaza por una pirimidina, o una pirimidina por una purina; esto se denomina transversión.

7.4.2. Adición o supresión de un par de bases.

Este tipo de cambios se conoce como cambio de marco de lectura, debido a que la traducción ordenada de los codones, tripleta por tripleta, estará profundamente trastornada. Todas las bases distales al punto de la inserción o supresión quedarán fuera del registro. Como se puede imaginar, las consecuencias por lo general son mucho más drásticas que las de la transformación de un solo par de bases.

7.4.3. Supresiones y transposiciones mayores.

Las supresiones del material genético pueden darse en todos los tamaños. El proceso mutacional básico parece ser en este caso una ruptura seguida por una reconstitución de los fragmentos; esto ocurre en moléculas de ADN y también a nivel de cromosomas. Los segmentos se pueden invertir, pueden ocurrir intercambios entre las cromátidas (las subunidades apareadas de los cromosomas), y el material se puede trasladar de un cromosoma a otro.

7.4.4. Partición desigual de los cromosomas entre las células hijas.

Esto se conoce como no disyunción. Puede ocurrir en la meiosis o mitosis y con frecuencia se produce por agentes químicos que trastoman la formación y función del sistema de fibras del huso.

Se tiene que hacer una distinción fundamental entre los dos modos de acción de los mutágenos.

Los agentes de la primera clase actúan directamente en el material genético existente y, por tanto, son efectivos en cualquier momento durante el ciclo celular. Los agentes de la segunda clase sólo son capaces de modificar el curso de un proceso dinámico tal como la replicación del ADN o el movimiento cromosómico; estos mutágenos sólo pueden ser efectivos en cierto momento del ciclo celular (Goldstein y col., 1995).

7.4.5. Mutagénesis Física.

Un tipo de mutagénesis que no se puede incluir fácilmente en cualquiera de las categorías mencionadas es la que se debe a la incorporación de radiactividad al ADN y es la mutagénesis física y las mutaciones ocurren en 3 formas:

7.4.5.1 La energía de desintegración puede romper una unión internucleotídica por un efecto de rechazo.

7.4.5.2 Las emisiones localizadas beta o gamma pueden ser mutagénicas en virtud de que bombardean secundariamente las bases púricas o pirimídicas cercanas.

7.4.5.3 La transmutación de un átomo radiactivo puede llevar a propiedades químicas alteradas y así afectar la fidelidad de las replicaciones subsecuentes. Es bien sabido que el ^{32}P incorporado al ADN bacteriano y viral produce letalidad y mutaciones puntuales, quizá por los dos primeros mecanismos. Se cree que tanto el ^3H como el ^{14}C son especialmente peligrosos debido a su muy fácil incorporación a las bases y a los azúcares de los ácidos nucleicos. El peligro especial del ^3H es la dificultad para detectarlo rutinariamente; su energía de desintegración es tan

baja que la longitud media de trayecto de sus partículas β es tan corta que los contadores Geiger son inefectivos para detectar la contaminación. El peligro especial del ^{14}C es su vida media radiactiva muy larga (más de 5 000 años), su incorporación a la línea germinal humana produciría efectos mutacionales por un periodo de milenios (Goldstein y col., 1995).

Es muy notable la fidelidad del proceso normal de replicación del ADN. Las mutaciones espontáneas, que son errores en este proceso, rara vez se observan a una frecuencia mayor de 1 por cada 10 000 replicaciones. Las bases moleculares de esta fidelidad de replicación aún no están bien aclaradas. En realidad la simple diferencia de las energías de enlace entre los pares de bases correctos (A:T, G:C) y los incorrectos (A:C, G:T) no la explican. Mecanismos adicionales deben excluir o descartar las bases equivocadas. Un ejemplo de este mecanismo de reconocimiento es el sistema enzimático de reparación del ADN. Las enzimas de reparación excluyen los segmentos que contienen bases erróneas (por ejemplo dímeros de timina formados por irradiación ultravioleta) en un filamento del ADN y permiten su reemplazo mediante el alineamiento y uniones de las bases correctas apareadas adecuadamente con las del otro filamento (normal). Así se "parchan" las regiones defectuosas de cualquiera de los filamentos. La existencia de los mecanismos de reparación complica mucho la interpretación de datos acerca de la mutagénesis, ya que las mutaciones que finalmente se observan, sólo constituyen una pequeña fracción de las producidas originalmente; el resto habrá sido reparado (Goldstein y col., 1995).

La secuencia de los pares de bases en el ADN determina la secuencia correspondiente de las bases en el ARN. Sólo el filamento del ADN ("con sentido") se transcribe, sirviendo como modelo para la síntesis del ARN de un solo filamento. El mismo mecanismo de apareamiento de bases opera como en la replicación, con excepción de que el ARN contiene uracilo (U) en vez de timina; así se tiene un par de bases A:U en vez de A:T. Una pequeña fracción del ADN total especifica las estructuras de las dos clases de ARN ribosomal y del modesto número (64 o menos) de las moléculas del ARN de transferencia (ARNt). La mayoría del resto del genoma contiene la información de la secuencia de

aminoácidos de todas las proteínas celulares y para los procesos reguladores que involucran genes operadores y ARN represor. Esta información primero se transcribe al ARN mensajero (ARNm) que sirve como modelo para el ensamblaje de proteínas (Goldstein y col., 1995; Kimball, 1996).

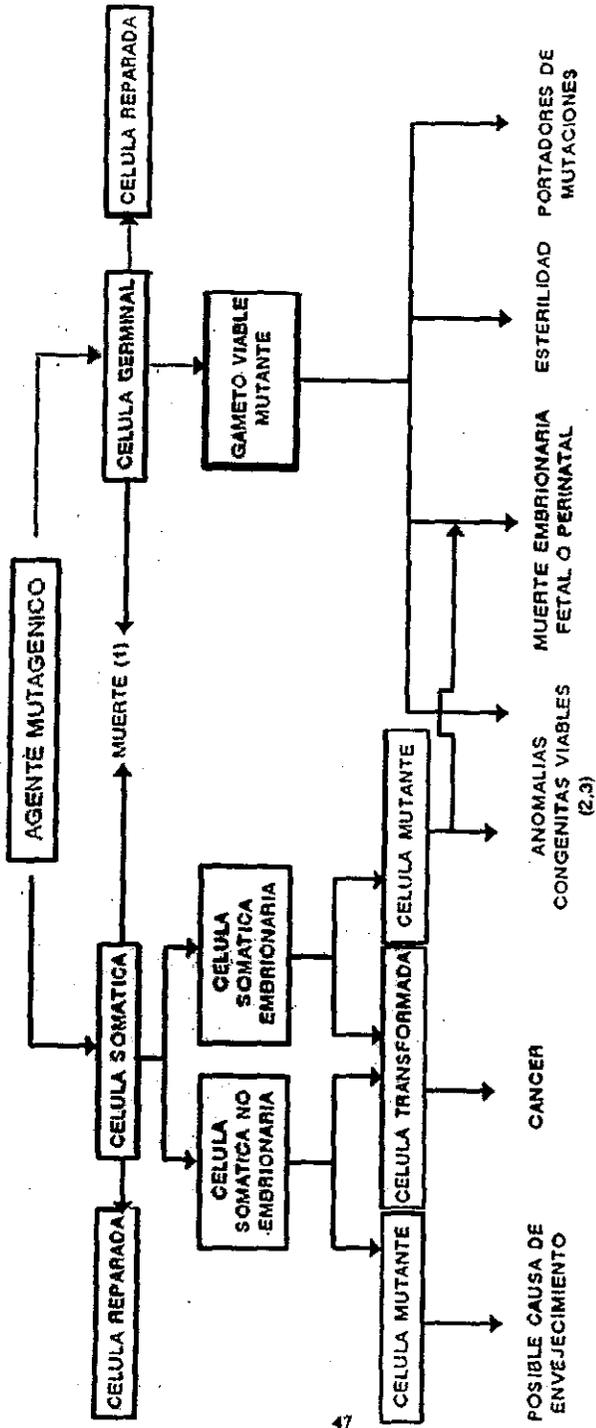
La fidelidad de la replicación y transcripción explican la persistencia de las mutaciones, ya que cualquier cambio que no pueda ser reconocido como incorrecto permanecerá codificado perennemente en el genoma (Goldstein y col., 1995).

7.5 Manifestaciones Clínicas de la Mutación

Las mutaciones pueden ser ventajosas, neutras o tener manifestaciones patológicas, entre las que incluyen padecimientos congénitos y cáncer (Fig.7).

Existen en la actualidad más de dos mil enfermedades hereditarias. Aproximadamente el 3% de todos los recién nacidos son portadores de anomalías congénitas que requieren atención médica y cerca del 60% de los abortos que ocurren en el tercer trimestre del embarazo, son consecuencia de aberraciones cromosómicas. Esto pone de manifiesto la contribución de las alteraciones genéticas a la patología humana.

Cabe hacer notar que, si bien existen numerosos estudios que asocian la generación de cáncer con la exposición a ciertos compuestos químicos, a la fecha sólo se cuenta con datos preliminares (una elevada incidencia de abortos en las esposas de los individuos expuestos en el ambiente laboral) que sugieren la ocurrencia de daño genético en los gametos. Estos estudios constituyen la primera indicación en humanos de alteraciones hereditarias inducidas por agentes químicos (Fig.7), (Cortinas de Nava y col., 1980).



- 1) Tanto la muerte de los gametos como su incapacidad para realizar la fecundación puede manifestarse
- 2) Esto puede traducirse en incapacidad reproductiva del individuo.
- 3) Pueden transmitirse de una generación a otra.

7.6 La Línea Germinal Humana

Los efectos hereditarios se originan por mutación en la línea germinal. Cada persona se puede considerar como una clona diferenciada de células derivada de la fusión de un gameto paterno y uno materno para formar un cigoto. Las mutaciones se pueden introducir en la línea germinal humana sólo durante la vida reproductiva del individuo, un periodo de casi 30 años en promedio. Por tanto, los peligros de la mutagénesis química o de otro tipo afectan sólo a la población joven. Estos peligros son peculiares debido a que el daño genético no afecta al individuo expuesto, sino que puede permanecer oculto por generaciones hasta que la homocigocidad los pone de manifiesto (Goldstein y col., 1995).

En promedio, un cigoto se forma por la unión de un espermatozoide cuyos cromosomas se han replicado aproximadamente 950 veces desde la generación previa y un óvulo cuyos cromosomas se han replicado sólo unas 70 veces en el mismo periodo.

Según esta explicación es evidente que la aparición de mutaciones nuevas podría seguir un curso diferente en los dos sexos. En el femenino los mutágenos que actúan sólo en el ADN en replicación o en el proceso mitótico deberían tener efectos principalmente durante la vida fetal. Los mutágenos que actúan sobre el ADN que no están en replicación, podrían actuar a lo largo de toda la vida. (Goldstein y col., 1995).

Desde el punto de vista de la predicción de si un fármaco o un agente químico es probablemente peligroso para la línea germinal humana, debería ser obvio que ningún sistema es suficiente. Los científicos han discutido que el ADN de todos los organismos es similar en su estructura fundamental y en su mecanismo de replicación, por tanto, se puede utilizar cualquier organismo conveniente. En realidad se debería sospechar de cualquier compuesto que demuestre tener gran mutagenicidad en cualquier sistema de prueba y los compuestos que son universalmente mutagénicos en otras especies deben ser considerados como mutagénicos también en el hombre. Algunos ejemplos son los agentes alquilantes, la ciclohexilamina, los nitritos y nitrosaminas, análogos de bases y estreptonigrina. Por otro lado, una prueba negativa en un organismo no se

puede tomar como garantía de seguridad en el hombre. Aun un resultado negativo en un sistema de prueba con huésped mediador no da una seguridad real, ya que las especies también difieren mucho en el patrón de los metabolitos derivados de un compuesto original dado (Goldstein y col., 1995).

8. Carcinogénesis

Los acontecimientos moleculares a través de los cuales una célula normal sufre un proceso de transformación maligna todavía no se comprenden bien. No obstante, es claro que para que un tumor se desarrolle es necesario que se produzca una acumulación de sucesos en el genoma de las células que en forma aditiva desencadenen el mecanismo de transformación y la consecuente pérdida del control de la división celular (Barrera y de la Garza, 1997). En consecuencia el cáncer es una proliferación maligna y desenfrenada de las células somáticas que se produce espontáneamente aunque también se puede inducir por radiación ionizante, virus y agentes químicos que se conocen como carcinógenos. Uno de los avances más importantes para entender el mecanismo de la carcinogénesis se hizo hace más 20 años cuando se descubrió que la inducción química del cáncer incluía dos procesos distintos, designados como iniciación y promoción (Doll y Peto, 1981). La iniciación es la producción de un cambio celular irreversible, que es una condición necesaria, pero no suficiente para el desarrollo del cáncer. La promoción es el proceso por el que un tumor se desarrolla en un tejido en el que ya ocurrió la iniciación. Se descubrió que algunas sustancias tenían un efecto doble (como iniciadores y promotores); por tanto, se pudieron identificar dos clases de sustancias: los iniciadores del proceso carcinogénico y los promotores del desarrollo del cáncer (Goldstein y col., 1995).

Estudios histopatológicos cuidadosos de los estadios tempranos de la carcinogénesis han revelado que a menudo se asocia la acción de promoción con daños celulares en el área donde se originará finalmente el tumor maligno. Un posible mecanismo de acción de los promotores consiste en inhibir los sistemas reparadores del ADN (Gaudin y col., 1971). En este sentido, la pérdida de fidelidad

puede tomar como garantía de seguridad en el hombre. Aun un resultado negativo en un sistema de prueba con huésped mediador no da una seguridad real, ya que las especies también difieren mucho en el patrón de los metabolitos derivados de un compuesto original dado (Goldstein y col., 1995).

8. Carcinogénesis

Los acontecimientos moleculares a través de los cuales una célula normal sufre un proceso de transformación maligna todavía no se comprenden bien. No obstante, es claro que para que un tumor se desarrolle es necesario que se produzca una acumulación de sucesos en el genoma de las células que en forma aditiva desencadenen el mecanismo de transformación y la consecuente pérdida del control de la división celular (Barrera y de la Garza, 1997). En consecuencia el cáncer es una proliferación maligna y desenfrenada de las células somáticas que se produce espontáneamente aunque también se puede inducir por radiación ionizante, virus y agentes químicos que se conocen como carcinógenos. Uno de los avances más importantes para entender el mecanismo de la carcinogénesis se hizo hace más 20 años cuando se descubrió que la inducción química del cáncer incluía dos procesos distintos, designados como iniciación y promoción (Doll y Peto, 1981). La iniciación es la producción de un cambio celular irreversible, que es una condición necesaria, pero no suficiente para el desarrollo del cáncer. La promoción es el proceso por el que un tumor se desarrolla en un tejido en el que ya ocurrió la iniciación. Se descubrió que algunas sustancias tenían un efecto doble (como iniciadores y promotores); por tanto, se pudieron identificar dos clases de sustancias: los iniciadores del proceso carcinogénico y los promotores del desarrollo del cáncer (Goldstein y col., 1995).

Estudios histopatológicos cuidadosos de los estadios tempranos de la carcinogénesis han revelado que a menudo se asocia la acción de promoción con daños celulares en el área donde se originará finalmente el tumor maligno. Un posible mecanismo de acción de los promotores consiste en inhibir los sistemas reparadores del ADN (Gaudin y col., 1971). En este sentido, la pérdida de fidelidad

en la copia del ADN puede ocurrir a través de cuatro mecanismos: a) si las fallas suceden en los mecanismos de reparación del ADN, puede presentarse una falta de corrección o bien las mutaciones pueden corregirse en forma errónea, b) alteraciones de la condensación de los cromosomas, del alineamiento del huso acromático o de la migración de los mismos, c) alteraciones en los tiempos del ciclo celular, y d) la falla en los mecanismos que producen apoptosis. Todos estos problemas llevan a incrementar el número de mutaciones y este incremento en cierto momento puede conferir ventaja selectiva para el desarrollo de una célula tumoral (Barrera y de la Garza, 1997).

Puesto que la iniciación de las células cancerosas es brusca, y este cambio al parecer es irreversible y hereditario, se puede considerar como mutación somática. De acuerdo con este punto de vista, la iniciación equivale a la mutagénesis somática y este concepto se ve apoyado por el hecho de que la radiación ionizante, así como los agentes alquilantes y otros mutágenos, también poseen actividad carcinogénica. De la misma manera, muchas sustancias descubiertas originalmente como carcinogénicas se ha probado que son mutagénicas en los microorganismos (Zimmermann, 1971).

Entre los agentes conocidos como carcinogénicos en animales y que también son mutagénicos (por lo general comprobados en bacterias) están las nitrosaminas, diazoacetano, sulfatos y sulfonatos de alcano, la β -propiolactona, tlenimina, trietilenmelamina, 1,2,3,4-diepoxiбутano, dimetilhidracina y las mostazas nitrogenadas y sulfuradas. Estos compuestos electrofílicos altamente reactivos interactúan covalentemente con el ADN (Brookes, 1971; Zimmermann, 1971).

Sin embargo, se ha comprobado que otros carcinógenos no son mutagénicos, lo que indica que no hay una relación necesaria entre la carcinogenicidad y la mutagenicidad. Esta discrepancia aparente se aclaró por el descubrimiento de la transformación metabólica a carcinógenos próximos en el organismo animal. Los compuestos que se habían probado para mutagenicidad fueron los que se sabía que producían cáncer cuando se administraban a animales, pero no los carcinógenos derivados metabólicamente que de hecho iniciaban el proceso neoplásico en los tejidos (Goldstein y col., 1995).

9. Teratogénesis

Las sustancias que producen anomalías en el desarrollo fetal se denominan teratógenos químicos. De interés especial son los teratógenos que interfieren directamente con el desarrollo fetal a dosis que no trastornan la función placentaria, ni producen toxicidad materna seria. Una gran cantidad de agentes teratogénicos cumple con este criterio de toxicidad selectiva para el feto. Todos los teratógenos, cuando se administran a una dosis alta o muy tempranamente en el desarrollo embriológico, pueden producir muerte fetal seguida de aborto o reabsorción del feto (Goldstein y col., 1995).

Un aspecto al que se ha prestado mucha atención a nivel experimental es el relativo a la teratogenicidad de anticonvulsivos en animales de laboratorio, con objeto de evaluar su efecto o conocer el mecanismo de acción. Estos estudios han ayudado a resolver, en parte, uno de los problemas más discutidos, como es el conocer si es la enfermedad o el fármaco *per se* el responsable de la incidencia aumentada de malformaciones congénitas en fetos expuestos a difenilhidantoína. Se concluyó que las crisis epilépticas no parecen por sí solas constituir un factor de riesgo y es más bien la exposición *in utero* al anticonvulsivo lo que produce las malformaciones (Chamorro-Cevallos y Salazar-Jacobo, 1997).

Se ha confirmado la poca potencia de algunos anticonvulsivos para producir defectos congénitos como la etosuximida y benzodiazepinas. En cambio otros, como la difenilhidantoína y el ácido valproico, aunque aparentemente presentan poca toxicidad, están incriminados en la etiología de las malformaciones congénitas. A pesar de los estudios para aclarar el mecanismo de acción teratogénico de la difenilhidantoína, éste aún se desconoce (Chamorro-Cevallos y Salazar-Jacobo, 1997). El responsable de las malformaciones parece ser su metabolito, el óxido de areno, altamente reactivo y por tanto, puede unirse en forma covalente a sitios nucleofílicos de los ácidos nucleicos y producir una serie de fenómenos que conducen finalmente a la malformación y otras manifestaciones anormales en el desarrollo (Jerina y Daly, 1974).

No es sorprendente que ciertos agentes tengan actividad mutagénica, carcinogénica y teratogénica. En el momento adecuado del desarrollo embrionario

la mutación inducida o la anomalía cromosómica, si no produce muerte fetal, podría producir un desarrollo fetal anormal. Por ejemplo, los agentes alquilantes se conocen como agentes mutágenos y carcinogénicos y algunos (pero no todos) son teratógenos potentes. Sin embargo, tales asociaciones de ninguna manera son la regla y numerosos teratógenos no son mutagénicos ni carcinogénicos. Esto es razonable, ya que todo lo que se requiere para la teratogénesis es un trastorno transitorio importante de la función celular durante un corto período crítico de la organogénesis, mientras que una alteración hereditaria en la línea celular es absolutamente necesaria para la mutagénesis y la carcinogénesis (Goldstein y col., 1995).

10. Pruebas de Genotoxicidad

En los países industrializados se utilizan alrededor de 60 000 sustancias diferentes y cada año se introducen al mercado unas 1 000 sustancias nuevas. De todas las sustancias se deben seleccionar, en relación a su distribución y probabilidad de interacción con el humano, aquéllas cuya genotoxicidad debe ser probada. La gran producción y variedad de las sustancias a las que diariamente se expone el hombre aumenta la posibilidad de que éstas puedan contribuir a aumentar las mutaciones de la carga génica humana.

Existen dos tipos de pruebas de genotoxicidad. Las pruebas de larga duración que apuntan a evaluar la carcinogenicidad y teratogenicidad en períodos que van de meses a años; se efectúan fundamentalmente *in vivo*, en mamíferos. Las pruebas mutagénicas de corta duración son diseñadas para demostrar, en un término de horas o hasta meses, según la prueba, la capacidad mutagénica de una sustancia estudiada. En la Tabla III, se muestran las pruebas más utilizadas; en ésta se clasifican las pruebas según el organismo, tipo de célula, metodología y expresión del cambio (Vega, 1985a).

la mutación inducida o la anomalía cromosómica, si no produce muerte fetal, podría producir un desarrollo fetal anormal. Por ejemplo, los agentes alquilantes se conocen como agentes mutágenos y carcinogénicos y algunos (pero no todos) son teratógenos potentes. Sin embargo, tales asociaciones de ninguna manera son la regla y numerosos teratógenos no son mutagénicos ni carcinogénicos. Esto es razonable, ya que todo lo que se requiere para la teratogénesis es un trastorno transitorio importante de la función celular durante un corto período crítico de la organogénesis, mientras que una alteración hereditaria en la línea celular es absolutamente necesaria para la mutagénesis y la carcinogénesis (Goldstein y col., 1995).

10. Pruebas de Genotoxicidad

En los países industrializados se utilizan alrededor de 60 000 sustancias diferentes y cada año se introducen al mercado unas 1 000 sustancias nuevas. De todas las sustancias se deben seleccionar, en relación a su distribución y probabilidad de interacción con el humano, aquellas cuya genotoxicidad debe ser probada. La gran producción y variedad de las sustancias a las que diariamente se expone el hombre aumenta la posibilidad de que éstas puedan contribuir a aumentar las mutaciones de la carga génica humana.

Existen dos tipos de pruebas de genotoxicidad. Las pruebas de larga duración que apuntan a evaluar la carcinogenicidad y teratogenicidad en períodos que van de meses a años; se efectúan fundamentalmente *in vivo*, en mamíferos. Las pruebas mutagénicas de corta duración son diseñadas para demostrar, en un término de horas o hasta meses, según la prueba, la capacidad mutagénica de una sustancia estudiada. En la Tabla III, se muestran las pruebas más utilizadas; en ésta se clasifican las pruebas según el organismo, tipo de célula, metodología y expresión del cambio (Vega, 1985a).

Tabla III. Pruebas de Genotoxicidad

Tipo de daño investigado	En células somáticas in vitro	in vivo	En células germinales in vivo
Alteraciones Cromosómicas	<p>1) Pruebas en cultivos de células de mamífero.</p> <p>-Aberraciones cromosómicas</p> <p>-Intercambio de cromátidas hermanas</p>	<p>1) Pruebas de los micronúcleos</p> <p>2) Análisis citogenético de las células de la médula ósea: -aberraciones cromosómicas</p>	<p>1) Pruebas de dominantes letales y de translocaciones heredables en <i>Drosophila</i></p> <p>2) Prueba de dominantes letales en ratón</p> <p>3) Prueba de translocaciones heredables en ratón.</p> <p>4) Análisis citogenético de células germinales</p> <p>5) Prueba de la no disyunción cromosómica.</p>
Mutación Génica	<p>1) Pruebas bacterianas</p> <p>2) Pruebas de levaduras</p> <p>3) Pruebas en hongos</p> <p>4) Pruebas en cultivos de células de mamíferos.</p>	<p>1) Pruebas mutacionales en un locus específico (ratón) (prueba de la mancha o Spot test)</p>	<p>1) Pruebas de recesivos letales, ligados al sexo, en <i>Drosophila</i>.</p> <p>2) Pruebas de mutaciones en un locus específico en ratón: mutaciones esqueléticas, morfológicas, electroforéticas, etcétera.</p> <p>3) Anomalías del espermatozoide en la descendencia (ratón).</p>

Vega, 1985a

10.1 Pruebas a Corto Plazo que Permiten Evaluar Agentes de Riesgo al Material Genético.

10.1.1 Pruebas en ADN Aislado

Sólo las pruebas biológicas pueden corroborar si una alteración particular

del ADN se traduce en una mutación; sin embargo, los estudios de las modificaciones producidas directamente en esa molécula permiten estimar, a corto plazo, lo que puede ocurrir si un compuesto dado tiene acceso a ella *in vivo* e inferir el mecanismo de acción posible (Cortinas de Nava y col., 1980).

Entre las técnicas más usadas para tal fin se encuentran:

- Rompimientos de cadenas sencillas
- Entrecruzamiento de cadenas sencillas
- Intercalación de colorantes
- Alquilación de bases

10.1.2 Virus

Mediante su empleo se valora, fundamentalmente, la capacidad de las sustancias para inducir mutaciones génicas o para activar la liberación y replicación de los virus (profagos) que se encuentren integrados en el cromosoma bacteriano y que producen la muerte de la bacteria (lisogenia) (Cortinas de Nava y col., 1980; OPS, 1980; Gichner y Valeminský, 1982).

10.1.3 Pruebas en Microorganismos

El gran tamaño de y el corto tiempo de generación de las poblaciones sobre las que se realiza el estudio, posibilita el uso de estas pruebas para el examen rápido y confiable de un número elevado de compuestos.

10.1.3.1 Bacterias

La inducción de mutaciones génicas puede determinarse en varias especies bacterianas, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* (Ames y col., 1975; Wright y col., 1983). Una de las ventajas de algunas de ellas es que proveen indicios de los mecanismos de producción de las

mutaciones, además de la información sobre la capacidad mutagénica de los compuestos probados (Gichner y Valeminský, 1982; Knuutinen y von Wright, 1982; Sezzano y col., 1982; Goldstein y col., 1995).

10.1.3.2 Hongos

Este tipo de microorganismos se asemejan más a los mamíferos que a los virus y las bacterias, ya que sus células poseen un núcleo, los cromosomas contienen ADN asociado a nucleoproteínas y los ciclos de división incluyen procesos mitóticos y meióticos. Los hongos más utilizados en el laboratorio son: *Saccharomyces cerevisiae* (De Marini, 1978; De Marini, 1981; Quah y col., 1980; Yadav y col., 1982; Salam y col., 1993), *Aspergillus* (Bignami y col., 1974; Upshall y Johnson, 1981; Watkins, 1982). y *Neurospora crassa* (Bausum y Wagner, 1965). Las pruebas más importantes comprenden mutaciones génicas recombinación mitótica, conversión génica y segregación cromosómica defectuosa (Gichner y Valeminský, 1982; Parry y Wilcox, 1982; van Zeeland y col., 1983).

10.1.3.3 Estrategias para Determinar la Actividad Genética de los Metabolitos

Tanto microorganismos como las plantas no poseen todos los grupos enzimáticos responsables de la activación o detoxificación de las drogas existentes en los mamíferos y en el hombre, por lo que se han desarrollado diversas estrategias:

10.1.3.3.1 El empleo de homogenados celulares que contienen las enzimas microsomales provenientes, fundamentalmente, del hígado de roedores, que ejercen su acción *in vitro* sobre los compuestos (Ames y col., 1975; Kasamaki y col., 1982; Wright y col., 1983).

10.1.3.3.2 La utilización de fluidos corporales, como orina y sangre, de individuos (animales de laboratorio o humanos) expuestos *in vivo* a los agentes químicos

(Knuutila y col., 1977; Cortinas de Nava y col., 1980).

10.1.3.3.3 El ensayo vía hospedero, en el que los microorganismos se introducen en un ratón (en el peritoneo o en la sangre), al que se administra la sustancia en estudio (Cortinas de Nava y col., 1980).

10.1.3.3.4 Activación de promutágenos por plantas verdes, que es el proceso por el cual los promutágenos son metabolizados en mutágenos por la activación de algunas enzimas presentes en plantas (Plewa y Gentile, 1976; Gentile y col., 1985; Valeminsky y Gichner, 1968; Valeminsky y Gichner, 1988; Seo y col., 1993; Plewa y Wagner, 1993; Gichner y col., 1994; Kanaya, 1996)

10.1.4 Pruebas en Cultivos de Células de Mamíferos

Se utilizan diferentes líneas celulares humanas, de hámster y de ratón, que al igual que los microorganismos, permiten obtener resultados en un tiempo relativamente corto, en experimentos controlados, y usar un gran número de células. Así mismo, constituyen un material adecuado para el estudio de las mutaciones génicas y de aberraciones cromosómicas, numéricas y estructurales (Gichner y Valeminsky, 1982; O'Neill, 1982; Lin y col., 1989; Potier y col., 1995; Kulling y Metzler, 1997).

10.1.5 Pruebas en Insectos

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, es el insecto más utilizado por el amplio conocimiento que se tiene de su genética y por ser un organismo que se reproduce en un plazo corto de tiempo, generando grandes poblaciones que requieren de un mantenimiento mínimo. Por todo eso, es el sistema animal más rápido para detectar mutaciones génicas (de tipo recesivo ligadas al sexo) y cromosómicas (segregación defectuosa y translocaciones) en células germinales (Gichner y Valeminsky, 1982; Vogel y col., 1983). Tiene además, la capacidad de metabolizar los compuestos en forma muy similar a los mamíferos y es susceptible de usarse como dosímetro biológico al igual que las plantas (Cortinas de Nava, y

col., 1980; Vogel, 1981; Kale y Baum, 1982; Watson, 1982; Salam y col., 1993).

10.1.6 Pruebas en Plantas.

Son muy útiles como dosímetros biológicos en el estudio del efecto de contaminantes ambientales, plaguicidas, herbicidas, fertilizantes químicos y cualquier sustancia distribuida en forma natural en el ambiente, lo cual es difícil hacer con otros sistemas de pruebas (Kihlman, 1971; Mohandas y Grant, 1972; Kihlman, 1975; Nauman y col., 1976; Nilan y Vig, 1976; Grant, 1978; Nauman y col., 1978; de Serres, 1978; Grant y col., 1981; Ma, 1981; Constantín y Owens, 1982; Degrassi y Rizzoni, 1982; Grant, 1982; Vant Hof y Schairer, 1982; Ma y col., 1983; Ma y col., 1984; Ma, 1990; Grant y col., 1992; de Serres, 1992; Ruiz y col., 1992; Grant, 1994; Ma y col., 1995; Gomez-Arroyo y col., 1997). Además no dejan de ser adecuadas para usarse en el laboratorio, debido a su bajo costo de mantenimiento y a los requisitos mínimos de cuidado en experimentos estrictamente controlados (Ma y col., 1983; Ma y col., 1984, Grant y Salamone, 1994).

Se ha descrito que las plantas metabolizan las sustancias en forma diferente de como lo hacen los mamíferos. La primera evidencia directa de la activación de promutágenos por plantas fue publicada por Plewa y Gentile (1976). Valeminsky y Gichner (1968, 1988) demostraron que *Arabidopsis thaliana* fue mutada por promutágenos de nitrosamina y sugirieron que las plantas tienen la capacidad enzimática para activar los promutágenos. Lhotka y colaboradores (1987) descubrieron que la metafenilendiamina -una anilaminano cíclica- era un potente promutágeno activado por plantas. Los promutágenos de anilamina pueden ser activados en mutágenos estables, de larga duración por el cultivo de células de plantas; estos productos activados por plantas son retenidos en membranas de ultrafiltración con un tamaño de exclusión de 300 kDa (Plewa y Wagner, 1993; Seo y col., 1993). La demostración de que las plantas pueden activar promutágenos en productos estables, de alto peso molecular traen a escena la preocupación de que las plantas pueden activar agentes ambientales en mutágenos que puedan ser introducidos en la cadena alimenticia humana (Gichner y col., 1994). Es muy

probable entonces que algunos compuestos que no tienen efecto directamente sobre los mamíferos, puedan verse convertidos en metabolitos activos por la acción de las plantas y constituir así un riesgo para los consumidores. La activación por plantas permite detectar esas sustancias (Plewa y Gentile, 1982; Takehisa y col., 1982; Gentile y col., 1985; Higashi, 1988; de Serres, 1992; Gichner y col., 1994; Kanaya, 1996).

Las plantas más usadas son la "hierva del pollo" *Tradescantia* (Sparrow y col., 1974; Gichner y col., 1982; Rodríguez, 1982; Vant' Hof y Schairer, 1982; Ma, 1982a; Gill y Shandu, 1991; Sadao, 1992; Ma y col., 1994a, 1994b; Ma y col., 1995), la cebolla común *Allium cepa* (Grant, 1982; Rodríguez, 1982; Escalza y col., 1983; Grant y col., 1992; Salam y col., 1993; Rank y Nielsen, 1997) el haba *Vicia faba* (Degrassi y Rizzoni, 1982; Gichner y Valemínský, 1982; Ma, 1982b; Tempelaar y col., 1982; Gómez-Arroyo y col., 1986; Xing y Zhang, 1990; Andersson y Kihlman, 1992; Grant y col., 1992; Salam y col., 1993; Kanaya y col., 1994; Gómez-Arroyo y col., 1997) y *Arabidopsis thaliana* (Rédei, 1982; Gichner y Valemínský, 1984), en las que se pueden valorar mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas Kihlman y Anderson, 1984; Andersson y Kihlman, 1992; Grant, 1994; Rank y Nielsen, 1997).

10.1.7 Pruebas en Mamíferos no Humanos

El ratón es el mamífero más estudiado desde el punto de vista genético, lo que favorece su empleo en la identificación de mutágenos. Se usa para valorar mutaciones génicas (en un sitio específico en el cromosoma) y aberraciones cromosómicas somáticas y germinales (con efectos dominantes letales o de tipo de translocaciones hereditarias); además es usado para evaluar mutaciones somáticas mediante la observación de micronúcleos e intercambio de cromáticas hermanas en médula ósea y sangre periférica (Schmid, 1975; Alving y col., 1976; Trzos y col., 1978; Obe y col., 1979; Dulout y col., 1982; Ländetie, 1983; Tates y col., 1983; Madrigal-Bujaidar y col., 1990; Madrigal-Bujaidar y col., 1991; Piña-Calva y Madrigal-Bujaidar, 1993; Salam y col., 1993). Estas pruebas, a diferencia de las anteriores, consumen más tiempo en su realización y análisis y, por lo tanto,

su costo es mayor.

Una técnica más reciente se basa en el análisis de los cambios morfológicos de los espermatozoides, posible manifestación de algunas alteraciones génicas (Wyrobek y Bruce, 1978; Gichner y Valeminský, 1982; Crocker, 1982; Paschin y col., 1982; Hugenholtz y Bruce, 1983; Tapia y col., 1992; Piña-Calva y col., 1997).

10.1.8 Pruebas en Humanos

Se realizan estos estudios, en general, en individuos expuestos en circunstancias médicas, ambientales, accidentes y excepcionalmente en condiciones experimentales (Alving y col., 1976; Knuutila y col., 1977; Waksvik y Boysen, 1982; Madrigal-Bujaidar y col., 1991). Sólo se cuenta en la actualidad con pruebas para identificar, en forma directa, lesiones cromosómicas numéricas y estructurales en células de la médula ósea o de linfocitos sanguíneos así como la presencia de más de un cromosoma y en los espermatozoides (Schmid, 1975; Alving y col., 1977; Obe y col., 1979; Gichner y Valeminský, 1982; Sorsa y col., 1982; Léonard y col., 1984; García-Sagredo, 1988; Andersson y Kihlman, 1989; Díaz-Barriga y col., 1993). El análisis cromosómico de las células germinales en meiosis, aún cuando técnicamente es posible, rara vez se realiza debido a la dificultad para obtener muestras del tejido de la gónada. Igualmente aquí es posible la determinación de anomalías morfológicas en los espermatozoides como un indicador de alteraciones reproductivas (Wyrobek y Bruce, 1978)

11. Prueba de Micronúcleos en *Tradescantia* (MCN-TRAD)

La prueba de micronúcleos en *Tradescantia* (MCN-TRAD) es un sistema muy bien probado para el monitoreo in situ de mutágenos gaseosos y radiación y como bioensayo para la determinación de toxicidad o clastogenicidad de contaminantes ambientales en estado líquido, fármacos y aditivos para alimentos (Ma, 1981; Ma, 1983; Ma y col., 1984; Ma, 1990; Ma y col., 1994; Ruiz y col., 1992). Los cortes de las inflorescencias de *Tradescantia*, las cuales contienen las células madres de polen, se pueden exponer a los mutágenos gaseosos o a la

su costo es mayor.

Una técnica más reciente se basa en el análisis de los cambios morfológicos de los espermatozoides, posible manifestación de algunas alteraciones génicas (Wyrobek y Bruce, 1978; Gichner y Valeminský, 1982; Crocker, 1982; Paschin y col., 1982; Hugenholtz y Bruce, 1983; Tapia y col., 1992; Piña-Calva y col., 1997).

10.1.8 Pruebas en Humanos

Se realizan estos estudios, en general, en individuos expuestos en circunstancias médicas, ambientales, accidentes y excepcionalmente en condiciones experimentales (Alving y col., 1976; Knuutila y col., 1977; Waksvik y Boysen, 1982; Madrigal-Bujaidar y col., 1991). Sólo se cuenta en la actualidad con pruebas para identificar, en forma directa, lesiones cromosómicas numéricas y estructurales en células de la médula ósea o de linfocitos sanguíneos así como la presencia de más de un cromosoma y en los espermatozoides (Schmid, 1975; Alving y col., 1977; Obe y col., 1979; Gichner y Valeminský, 1982; Sorsa y col., 1982; Léonard y col., 1984; García-Sagredo, 1988; Andersson y Kihlman, 1989; Díaz-Barriga y col., 1993). El análisis cromosómico de las células germinales en meiosis, aún cuando técnicamente es posible, rara vez se realiza debido a la dificultad para obtener muestras del tejido de la gónada. Igualmente aquí es posible la determinación de anomalías morfológicas en los espermatozoides como un indicador de alteraciones reproductivas (Wyrobek y Bruce, 1978)

11. Prueba de Micronúcleos en *Tradescantia* (MCN-TRAD)

La prueba de micronúcleos en *Tradescantia* (MCN-TRAD) es un sistema muy bien probado para el monitoreo in situ de mutágenos gaseosos y radiación y como bioensayo para la determinación de toxicidad o clastogenicidad de contaminantes ambientales en estado líquido, fármacos y aditivos para alimentos (Ma, 1981; Ma, 1983; Ma y col., 1984; Ma, 1990; Ma y col., 1994; Ruiz y col., 1992). Los cortes de las inflorescencias de *Tradescantia*, las cuales contienen las células madres de polen, se pueden exponer a los mutágenos gaseosos o a la

radiación, en los lugares seleccionados o en cámaras de tratamiento. Para probar líquidos, se deja que los cortes absorban los agentes a través del tallo por medio del cual son transportados a las células meióticas.

Cuatro mecanismos son reconocidos por los cuales los micronúcleos pueden generarse por los agentes químicos en la etapa de profase I: 1) por pérdida mitótica de fragmentos acéntricos, 2) una variedad de consecuencias mecánicas y rupturas cromosómicas y de intercambio como son cromosomas retardados, centrómero inactivado, puentes cromosómicos, cromosomas enredados (tangled); 3) pérdida mitótica de cromosomas enteros y 4) apoptosis y fagocitosis, que es una forma de destrucción nuclear en el cual el núcleo se desintegra y se forman fragmentos nucleares. La apoptosis ocurre tanto naturalmente y como una respuesta a daño celular inducido químicamente, daño el cual no necesariamente es genético en su naturaleza. La inhibición de síntesis de proteína es un ejemplo (Hedde y col., 1991). Los micronúcleos (MCN) inducidos se observaron en la etapa de tétrada y su frecuencia es un indicador confiable del daño a los cromosomas.

Esta prueba revela directamente la magnitud del daño al ADN en las células germinales de los eucariotes. Es relativamente simple, rápida versátil y eficiente y en sólo 24 a 48 horas se pueden obtener los resultados de efectos mutagénicos y clastogénicos. Es quizás la prueba más barata que se conoce actualmente (Ma, y col., 1980; Ma, 1983).

Este sistema fue establecido tomando en consideración que los cromosomas de la meiosis tienen una sensibilidad más alta que los de la mitosis (Ma, 1983) y con la ventaja de que en *Tradescantia* las células en cada una de las etapas de meiosis están sincronizadas y con tiempos perfectamente conocidos para cada uno de los botones de las flores. Es posible por lo tanto, tratar un gran número de células sincronizadas en su etapa más sensible (Profase I) y registrar el daño a los cromosomas después de un tiempo posterior al tratamiento por un simple conteo de MCN (0.5-3 μm de diámetro) en las tétradas (18-20 μm de diámetro) (Ma, 1983). Este bioensayo, se usó primeramente para estudiar el efecto clastogénico del 1,2 dibromoetano (Ma y col., 1978), estableciendo una curva dosis-efecto. La calidad de ésta prueba fue posteriormente verificada

estableciendo una curva dosis-efecto con rayos X y una sensibilidad diferencial (Ma, 1979). Después fue validada con mutágenos bien conocidos tales como: etilmetano-sulfonato, azida de sodio, ácido hidrozoico, ciclohexilamina e hidrazida maleico (Ma y Anderson, 1978). El monitoreo *in situ* de una serie de sitios contaminados y el análisis de una lista de agentes químicos, se llevó a cabo usando esta prueba, dada su versatilidad y eficiencia, obteniéndose resultados confiables (Ma y col., 1980). Se ha realizado también un estudio comparativo entre este sistema y el sistema de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos para probar la mutagenicidad de la hidrazida maleico (Ahmed y Ma, 1980), en donde los resultados del grado de daño genético en las células de plantas, se pudieron correlacionar con los resultados en células humanas.

En este bioensayo se utilizan generalmente las siguientes especies, variedades y clones de *Tradescantia*:

T. paludosa clon #02, #03;

T clon # 4430

T. virginiana.

El sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 se ha utilizado para evaluar la posible genotoxicidad de bebidas comunes así como de diversas sustancias químicas y físicas (Ma y col., 1984; Ma y col., 1985; Cebutka-Wasilewsa, 1992; Ma y col., 1995) en fármacos (Ma y col., 1984; Ruíz y Ma, 1991; Juárez, 1999), aguas residuales (Ruíz y col., 1992), aditivos y colorantes sintéticos presentes en jugos, dulces y refrescos (Rojas, 1992; Gómez, 1994; Martínez y Velázquez, 1995) y contaminación atmosférica (Ruíz y Rea, 1995).

Los resultados obtenidos en estas diversas investigaciones, han confirmado que el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* es un sistema altamente sensible a los agentes que causan daño al material genético.

11.1. Meiosis en *Tradescantia*

Se han estudiado las distintas fases del ciclo meiótico de *Tradescantia*, determinándose los tiempos que permanecen las células en cada estadio desde la

Profase I (leptoteno, cigoteno, paquíteno, diploteno y diacinesis), con un tiempo total de 64-68 horas, continuando hasta la fase de tétradas con 41-55 horas, siendo estas las etapas de mayor importancia para el sistema de MCN-TRAD (Ma, 1983).

Durante el proceso del ciclo celular meiótico, se llevan a cabo dos divisiones sucesivas que se realizan en varias etapas (López y col., 1986; Alexander, 1992; Curtis y Barnes, 1994), las cuales se muestran en la Fig. 8.

Primera División Meiótica:

Profase I

a) Leptoteno (Leptos:delgado)

Es la primera fase de la meiosis la cual es la de mayor duración y consta de cinco estadios. Durante este periodo, los cromosomas se observan como cuerpos nucleares en forma de hilos largos y delgados con un eje central de proteína. Cada cromosoma se une por sus extremos a la envoltura nuclear por medio de estructuras especializadas llamadas placas de adhesión. Aunque cada cromosoma replicado consta de dos cromátides, éstas se colocan en estrecha oposición y cada cromosoma parece tener solo una cromátide.

b) Cigoteno (zygos:pareado)

Se inicia tan pronto como se lleva a cabo la sinapsis o apareo entre cromosomas homólogos. Este apareamiento consiste en un confrontamiento a lo largo de los cromosomas, durante el cual los cromosomas homólogos se alinean de tal manera que se piensa que cada gen se pone en contacto con su homólogo en el cromosoma opuesto. A semejanza del par homólogo, los ejes proteínicos a lo largo del cromosoma se confrontan para formar los dos elementos laterales o lados de la estructura llamado complejo sinaptonémico. Este par de cromosomas resultante se llama bivalente.

c) Paquiteno (pachys: grueso).

Comienza cuando la sinapsis se completa a lo largo de todos los cromosomas, en el que puede permanecer varios días. Durante esta etapa y a grandes intervalos, aparecen los nódulos de recombinación a lo largo del complejo sinaptonémico. Se piensa que estos nódulos son los que median los recambios cromosomales, los cuales dan por resultado el entrecruzamiento entre dos cromátides de cada par de cromosomas homólogos apareados. Después, cada punto de entrecruzamiento aparece como un quiasma, que representa la unión entre cromátides.

d) Diploteno (diplotos: doble)

Inicia con la disolución del complejo sinaptonémico, y la subsecuente separación de los pares de cromosomas homólogos, pero cada par bivalente queda unido por uno o más quiasmas, que representan los puntos en donde se ha llevado a cabo el entrecruzamiento. En esta etapa los cromosomas se descondensan y sintetizan ARN para proporcionar los materiales a ser almacenados en el huevo.

e) Diacinesis (diá:a través; kinesis: poner en movimiento).

Es la etapa de transición a la metafase I y comienza imperceptiblemente. Aquí cesa la síntesis de ARN y los cromosomas se condensan, engruesan y se desprenden de la envoltura nuclear. Entonces se ve que cada bivalente está compuesto por cuatro cromátides separadas: las cromátides hermanas unidas por su centrómero y las cromátides no hermanas que han llevado a cabo entrecruzamientos, unidas por quiasmas.

Metafase I

Los miembros de los bivalentes están fuertemente condensados y distribuidos en lados opuestos de la placa ecuatorial, con cada centrómero conectado a las fibras del huso. Los quiasmas se han movido hacia los extremos de los cromosomas en un proceso denominado terminalización.

Anafase I

Cada miembro de un par de cromosomas homólogos se mueve hacia los polos opuestos. Los centrómeros todavía no se han dividido, por lo que cada cromosoma aún consiste en dos cromátidas (una díada).

Telofase I

Ocurre cuando los cromosomas alcanzan los polos opuestos. Esto va a menudo acompañado por la formación de la membrana nuclear alrededor de cada complemento cromosómico haploide, seguida de una breve interfase y las células pasan inmediatamente a la segunda división meiótica.

Segunda División Meiótica:

Profase II

Aquí, las díadas se condensan y se mueven hacia la región ecuatorial. La membrana nuclear y el nucléolo se rompen y aparecen nuevas fibras del huso. Los cromosomas se acortan y se hacen visibles. Cada cromosoma se compone de dos cromátidas unidas por un centrómero.

Metafase II

Las cromátidas, todavía unidas por el centrómero, se mueven hacia el ecuador de la célula. La fibra del huso se asocia una vez más con los cinetocoros y desde los polos se extienden otras fibras del huso.

Anafase II

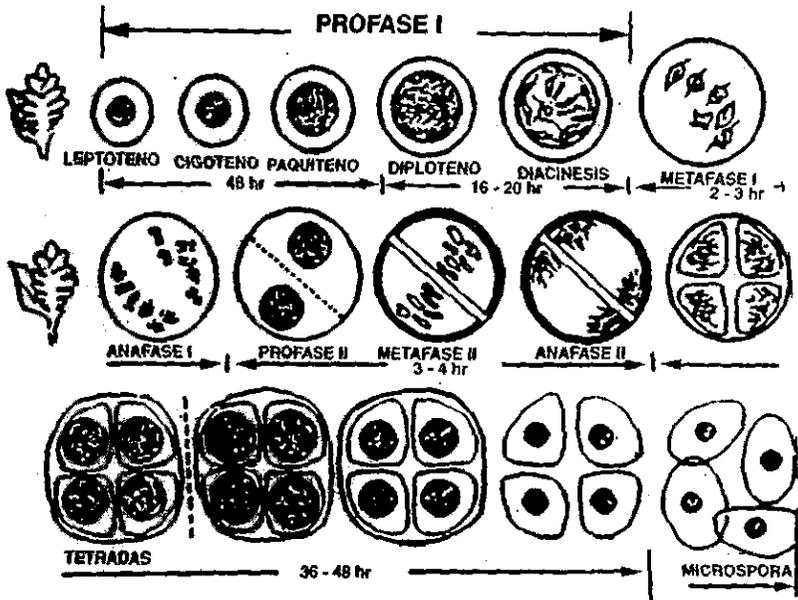
La división de los centrómeros separa las cromátidas. Una cromátida de cada cromosoma se mueve hacia un polo de la célula, la otra cromátida se mueve

hacia el polo opuesto.

Telofase II

El citoplasma se divide (citocinesis) y se forma la pared celular que divide el citoplasma y las células haploides se empiezan a diferenciarse en microsporas. Los microtúbulos del huso desaparecen y se forma una envoltura nuclear alrededor de cada conjunto de cromosomas y se forman cuatro núcleos (tétradas) o cuatro células hijas.

Fig. 8. Meiosis en *Tradescantia*.



Etapas de la meiosis en *Tradescantia*. Cada una de las etapas se encuentra perfectamente estudiada y con tiempos bien conocidos, lo que permite establecer tiempos de tratamiento y recuperación adecuados (Ma, 1963).

II. JUSTIFICACION

En el desarrollo de los fármacos existe la búsqueda del mejor y más útil medicamento para el tratamiento de diversas enfermedades. La epilepsia ha sido uno de los grandes problemas de la humanidad, tanto por su alta prevalencia e incidencia como por sus consecuencias médicas y sociales.

Es así que existe en nuestro país la preocupación por buscar nuevos fármacos anticonvulsivos. El Laboratorio de Quimioterapia Experimental, Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN sintetizó el 4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (HEPB) y sus dos homólogos inferiores (HEPA y HEPP) a los que una vez comprobada su actividad farmacológica deben someterse a estudios toxicológicos a corto plazo, entre estos estudios se encuentran los de genotoxicidad que son recomendados para fármacos y sustancias susceptibles de producir toxicidad sistémica.

El presente estudio tiene como objetivo investigar el posible efecto genotóxico mediante una curva dosis-efecto con el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 el cual ha demostrado una alta sensibilidad, eficiencia y confiabilidad para este tipo de estudio.

III. HIPOTESIS

Ho: Los fármacos (HEPB, HEPP, HEPA) no tienen efecto clastogénico sobre las células meióticas de *Tradescantia*.

Ha: Los fármacos (HEPB, HEPP, HEPA) tienen efecto clastogénico sobre las células meióticas de *Tradescantia*.

II. JUSTIFICACION

En el desarrollo de los fármacos existe la búsqueda del mejor y más útil medicamento para el tratamiento de diversas enfermedades. La epilepsia ha sido uno de los grandes problemas de la humanidad, tanto por su alta prevalencia e incidencia como por sus consecuencias médicas y sociales.

Es así que existe en nuestro país la preocupación por buscar nuevos fármacos anticonvulsivos. El Laboratorio de Quimioterapia Experimental, Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN sintetizó el 4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (HEPB) y sus dos homólogos inferiores (HEPA y HEPP) a los que una vez comprobada su actividad farmacológica deben someterse a estudios toxicológicos a corto plazo, entre estos estudios se encuentran los de genotoxicidad que son recomendados para fármacos y sustancias susceptibles de producir toxicidad sistémica.

El presente estudio tiene como objetivo investigar el posible efecto genotóxico mediante una curva dosis-efecto con el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 el cual ha demostrado una alta sensibilidad, eficiencia y confiabilidad para este tipo de estudio.

III. HIPOTESIS

Ho: Los fármacos (HEPB, HEPP, HEPA) no tienen efecto clastogénico sobre las células meióticas de *Tradescantia*.

Ha: Los fármacos (HEPB, HEPP, HEPA) tienen efecto clastogénico sobre las células meióticas de *Tradescantia*.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo General:

Evaluar mediante la prueba de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* la posible genotoxicidad de 3 nuevos fármacos antiepilépticos el DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (DL-HEPB) y sus homólogos inferiores el DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenilpropionamida (DL-HEPP) y el DL-2-hidroxi, 2-etil, 2-fenilacetamida (DL-HEPA).

B. Objetivos Particulares:

1. Evaluar el posible efecto clastogénico del fármaco anticonvulsivo DL-HEPB y sus homólogos inferiores DL-HEPP y DL-HEPA en los cromosomas de *Tradescantia* Clon 4430.
2. Determinar las concentraciones de los fármacos a las cuales se observa un efecto clastogénico mayor y menor de micronúcleos (MCN) en las células meióticas de *Tradescantia*.
3. Realizar las curvas dosis-efecto de la frecuencia de micronúcleos encontrados para cada uno de los fármacos antiepilépticos: DL-HEPB, DL-HEPP y DL-HEPA.
4. Valorar la posible citotoxicidad que estos nuevos fármacos anticonvulsivos puedan provocar en las células madre del polen de *Tradescantia* Clon 4430.

V. MATERIALES Y METODOS

Los fármacos anticonvulsivos utilizados se obtuvieron del Laboratorio de Toxicología Sección Graduados de la ENCB-IPN con una pureza del 99.5% para el DL-HEPB, del 99.9% para DL-HEPP y de 99.7% para el DL-HEPA (Meza-Toledo y col., 1990). Este estudio forma parte del Programa de Seguridad Preclínica desarrollado para conocer la inocuidad de los fármacos investigando el aspecto toxicológico de estos compuestos mediante la Prueba de Micronúcleos en Células Meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 (MCN-TRAD).

A. Preparación de las soluciones de los fármacos.

Las condiciones de solubilidad de los fármacos DL-HEPB, DL-HEPP y DL-HEPA se establecieron previamente, las soluciones se realizan preferentemente el mismo día previo a la experimentación (aunque se encontró que no influía el prepararlas un día antes); una vez pesada la cantidad de fármaco a probar, se deposita directamente en los vasos de precipitados que se utilizarán para los tratamientos. En ellos se maceraron perfectamente con una varilla de vidrio los fármacos, se adiciona paulatinamente agua destilada con pipetas volumétricas y se procedió a disolverlos por agitación con un magneto por espacio de 2 horas para DL-HEPA y 15 minutos para DL-HEPP y DL-DL-HEPB. Durante este tiempo de agitación se calentaron ligeramente en un plato caliente a no más de 37°, para favorecer la solubilidad.

Las concentraciones de estudio para el fármaco DL-HEPB fueron de 1, 5, 7 y 10 mg/ml; para DL-HEPP de 1, 3, 5, 7 y 10 mg/ml y para DL-HEPA de 1, 5, 7 y 10 mg/ml, estos fueron designados en base a la concentración terapéutica recomendada para humanos de 800 mg/Kg. de peso diarios (10mg/ml).

B. Ensayo Biológico.

1.- Cultivo del Material Biológico.

El Clon 4430 de *Tradescantia* es un híbrido interespecífico de *T. subcalis* y *T. hirsutiflora*. Su número cromosómico es bajo ($2n=12$). Perteneció a la familia de las Comelináceas, es herbácea con hojas estrechas que rematan en punta, las inflorescencias localizadas en la parte terminal de la rama, están formadas por aproximadamente 16 yemas que contienen células en diferentes fases de desarrollo meiótico. Sus flores están formadas por 3 pétalos azules, 3 sépalos y 6 estambres (Fig. 9). Se propagaron por reproducción vegetativa; florece todos los días por un lapso de 5 meses; cuando las flores se abrieron se retiraron diariamente (Ma, 1983).

Fig. 9. Planta Completa de *Tradescantia* Clon 4430.



Se muestra la planta completa con tallo, hojas, inflorescencias y flores.

Las plantas de *Tradescantia* se cultivaron en un invernadero apropiado con

las condiciones óptimas de humedad relativa de 60-80%, temperatura de 21-26°C durante el día y 16°C durante la noche, y un fotoperíodo de 1800 ft-candelas de luz fluorescente y 180 ft-candelas de luz incandescente con lo que se mantuvo en el invernadero 17 horas de luz. Para su desarrollo se plantaron en una mezcla de arena-tierra de hoja en una proporción de 1:3, se regaron diariamente o cuando así lo requirieron, se fertilizaron cada 30 días con una mezcla sólida de NPK en una proporción de 5:10:5 y micronutrientes (boro 0.01%, cobalto 0.014%, cobre 0.60% manganeso 1.20%, molibdeno 0.025%). Las macetas se agruparon en lotes y se marcaron e identificaron perfectamente cada una de ellas, con el propósito de evaluar su mutación espontánea y las plantas que presentaron un porcentaje de micronúcleos mayor al rango establecido (0.66-2.33 MCN/100 tétradas, Ruiz y Guerrero, 1994) se eliminaron. Las plantas utilizadas en los experimentos se tomaron al azar, es decir, se cortaron las inflorescencias que estaban en la etapa adecuada antes de la maduración del primer botón que abrirá en flor.

2. Ensayo para Tratamientos con Fármacos.

El método usado fue el descrito por Ma y colaboradores (1983) para clastógenos ambientales. Se seleccionaron las inflorescencias jóvenes de *Tradescantia* Clon 4430 con tallos de aproximadamente 10 cm de largo y libres de algunas hojas, debido a que inflorescencias con tallos largos y con hojas tienen mayor capacidad de absorción de agentes líquidos. Estos tallos se sumergieron en las soluciones de estudio en vasos de precipitados y tapados con papel aluminio perforado para la introducción de las inflorescencias. El tratamiento fue de 6 horas y únicamente el fármaco DL-HEPA se mantuvo con agitación constante. El grupo experimental se formó por el control negativo (agua destilada), control positivo (etil metano sulfonato 200 mM) y el fármaco de estudio. Durante la experimentación, los tratamientos se mantuvieron en el invernadero.

Una vez concluido el tiempo de tratamiento, los tallos se lavaron perfectamente a chorro de agua y se dejaron en agua destilada por 24 horas tiempo en el cual, las células de *Tradescantia* que fueron dañadas en sus

cromosomas continúan su ciclo meiótico hasta la etapa de tétradas tempranas, fase en la cual el daño cromosómico se registró y evaluó como la frecuencia de micronúcleos. El ciclo meiótico se detuvo cortando las inflorescencias y sumergiéndolas en una solución de etanol-ácido acético 3:1 por 24 horas. Posteriormente se lavaron las inflorescencias en agua corriente y se colocaron en etanol al 70% para su conservación y se almacenaron en refrigeración hasta su lectura.

3. Obtención de las Preparaciones.

El procedimiento para el montaje de las preparaciones está basado en el método de aplastamiento (squash) de la acetocarmina para cromosomas de planta (Snow, 1963; Radford y col, 1974; Ma, 1983). De cada una de las inflorescencias que se almacenaron en la solución de etanol se seleccionó la yema adecuada es decir la que contenía células meióticas en la etapa de tétradas tempranas (regularmente cada inflorescencia contiene solo un botón útil, e incluso puede no contener ninguno). La etapa de tétradas en *Tradescantia* es relativamente larga, y puede ser dividida en tres subetapas: tétradas tempranas, tétradas medias y tétradas tardías; son sólo las primeras las que nos interesan, dado que es la etapa que asegura la más alta visibilidad de los micronúcleos, de acuerdo al tiempo meiótico de 24 horas.

Para la localización de la yema útil se procedió primeramente disectando el botón floral con ayuda de pinzas, para posteriormente exponer sus anteras con auxilio de agujas de disección. Las yemas contienen en su interior las células madres del polen a las cuales se les agregó una gota de acetocarmin (se mezcló un gramo de carmin en 45 ml de ácido acético y 55 ml de agua destilada; hirviendo durante 5 minutos a reflujo y filtrado una vez que se ha enfriado).

En un microscopio de disección se rompen las anteras, se extienden las células sobre el colorante y se retiran todos los restos de tejidos vegetales para que la preparación quede limpia. Se colocó el cubreobjeto, se calentó a 80°C sobre un plato caliente y se oprimió ligeramente (squash). Cada preparación se

marcó con la clave del grupo experimental a la que perteneció. Una vez obtenida la preparación, ésta se guardó en refrigeración con el objeto de mantener las preparaciones frescas, para su conteo y registro de células normales y las que contenían micronúcleos.

4. Observación y Registro de Micronúcleos.

El conteo y registro de micronúcleos se efectuó entre 2 y 3 horas posteriores al montaje de las preparaciones, usando un microscopio óptico con un objetivo de 10 aumentos para identificación y luego el de 40 aumentos, haciendo un barrido de la preparación en forma de zig-zag. Se contaron 300 células por preparación y se registraron las tétradas normales y aquéllas con 1, 2, 3 ó más micronúcleos. Se reportó la frecuencia de micronúcleos por 100 tétradas de *Tradescantia* Clon 4430.

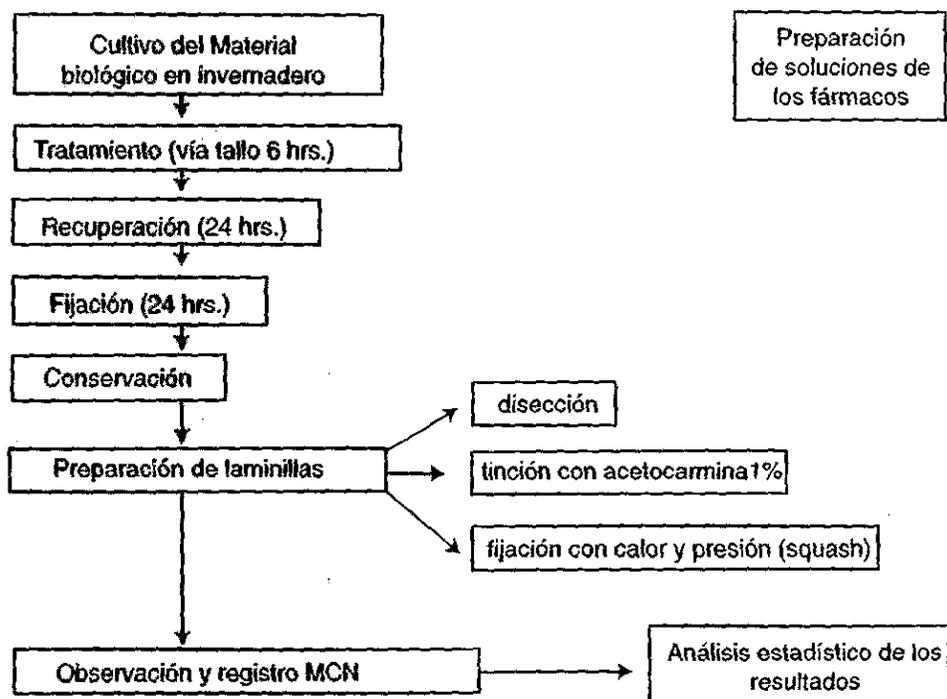
La identificación y el conteo de micronúcleos están basados en tres criterios específicos que incluyen: morfología, citoquímica y orientación dentro de la célula. El criterio morfológico es la textura que debe ser comparable a la de los núcleos principales, la forma de redonda a oval, con bordes bien definidos, el diámetro del micronúcleo no debe ser mayor a 1/3 del diámetro de los núcleos principales. El criterio citoquímico consiste en una reacción positiva a la tinción con acetocarmín. En cuanto a su orientación en la célula, los micronúcleos deben localizarse dentro del citoplasma y en el mismo plano focal que los núcleos principales, pero deben estar bien determinados y separados físicamente de los mismos (Livingston y col., 1990; Ren y col., 1991).

5. Análisis Estadístico

La muestra poblacional se constituyó de 300 tétradas por cada preparación, 5 por experimento. Se obtuvo la media y su desviación estándar. El grado de significancia de la diferencia entre el grupo control y del tratamiento se evaluó usando la prueba de "t-Student", con un nivel de significancia de 0.05%. Con los datos obtenidos del efecto genotóxico se aplicó un análisis estadístico de regresión lineal con la finalidad de conocer la probabilidad de inducción de MCN provocada por cada uno de los fármacos (Wayne, 1977; Mendenhall y Sincich, 1997).

Un diagrama de la metodología de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia*, el cual fue utilizado en esta investigación se muestra en la figura 10.

Fig . 10 Diagrama de flujo de la Metodología de MCN-TRAD.



VI. RESULTADOS

La Tabla IV, muestra la media y su desviación estándar del porcentaje de la frecuencia de micronúcleos (MCN) inducidos por el fármaco anticonvulsivo DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (DL-HEPB) en las células meióticas de *Tradescantia* a las concentraciones de 1, 5, 7, 10 mg/ml así como la de su respectivo control negativo (agua destilada) para cada concentración. Los resultados representan 5 preparaciones correspondientes a inflorescencias diferentes y sus repeticiones. La valoración estadística de los datos muestra que sólo existen diferencias estadísticas hasta la concentración de 7 mg/ml del DL-HEPB.

En la figura 11, se muestra la curva dosis-efecto del fármaco DL-HEPB en donde se observó que a la concentración de 7 mg/ml se induce la mayor frecuencia de micronúcleos para producir daño genotóxico sobre las células meióticas de *Tradescantia* y a concentraciones mayores la curva presenta un decremento en los MCN encontrados manifestándose daño citotóxico.

La Tabla V, muestra los eventos encontrados por la citotoxicidad provocada por el fármaco DL-HEPB. A la concentración de 10 mg/ml se observó un porcentaje de 13.52% de células no teñidas, indicativo de muerte celular y retraso celular de las células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430.

En la figura 12 se puede observar la fotografía que muestra algunos ejemplos de estos eventos citotóxicos en las células meióticas de *Tradescantia* en etapa de tétrada con células normales y células muertas.

TABLA IV. Frecuencia de Micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 inducidas por el fármaco DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (DL-HEPB).

CONCENTRACION mg/ml	MNC/100 Células Meióticas	
	CONTROL NEGATIVO Agua Destilada	HEPB $\bar{x} \pm D.E.$
1	1.59 \pm 0.55	2.57 \pm 1.07*
5	1.66 \pm 0.52	2.81 \pm 0.83*
7	0.92 \pm 0.43	3.08 \pm 0.88*
10	1.26 \pm 0.43	2.08 \pm 0.78 a

Cada dato es el promedio de 5 lecturas correspondientes cada una a 300 células.

a: Se observan signos de toxicidad.

* $P < 0.05$ con "t" de Student.

Fig. 11 Curva dosis-efecto en células meióticas de *Tradescantia* para el DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (DL-HEPB)

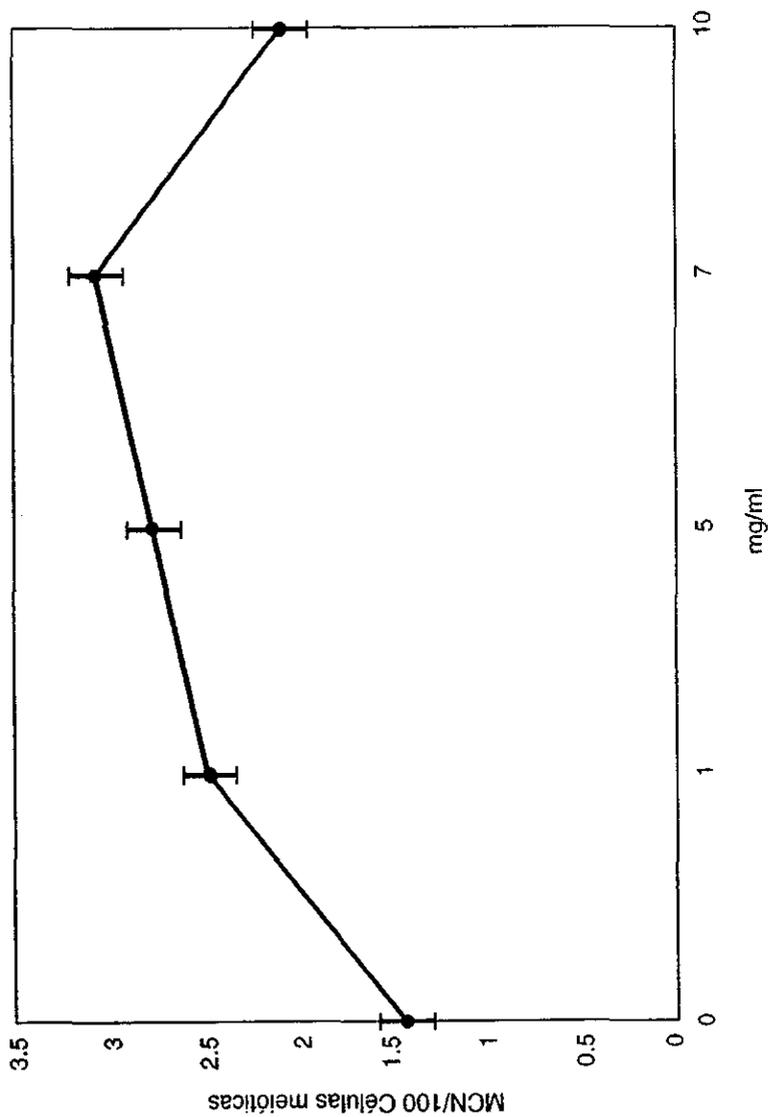


TABLA V. Citotoxicidad inducida por el fármaco DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (DL-HEPB) a la concentración de 10mg/ml. en células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430.

Alteraciones de Toxicidad	% de Alteraciones en 4500 células ^a
<p>Tétradas con núcleos polimórficos:</p> <p>Tétradas con núcleo alargado</p>	0.022
<p>Tétradas no teñidas (células muertas)</p>	13.52
<p>Células en Profase II no teñidas (células muertas)</p>	2.48

82.17% Tétradas normales

1.64% Tétradas que presentan 1 ó mas micronúcleos

a: El dato es obtenido de 15 inflorescencias diferentes contando 300 células en cada una.

Fig. 12. Fotografía de Células Meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 que muestra los efectos citotóxicos provocados por el fármaco, DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (DL-HEPB) a la concentración de 10mg/ml.



La fotografía muestra tétradas y diadas no teñidas, muertas (a) así como tétradas normales (b) Aumento 40 x.

ESTI TERS NO DUNE
SALUD DE LA COMUNITAT

Los resultados de la frecuencia de micronúcleos inducidos por el homólogo DL- 3-hidroxi, 3-etil, 3-fenilpropionamida (DL-HEPP) se muestran en la **Tabla VI**, las concentraciones estudiadas fueron de 1, 3, 5, 7, y 10 mg/ml, se muestra la media y desviación estándar del control negativo (agua destilada) y del fármaco, en donde, se observó un incremento de MCN desde la primera concentración hasta un máximo a la concentración de 3 mg/ml y disminuyendo a las concentraciones de 5, 7 y 10 mg/ml con respecto a su control. Estos resultados se valoraron mediante la prueba *t-Student* con un nivel de significancia del 5 por ciento y una $t=2.306$, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa del fármaco DL-HEPP desde la primera concentración de 1 mg/ml hasta la concentración de 7mg/ml con respecto al control negativo.

La **figura 13**, muestra la curva dosis-efecto para el fármaco DL-HEPP en donde a la concentración de 3 mg/ml presenta el mayor daño genotóxico, y a las concentraciones de 5, 7, y 10 mg/ml hay un decremento originado por citotoxicidad la cual se evaluó a la concentración de 10 mg/ml y los datos obtenidos se presentan en la **Tabla VII** de citotoxicidad inducida por el fármaco DL-HEPP encontrándose en mayor porcentaje células en profase y anafase II. La fotografía de la **figura 14** muestra este evento citotóxico de las células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 donde se observan células en estas etapas así como puentes.

TABLA VI. Frecuencia de Micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 inducidas por el control negativo y el fármaco DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenilpropionamida (DL-HEPP).

CONCENTRACION mg/ml	MNC/100 TETRADAS	
	CONTROL NEGATIVO Agua Destilada	HEPP $\bar{x} \pm D.E.$
1	1.59 \pm 0.55	2.57 \pm 0.74*
3	2.79 \pm 0.95	5.21 \pm 1.12*
5	1.66 \pm 0.62	3.39 \pm 1.32*
7	1.66 \pm 0.62	2.84 \pm 1.65*
10	1.26 \pm 0.43	2.35 \pm 0.66 a*

Cada dato es el promedio de 5 lecturas correspondientes cada una a 300 células.
a: Se observan signos de toxicidad.

* $P < 0.05$ con "t" de Student.

Fig. 13 Curva dosis-efecto en células meióticas de *Tradescantia* para el DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenilpropionamida (DL-HEPP)

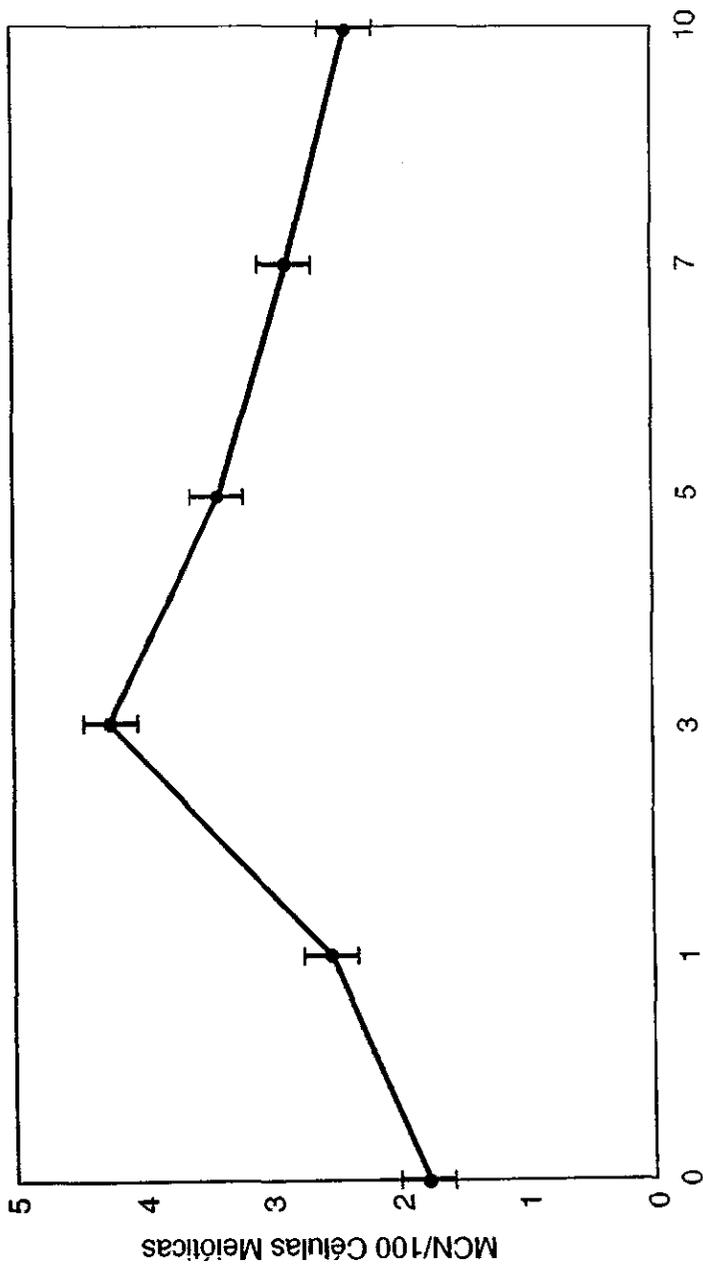


TABLA VII. Citotoxicidad inducida por el fármaco DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenilpropionamida (DL-HEPP) a la concentración de 10mg/ml. en células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430.

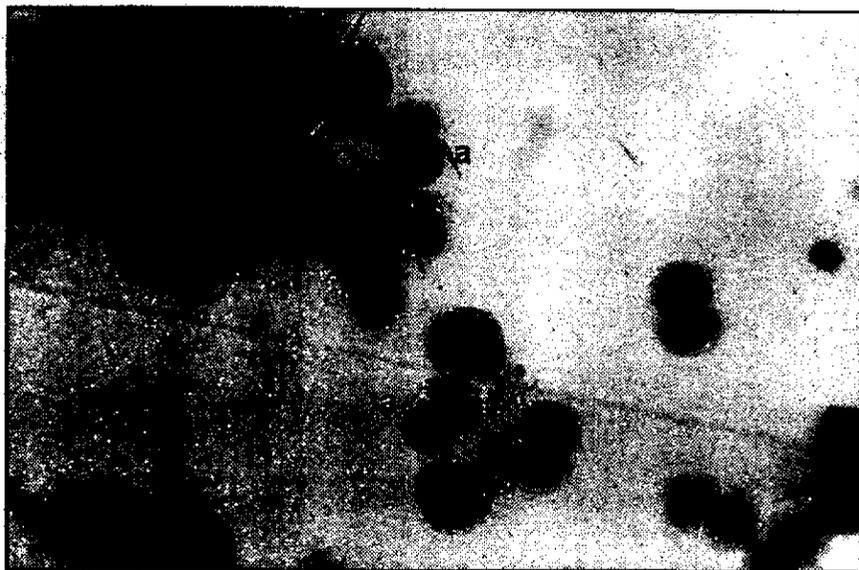
Alteraciones de Toxicidad	% de Alteraciones en 4500 células ^a
<p>Tétradas con núcleos polimórficos:</p> <p>Tétradas con núcleos segmentados</p> <p>Tétradas con proyecciones en los núcleos</p> <p>Tétradas con núcleo alargado</p>	0.13
Células en Profase II	2.16
Células en Anafase II	5.6
Células en Anafase II con puente	0.089

90.11% Tétradas normales

2.04% Tétradas que presentan 1 ó mas micronúcleos

a: El dato es obtenido de 15 inflorescencias diferentes contando 300 células en cada una.

Fig. 14. Fotografía de Células Meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 que muestra los efectos citotóxicos provocados por el fármaco, DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenilpropioamida (DL-HEPP) a la concentración de 10mg/ml.



La fotografía muestra células en profase II y anafase II con puentes (a).
Aumento 40 x.

La Tabla VIII, muestra, los resultados obtenidos de la frecuencia de MCN inducidos por el DL-2-hidroxi, 2-etil, 2-fenilacetamida (DL-HEPA), las concentraciones probadas fueron 1, 5, 7 y 10 mg/ml. El análisis estadístico mediante la prueba "t-Student" con un nivel de significancia del 5% y una $t=2.306$, mostró que los valores estadísticamente significativos para este fármaco se obtuvieron a las concentraciones de 5 y 7 mg/ml, así mismo se observó que la concentración de 7 mg/ml fue la que indujo un máximo de MCN en las tétradas de *Tradescantia* Clon 4430.

La figura 15 muestra la curva dosis-efecto del fármaco anticonvulsivo DL-HEPA en donde se observó que el mayor efecto genotóxico producido por este agente fue la concentración de 7 mg/ml la cual decrece hasta la concentración de 10mg/ml. En la Tabla IX se muestran los efectos citotóxicos generados por este fármaco (DL-HEPA) a la concentración de 10 mg/ml y fue el evento con mayor porcentaje que se observó en las células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430, se manifestó como retraso celular del ciclo de las células madres del polen, como se puede observar en la fotografía de la figura 16.

TABLA VIII. Frecuencia de Micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 inducidas por el control negativo y el fármaco DL-2-hidroxi, 2-etil, 2-fenilacetamida (DL-HEPA).

CONCENTRACION mg/ml	MNC/100 Células Meióticas	
	CONTROL NEGATIVO Agua Destilada	HEPA $\bar{x} \pm D.E.$
1	1.66 \pm 0.52	2.06 \pm 0.52
5	1.66 \pm 0.52	2.37 \pm 0.95*
7	1.19 \pm 0.56	4.95 \pm 0.94*
10	1.52 \pm 0.60	2.13 \pm 0.78a

Cada dato es el promedio de 5 lecturas correspondientes cada una a 300 células.

a: Se observan signos de toxicidad.

* $P < 0.05$ con "t" de Student.

Fig. 15 Curva dosis-efecto en células meióticas de *Tradescantia* para el DL-2-hidroxi, 2-etil, 2-fenilacetamida (DL-HEPA)

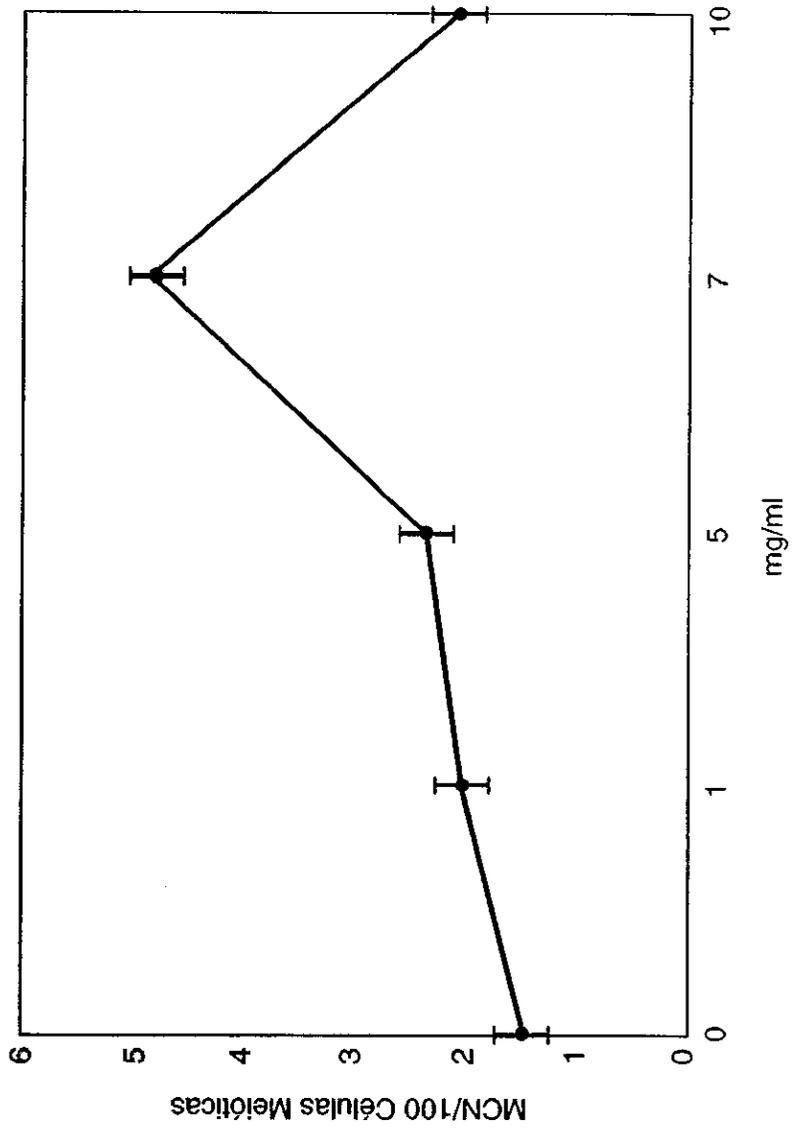


TABLA IX Citotoxicidad inducida por el fármaco DL-2-hidroxi, 2-etil, 2-fenilpropionamida (DL-HEPA) a la concentración de 10mg/ml. en células meióticas de *Tradescantia Clon 4420*.

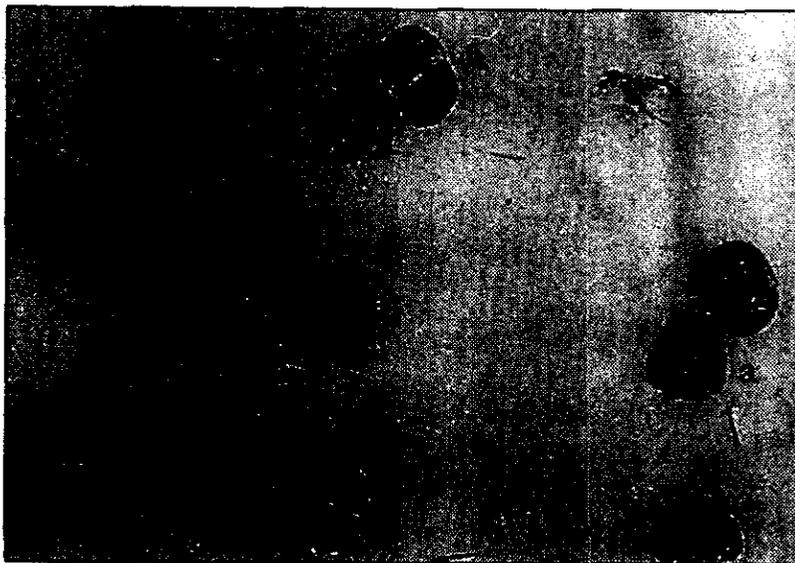
Alteraciones de Toxicidad	% de Alteraciones en 4500 células ^a
Tétradas con núcleos polimórficos: Tétradas con núcleo alargado Tétradas binucleadas	0.13
Células en Profase I	0.31
Células en Metafase I	0.56
Células en Anafase I	1.2
Células en Profase II	4.49
Células en Metafase II	0.33
Células en Anafase II	0.24
Células en Telofase II	4.07

86.84% Tétradas normales

1.4% Tétradas que presentan 1 ó mas micronúcleos

a: El dato es obtenido de 15 inflorescencias diferentes contando 300 células en cada una.

Fig. 16. Fotografía de Células Meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 que muestra los efectos citotóxicos provocados por el fármaco, DL-2-hidroxi, 2-etil, 2-fenilacetamida (DL-HEPA) a la concentración de 10mg/ml.



La fotografía muestra células de *Tradescantia* en etapas de primera (a) y segunda división (b) meiótica, manifestandose un marcado retraso celular provocado por el fármaco. Aumento 40 x.

La **Tabla X** contiene los datos de la genotoxicidad inducida por el control positivo etil-metano-sulfonato a la concentración de 200 mM en las células meióticas de *Tradescantia*.

En la **tabla XI** se muestran las ecuaciones que rigen el efecto genotóxico producido por cada uno de los fármacos anticonvulsivos estudiados el DL-HEPB y sus dos homólogos inferiores DL-HEPP y DL-HEPA, así como el coeficiente de determinación resultante, el cual es un indicativo de la probabilidad de que el efecto genotóxico fue inducido por los fármacos a las concentraciones correspondientes, es decir para el DL-HEPB y DL-HEPA fue de 7 mg/ml y para el DL-HEPP de 3 mg/ml.

TABLA X. Frecuencia de Micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 inducidas por el control negativo (agua destilada) y el control positivo (etil, metano, sulfonato, 200 mM).

MNC/100 Células Meióticas		
CONTROL NEGATIVO Agua Destilada	CONTROL POSITIVO (Etil, metano, sulfonato 200mM)	$t_{0.05}=2.306$
0.92 ± 0.43	3.5 ± 0.89	*
1.59 ± 0.55	3.9 ± 1.61	*
1.19 ± 0.56	4.1 ± 1.72	*

* Indica significativo (t^2 de Student).

TABLA XI. Ecuaciones que rigen el efecto genotóxico de los fármacos anticonvulsivos HEPB y sus dos homólogos inferiores HEPP y HEPA.

FARMACO	ECUACION $y = a + bx$	COEFICIENTE DE DETERMINACION %
HEPB	$y = 1.8 + 0.19x$	75.85
HEPP	$y = 1.76 + 1.17x$	96.82
HEPA	$y = 1.41 + 0.4x$	75.79

VII DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados de los estudios realizados en modelos de epilepsia han probado satisfactoriamente la hipótesis que sostiene que la alteración de la función sináptica del principal neurotransmisor inhibitorio GABA, es la causa primordial de la epilepsia humana.

Para establecer racionalmente la terapia específica a cada tipo de epilepsia es altamente conveniente conocer su patología neuroquímica y el mecanismo de acción molecular de cada compuesto antiepiléptico. Se ha establecido que los principales sistemas de neurotransmisión que se alteran en la epilepsia son: decremento del GABAérgico o activación del Sistema del ácido glutámico-Nmetil, D-aspartico (NMDA-G) y por ende modificación de la homeostásis iónica neuronal, sobre todo de Ca^{++} y Na^{+} .

Al analizar su mecanismo de acción, se ha encontrado que los compuestos antiepilépticos se pueden clasificar en relación a su utilidad terapéutica y de acuerdo con la alteración de los canales iónicos, así: los anticonvulsivos efectivos en crisis generalizadas tónico clónicas o parciales son bloqueadores de canales inactivos de Na^{+} y los que sirven para el tratamiento de la epilepsia tipo ausencias inhiben los canales de Ca^{++} .

Los antiepilépticos de reciente incorporación a la terapia humana como el Vigatrim y el Progabide son producto de síntesis dirigida para actuar como análogo del GABA y para inhibir específicamente la GABA-T (GABA-transaminasa) correspondiente. Lo mismo puede decirse para numerosos fármacos antiepilépticos que en el presente están en estudio preclínico, como la serie de antagonistas del sistema NMDA-G.

Puesto que las crisis epilépticas terminan aún sin terapia, se ha planteado la existencia de un neuromodulador inhibitorio, es decir un antiepiléptico endógeno, presente normalmente en el sistema nervioso central; aunque esta idea no ha sido investigada con gran entusiasmo, Maitre y colaboradores (1974) propusieron a la

adenosina como un antiepiléptico endógeno. También actualmente, existe gran interés por determinar la participación de segundos mensajeros en la función normal y patológica del tejido nervioso, los cuales pueden influir en la liberación de los neurotransmisores, modificar sus receptores, cambiar la permeabilidad de los canales iónicos e inducir enzimas de tal manera que la señal del neurotransmisor se amplifique. Se sugiere, que esta cascada de eventos puede llegar hasta el núcleo y modificar el genoma. Así, la entrada de calcio a la neurona puede alterar los genes denominados proto-oncogenes, particularmente el *c-fos* y en menor cuantía el *c-myc*, que producen proteínas específicas (Martínez de Muñoz y Mandel, 1997).

La comprensión del mecanismo fisiológico y celular de ciertos tipos de epilepsia, específicamente de las ausencias (que son las más benignas), ha contribuido al entendimiento de cómo actúan la mayoría de los compuestos antiepilépticos disponibles. Para el diseño de este tipo de compuestos se cuenta también con el modelaje por computadora que facilita la síntesis de series de compuestos antiepilépticos. La disponibilidad de pruebas sistematizadas, para la evaluación preclínica de la actividad antiepiléptica también favorece el desarrollo de nuevos fármacos; además, para medir la eficacia farmacológica y para determinar su mecanismo de acción se cuenta también con varios modelos experimentales específicos (Martínez de Muñoz, 1991).

Por estas razones, varios compuestos prometedores están en diferentes etapas de investigación, entre ellos sobresalen: clobazam, denzimol, eterobarb, felbamato, flunarizina, gabapentin, lamotrigina, milacemida, oxycarbamazepina, raltolina, estiripentol, topiramato y zonisamina. En México, con el propósito de contribuir al desarrollo de nuevos compuestos antiepilépticos se ha estudiado intensamente una serie de derivados de fenil alcohol aminas, sintetizadas por Carvajal y colaboradores (1964).

Se sabía que cuando se produce un desbalance entre los dos principales neurotransmisores del cerebro: glutamato (excitador) y el GABA (inhibidor), se originan convulsiones. Los dos aminoácidos son regulados en sus concentraciones por dos enzimas dependientes del fosfato de piridoxal: la descarboxilasa del L-glutamato y la transaminasa del GABA; enzimas que descarboxila al L-glutamato

que generan al GABA y la transaminasa del GABA, que lo transamina para dar origen al semialdehído succínico y al L-glutamato. Aunque el semialdehído succínico es tóxico para las células, éste no se acumula porque se oxida muy eficientemente por la deshidrogenasa correspondiente. La disfunción del sistema del GABA se ha asociado también, con los síntomas de la enfermedad de Huntington, de la enfermedad de Parkinson y la discinesia tardía. Se sabía también, que cuando las concentraciones de GABA disminuían por abajo de un nivel umbral en el cerebro, las convulsiones empezaban, y si se inyectaba GABA directamente en el cerebro de un animal al que se le habían inducido convulsiones, éstas cesaban (Carvajal-Sandoval y Meza-Toledo, 1997).

Por lo descrito anteriormente un anticonvulsivante ideal sería el GABA; sin embargo, la administración periférica del GABA no tiene efecto anticonvulsivante, debido a que no atraviesa la barrera hematoencefálica. El diseño de los inhibidores HEPB, HEPP y HEPA que se realizó en 1964 por Carvajal y colaboradores fue para lograr la elevación del GABA encefálico y si bien no se consiguió ese efecto, los compuestos presentaron un buen efecto anticonvulsivante muy probablemente debido a la semejanza estructural con el GABA y a su acción como GABA-miméticos (Carvajal y Massieu, 1979), que son potentes anticonvulsivantes en varios modelos experimentales de epilepsia (Meza-Toledo y col., 1990).

Todos los compuestos antiepilépticos nuevos se han diseñado racionalmente, es decir, en base a su mecanismo de acción molecular y por ello es factible que en la próxima década se sinteticen varias series de compuestos dirigidos a actuar sobre moléculas o sobre partes específicas de macromoléculas como los multireceptores GABA A. Por ello, es previsible que en el futuro próximo el médico contará con varias alternativas farmacológicas para el control de cada tipo de epilepsia (Martínez de Muñoz y Mandel, 1997).

Es por ello, que la investigación farmacológica del DL-HEPB, DL-HEPP y DL-HEPA conducirá a la introducción de nuevos medicamentos antiepilépticos desarrollados totalmente en México y esto será un ejemplo de que sí podemos contribuir internacionalmente por medio de trabajo y colaboración interdisciplinaria. Por otra parte, el costo de los nuevos medicamentos será más accesible para las

personas que los requieren, ya que sabemos que las medicinas de importación son de un valor mucho mayor, además, este se ve incrementado por el uso diario que se requiere del fármaco durante toda la vida del paciente.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, los primeros agentes antiepilépticos desarrollados, fueron modificados en sus diferentes estructuras, tratando siempre de mejorar la eficacia anticonvulsiva y disminuir los efectos secundarios. Así se llegó a disponer de un numeroso grupo de fármacos útiles en los diferentes tipos de epilepsia. Sin embargo, no se ha conseguido aún el producto ideal que sea eficaz en el control de la enfermedad y carente de efectos secundarios indeseables. Es por ello, que el presente estudio de genotoxicidad pretende contribuir al conocimiento de como estos compuestos son capaces de dañar los núcleos de las células meióticas de *Tradescantia*, las cuales son eucarióticas y poseen las mismas moléculas que conforman al ADN de la población humana (Barrera, 1992; Goldstein y col., 1995; Vega, 1985b; EPA, 1988; Stansfield, 1997).

A pesar de las diferencias de metabolismo y de reparación del ADN entre las especies, así como de otros procesos fisiológicos que afectan a la mutagénesis química, la universalidad del ADN como material y código genético, proporciona una base científica para el uso de varios sistemas de prueba no humanos para predecir la mutagenicidad intrínseca de las sustancias ha estudiar (EPA, 1988; Goldstein y col., 1995). La observación de que las sustancias que causan efectos genéticos en una especie o en un sistema de prueba frecuentemente causan efectos similares en otras especies o sistemas y constituyen un apoyo adicional para el uso de sistemas no humanos.

La configuración de una molécula juega un papel muy importante en su actividad biológica y es prioritaria en el desarrollo de nuevos fármacos. Las moléculas quirales como es el caso de estos compuestos antiepilépticos que podrían conducir a diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas y producirán cambios en la potencia o toxicidad entre ellos y puede ser lo que determine en gran medida el daño genético a causar sobre las células.

Los datos obtenidos muestran una diferencia en el resultado mutágeno encontrado para estos nuevos fármacos, y es probable que ello se deba precisamente a la estructura química, la cual es quiral y posee cuatro grupos

funcionales (hidroxi, etilo, fenilo y la cadena amídica) en la posición del carbono 4, 3 y 2 (carbonos quirales) respectivamente (Fig. 4) lo cual sugiere, que estos grupos se pegen a la molécula de ADN en mayor o menor medida dependiendo de la concentración así como del impedimento estérico o espacial que cada uno de los sustituyentes quirales pueda encontrar en su interacción con el ADN.

Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren que a la misma concentración de 7 mg /ml tanto el DL-HEPB que contiene la cadena amídica más larga y el DL-HEPA que contiene la cadena amídica más corta se obtiene el máximo daño genotóxico o mayor inducción de micronúcleos, pero, difieren en la frecuencia, la cual es mayor para el DL-HEPA que para el DL-HEPB y esto puede ser debido a el impedimento estérico que presenta el sustituyente amídico más largo -DL-HEPB- y se facilite mejor la interacción del DL-HEPA con el ADN y tenga más probabilidad de que varias de sus moléculas se pegen a la estructura del ADN por ser una molécula más pequeña que su homólogo.

Asimismo, un estudio comparativo de los modelos moleculares a escala entre la estructura común del inhibidor DL-HEPB, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el alcaloide Muscimol de *Amanita muscaria* que es un agonista del GABA, indicó que el inhibidor DL-HEPB presenta una gran similitud estructural con el GABA siendo más semejante que el mismo Muscimol. Observando los modelos moleculares lateralmente, las dimensiones son de 8.0 Å para el GABA y el DL-HEPB (sin los sustituyentes en 4, 4) y el Muscimol mide 7.7 Å. Vistas las moléculas de arriba las dimensiones son 8.1 Å para el Muscimol. Como se mencionó antes, la estructura fundamental de los nuevos fármacos anticonvulsivos presenta una gran analogía con el GABA y es muy probable que los grupos sustituyentes en la posición 4, 4 (Metilo, fenilo; etilo, fenilo y difenilo) proporcionen a las moléculas los grupos hidrofóbicos que permitirán a estas, fijarse mejor a los receptores además de darles una hidrofobicidad necesaria para atravesar la barrera hematoencefálica (Carvajal y Massieu, 1979), por lo que se podría considerar que estos nuevos anticonvulsivos son específicos y ello reduciría su potencial tóxico-químico como xenobióticos de índole farmacológica, patológica o genotóxica.

Sin embargo los resultados obtenidos demuestran que son genotóxicos y

citotóxicos al sistema de MCN-TRAD, lo cual sugiere la posibilidad de la transformación metabólica de estos fármacos anticonvulsivos como mutágenos por la planta. Valeminský y Gichner (1988) realizaron una recopilación de datos concernientes a la actividad mutagénica de promutágenos en varios ensayos de vegetales *in vivo* que han sido utilizados para la detección de agentes genotóxicos en el ambiente, mencionando que la significancia en este campo es altamente dependiente de la habilidad para activar promutágenos y procarcinógenos por los propios sistemas enzimáticos de la planta. Por ejemplo, Kanaya (1996) realizó un estudio de activación de anilina por extractos de *Vicia faba*, *Pisum sativum* y *Lactuca sativa* en células de ovario de Hamster Chino encontrando que en *Vicia*, la activación causó un incremento de aberraciones cromosómicas y células endoreduplicadas pero no causó intercambio de cromátidas hermanas, mientras que los extractos de *Pisum* y *Lactuca* no activaron la anilina.

Para el compuesto antiepiléptico (\pm)-HEPA o DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil-acetamida se han encontrado que los enantiómeros (+) y (-) presentan una potencia similar en ratones, ante las convulsiones provocadas por el pentilentetrazol, siendo el enantiómero (+) más tóxico que el isómero (-) en la prueba del rotarod especie de rodillo que se hace girar a 6 rpm y en el cual el ratón debe mantener el equilibrio (Carvajal-Sandoval y Meza-Toledo, 1997).

Los estudios realizados por el grupo del Dr. Carvajal indican también, que los otros dos racematos (\pm)-HEPB o DL-4-hidroxi-4-etil-4-fenil-butiramida y el (\pm)-HEPP o DL-3-hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida poseen una actividad anticonvulsionante ligeramente mayor que los otros dos homólogos DL-HEPB y DL-HEPA así como una menor neurotoxicidad juzgada en la prueba del rotarod (Meza-Toledo y col., 1990). Asimismo, Pacheco y colaboradores (1996) han encontrado que el DL-HEPP se une, tanto al receptor A como al B, del GABA, confirmando la sugerencia de Braylowsky y colaboradores (1992) del efecto GABA mimético del fármaco en el status epilépticus o actividad convulsiva aguda, repetitiva y generalizada, en la cual el individuo sufre convulsión tras convulsión antes de recuperarse de la primera, que puede durar horas o incluso días y representa una urgencia médica que si no es dominada puede originar lesión importante del sistema nervioso central o incluso la muerte (Goldberg, 1982). Este

estado es producido por el síndrome de abstinencia al GABA experimentado en ratas.

La mayoría de los fármacos sufre transformaciones metabólicas, y son numerosas y diversas las reacciones bioquímicas que hay que considerar al estudiar el metabolismo de los mismos. El sitio principal del metabolismo de los fármacos es el hígado, aunque también pueden participar otros tejidos. Una característica de casi todas estas transformaciones es la de que los productos metabólicos (metabolitos) son más polares que los fármacos originales.

Aunque la duración de la acción de fármaco tiende a acortarse por transformación metabólica, como se ha descrito antes, no es correcto pensar en el metabolismo del fármaco como una "destoxificación" ya que, es muy frecuente que el producto metabólico tenga una actividad biológica mayor que la del fármaco.

Así mismo, se sabe que las plantas metabolizan las sustancias en forma diferente de como lo hacen los mamíferos. Es muy probable entonces, que algunos compuestos que no tienen efecto directamente sobre los mamíferos, puedan verse convertidos en metabolitos activos por la acción de las plantas y constituir así un riesgo para los consumidores (Plewa y Gentile, 1982; Gentile y col., 1985; de Serres, 1992).

Algunos investigadores sugieren que dentro de las pruebas citogenéticas se incluya como parte del protocolo la parte microsomal del hígado para realizar un ensayo con activación metabólica.

Uno de los protocolos y que se acepta como prueba mutagénica para la reglamentación de nuevos fármacos, es la de Ames, en la cual los nuevos fármacos antiépilépticos DL-HEPB, DL-HEPP y DL-HEPA dieron resultados negativos a las concentraciones de 0.01, 0.1, 0.5, 1, 3 y 5 mg/ml en presencia y ausencia de estimulación metabólica proporcionada por el S-9 (Eluani, 1992). Los resultados obtenidos en el presente estudio con el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 (MCN-TRAD) demuestra que a las concentraciones probadas se observó que el incremento de micronúcleos fue estadísticamente significativo desde las primeras concentraciones de 1 mg/ml, hasta el máximo daño genotóxico encontrado a las concentraciones de 3 mg/ml para el fármaco DL-HEPP y de 7 mg/ml para el DL-HEPB y DL-HEPA

respectivamente.

De acuerdo a lo obtenido por Eluani (1992), con el Sistema de Ames, sus datos correlacionaron con los obtenidos en el Sistema de MNC-TRAD, para los anticonvulsivos HEPB y HEPA en donde el efecto máximo de genotoxicidad se obtuvo a la concentración de 7 mg/ml, no así para HEPP donde la concentración con el máximo efecto genotóxico fue de 3 mg/ml, con lo cual podría pensarse que de haberse probado concentraciones mayores a 5 mg/ml incluyendo la dosis terapéutica de 10 mg/ml posiblemente se hubieran obtenido resultados positivos.

Por otra parte, Ma y colaboradores (1984) evaluaron varios compuestos, entre ellos algunos fármacos, utilizando los sistemas Ames y MCN-TRAD y encontraron sólo una correlación de un 33%, acción que se le puede atribuir a la especificidad de los sistemas (Vega, 1985b).

Asimismo, en otro estudio usando el modelo de mutación y recombinación en células del ala de *Drosophila melanogaster* para los fármacos antiepilépticos HEPB y HEPP, Jaimes-Aguilar (1993) no encontró resultados positivos de genotoxicidad a las concentraciones de 0.5, 1, 2, 5, 7 y 10 mg/ml y de 0.45, 0.9, 1.8, y 5, 7 y 10 mg/ml respectivamente, pero si de citotoxicidad a partir de las concentraciones de 5 y 10 mg/ml para ambos fármacos, estos datos correlacionan con lo obtenido en el sistema de MCN-TRAD para la concentración de 10 mg.

De igual manera, diversas pruebas genotóxicas se han utilizado para evaluar a los fármacos antiepilépticos más utilizados terapéuticamente; algunos estudios han reportado efectos genotóxicos utilizando el sistema de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos a diferentes anticonvulsivos, como la fenitoína (Schauman y col., 1985) y al valproato sódico (Taneja y col., 1992), obteniéndose resultados positivos. Con el sistema de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos se encontraron efectos genotóxicos inducidos con el defenilhidantoinato de sodio (García-Sagredo, 1988; Madrigal y col., 1988) fenobarbital (Madrigal y col., 1989) y carbamazepina (Madrigal y col., 1990; Sardas y col., 1994).

Puesto que los experimentos directos con mutágenos químicos están obviamente fuera de posibilidad de prueba en humanos, nuestra valoración de los peligros mutagénicos asociados con la exposición a fármacos y a otros agentes

por fuerza debe basarse en investigaciones genéticas con otros animales, suponiendo naturalmente que la sensibilidad del aparato genético a mutágenos será casi la misma en las especies cercanamente relacionadas (Goldstein y col., 1995).

De acuerdo a lo descrito anteriormente observamos que existen diferentes sistemas que se pueden utilizar para detectar la mutagenicidad, pero desde el punto de vista predictivo de si un fármaco o un agentes químico es probablemente peligroso para la línea germinal humana debería ser obvio que ningún sistema es suficiente. Ya que el ADN de todos los organismos es similar en su estructura fundamental y su mecanismo de replicación, se puede utilizar cualquier organismo conveniente. Por ello, se debería sospechar de cualquier compuesto que demuestre tener gran mutagenicidad en cualquier sistema de prueba, y deberían ser considerados como mutagénicos también en el hombre. Algunos ejemplos son los agentes alquilantes, la ciclohexilamina, los nitritos y nitrosaminas, análogos de bases y esteptonigrina.

Por otro lado, una prueba negativa en un organismo no se puede tomar como garantía de seguridad en el hombre. Aún un resultado negativo en un sistema de prueba con un huésped mediador no da una seguridad real, ya que las especies también difieren mucho en el patrón de los metabolitos derivados de un compuesto original dado (Goldstein y col., 1995).

Estas consideraciones han llevado a proposiciones para una valoración directa de la mutagénesis en el hombre debido a que no podemos exponemos deliberadamente a los supuestos mutágenos. Es por ello que se plantean métodos para detectar cualquier aumento brusco en la frecuencia de mutación en las poblaciones humanas. Para vigilar, en forma rutinaria la citología de las células sanguíneas en los recién nacidos, e incluso en los adultos, se propone la suposición de que la mutagénesis afectaría a las células somáticas, no sólo a las de la línea germinal, y que por medio de los resultados obtenidos con mutágenos en los sistemas de cultivo de células hay una evidencia amplia debido a que miles de células sanguíneas se podrían evaluar en un solo individuo, por lo que se amplificaría mucho la sensibilidad de la detección (Neel y Bloom, 1969; Hook, 1971), y si además se realiza una evaluación simultánea de proteínas plasmáticas

para detectar cualquier variante mutante que se origine de un evento mutacional en el gameto o en los estadios tempranos del desarrollo del cigoto, la evidencia sería concluyente (Goldstein y col., 1995)

Asimismo, los resultados del estudio citogenético de estos nuevos fármacos sobre las células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 demuestran que estos compuestos son capaces de alterar la estructura del ADN ocasionando daño, el cual lo detectamos por el incremento de micronúcleos observados con respecto a la mutación espontánea de la planta; por tanto se comprueba el fundamento del proceso de mutagénesis, es decir, estos químicos ocasionaron un daño al ADN de modo que cualquier agente capaz de producir esta alteración es considerado mutágeno (Zimmerman, 1982).

Sin embargo, aunque algunos mutágenos pueden ser también cancerígenos y causar cáncer y producirse espontáneamente o inducirse por radiación ionizante, virus y agentes químicos que se conocen como carcinógenos a través de dos procesos distintos, designados iniciación y promoción. La iniciación que es la producción de un cambio celular irreversible y es una condición necesaria, pero no suficiente para el desarrollo del cáncer. Y la promoción es el proceso por el que un tumor se desarrolla en un tejido en el que ya ocurrió la iniciación.

Un posible mecanismo de acción de los promotores consiste en inhibir los sistemas reparadores del ADN (Gaudin y col., 1971). Puesto que la iniciación de las células cancerosas es brusca, y este cambio al parecer es irreversible y hereditario, se puede considerar como mutación somática.

De acuerdo con este punto de vista, la iniciación equivale a la mutagénesis somática. De la misma manera, muchas sustancias descubiertas originalmente como carcinogénicas se ha probado que son mutagénicas en los microorganismos (Zimmermann, 1971).

Entre los agentes conocidos como carcinogénicos en animales y que también son mutagénicos (por lo general comprobados en bacterias) están las nitrosaminas, diazoacetano, sulfatos y sulfonatos de alcano, la β -propiolactona, tifenimina, trietilenmelamina, 1,2,3,4-diepoxibutano, dimetilhidracina y las mostazas nitrogenadas y sulfuradas. Estos compuestos electrofílicos altamente reactivos interactúan covalentemente con el ADN (Brookes, 1971; Zimmermann, 1971).

Se ha observado que otros carcinógenos no son mutagénicos, lo que indica que no hay una relación necesaria entre la carcinogenicidad y la mutagenicidad. Esta discrepancia aparente se aclaró por el descubrimiento de la transformación metabólica a carcinógenos próximos en el organismo animal. Los compuestos que se habían probado para mutagenicidad fueron los que se sabía que producían cáncer cuando se administraban a animales, pero no los carcinógenos derivados metabólicamente que de hecho iniciaban el proceso neoplásico en los tejidos (Goldstein y col., 1995).

Estudios sobre la activación oncogénica indican fuertemente que las alteraciones específicas del ADN y cromosomas están íntimamente involucrados con el proceso carcinogénico, concluyéndose que datos experimentales en mutagénesis y carcinogénesis indican que los factores mutagénicos son importantes en carcinogénesis. Es por ello que estos nuevos anticonvulsivos requieren de estudios sobre carcinogenicidad para descartar el peligro que esto conlleva más aún, porque este tipo de medicamento es utilizado de manera rutinaria por la naturaleza de la misma enfermedad, que es de por vida. En la actualidad no existen estudios que demuestren que los fármacos anticonvulsivos sean carcinogénicos.

Otro aspecto de especial interés en la terapia con anticonvulsivos es la teratogenicidad debido a que las madres que toman antiepilépticos tienen un alto riesgo de presentar malformaciones congénitas. Existen evidencias de que los anticonvulsivos administrados durante el embarazo se relacionan con una mayor frecuencia de malformaciones fetales. De interés especial son los teratógenos que interfieren directamente con el desarrollo fetal a dosis que no trastoman la función placentaria, ni producen toxicidad materna seria. Una gran cantidad de agentes teratogénicos cumple con este criterio de toxicidad selectiva para el feto. Todos los teratógenos, cuando se administra a una dosis alta o muy tempranamente en el desarrollo embriológico, pueden producir muerte fetal seguida de aborto o reabsorción del feto (Goldstein y col., 1995).

Se ha prestado mucha atención a nivel experimental a la teratogenicidad de anticonvulsivos en animales de laboratorio, con objeto de evaluar su efecto o conocer el mecanismo de acción. Estos estudios han ayudado a resolver, en

parte, uno de los problemas más discutidos, como es el conocer si es la enfermedad o el fármaco per se el responsable de la incidencia aumentada de malformaciones congénitas en fetos expuestos a difenilhidantoína. Se concluyó que las crisis epilépticas no parecen por sí solas constituir un factor de riesgo y es más bien la exposición in útero al anticonvulsionante lo que produce las malformaciones (Goldstein y col, 1995; Porter y Meldrum, 1996; Chamorro y Salazar, 1996; Chamorro-Cevallos y Salazar-Jacobo, 1997).

Se ha confirmado la poca potencia de algunos anticonvulsionantes para producir defectos congénitos como la etosuximida y benzodiacepinas. En cambio otros, como la difenilhidantoína y el ácido valproico, aunque aparentemente presentan poca toxicidad, están incriminados en la etiología de las malformaciones congénitas. A pesar de los estudios para aclarar el mecanismo de acción teratógena de la difenilhidantoína, aún se desconoce (Chamorro-Cevallos y Salazar-Jacobo, 1997). El responsable de las malformaciones parece ser su metabolito, el óxido de arena, altamente reactivo y por tanto, puede unirse en forma covalente a sitios nucleofílicos de los ácidos nucleicos (Jerina y Daly, 1974) y producir una serie de fenómenos que conducen finalmente a la malformación y otras manifestaciones anormales en el desarrollo (Goldstein y col., 1995; Chamorro y Salazar, 1996; Chamorro-Cevallos y Salazar-Jacobo, 1997)

Desde hace años se sabe que las mujeres bajo tratamiento con antiepilépticos, pueden engendrar niños malformes en una proporción 3 veces mayor que la población general (Yerby, 1991); asimismo, Lander y Eadie (1990), encontraron que existía una relación estadísticamente significativa con el consumo de fármacos de este tipo, aunque no con la edad, tipo o de duración de las crisis epilépticas.

De igual manera, Finnell y Dansky (1991), sugieren que la implicación de los antiepilépticos como teratógenos en humanos, se ha comprobado por: la asociación entre la exposición *in vitro* y el aumento de malformaciones específicas; la existencia de relación dosis-respuesta; la aparición de malformaciones dependiente del metabolismo genéticamente controlado.

Todos los medicamentos antiepilépticos se consideran como teratógenos; las oxazolidinedionas en primer lugar, a continuación la difenilhidantoína, después la

carbamazepina, fenobarbital, benzodiazepinas y más recientemente el ácido valproico; sin embargo, los antiepilépticos no son agentes teratógenos potentes, sino solamente un factor más entre los que actúan sobre un terreno genéticamente propicio, ya que el riesgo de malformaciones congénitas es mayor si la enfermedad es prolongada y la terapia está constituida por varios fármacos antiepilépticos (Meyers y col., 1982).

Los síndromes fetales más comunes producidos por los antiepilépticos más usados clínicamente como son la difenilhidantoína (fenitoína), trimetadona, fenobarbital, primidona, y valproato (ácido valproico) son: retardo mental, retardo del crecimiento, nariz corta, puente nasal bajo, epicanto, paladar o labio hendidos y posición anormal de. Otros estudios han registrado anomalías e incidencias y las más frecuentes han sido las hendiduras faciales y defectos cardiovasculares y en menor proporción, malformaciones esqueléticas y defectos en SNC, sistema gastrointestinal y anomalías genitourinarias (Chamorro-Cevallos y Salazar-Jacobo, 1997).

Debido a todos estos efectos adversos que han producido los fármacos antiepilépticos más utilizados, es que se han realizado estudios para evaluar el posible riesgo toxicológico que estos nuevos fármacos el DL-HEPB, DL-HEPP y DL-HEPA, que se están desarrollando en nuestro país, pudieran ocasionar a la salud del hombre. Aniceto (1993) estudió su efecto sobre la fertilidad en ratón, no encontrando resultados positivos hasta la concentración de 4.25 mg/ml. Se les ha evaluado también a los tres fármacos su efecto teratogénico, en estudios reportados por Salazar y colaboradores (1989) para DL-HEPB a las concentraciones de 0.625 y 2.5 mg/ml en ratas no se reportan alteraciones morfológicas. Posteriormente se realizó otro estudio a los tres fármacos, en ratones, donde se les administraron dosis de 0.0625 a 1.25 mg/ml por vía oral e intraperitoneal y no se observó ningún efecto teratogénico (Chamorro y col., 1994). La dosis de 2.875 mg/ml fue determinada como la dosis de toxicidad subcrónica en ratón para el antiepiléptico DL-HEPB (Chamorro y col., 1996); sin embargo es importante mencionar que todas las dosis utilizadas en estos estudios son menores a la dosis recomendada con actividad anticonvulsiva para humanos, la cual se ha establecido de 800 mg/Kg. de peso al día (10 mg/ml), por lo que es recomendable,

realizar estudios con dosis semejantes a la utilizada con fines terapéuticos.

Aunque la mayoría de los antiepilépticos se consideran teratógenos potenciales, los efectos adversos sobre el desarrollo embrionario, asociados con el empleo de dinefildantoína, trimetadona y ácido valproico son inequívocos y esto parece demostrarlo un estudio realizado por Kaneko (1991) en mujeres epilépticas tratadas y no tratadas con antiepilépticos, así como con una población testigo, encontrando que la frecuencia de malformaciones fue de 1% en la población testigo, mientras que para las tratadas con antiepilépticos fue de 6.3% (Chamorro-Cevallos y Salazar-Jacobo, 1997).

Otros efectos tóxicos con antiepilépticos que se ha observado en humanos es una reducción moderada de la fertilidad en mujeres epilépticas tratadas y en los varones la potencia y la fertilidad también se ve ligeramente reducida (Bevan y col., 1982; Dansky y Finnell, 1991; Porter y Meldrum, 1996).

Por otra parte, parece ser que no se producen efectos mutagénicos, aunque realmente los resultados son difíciles de interpretar por el número pequeño de pacientes estudiados, por la diferencia en metodologías y por la existencia de factores incontrolables como edad, sexo y exposición simultánea a mutágenos ambientales potenciales (Dansky y Finnell, 1991).

En años recientes, a nivel mundial se han desarrollado una veintena de antiepilépticos con posible aplicación terapéutica. Entre ellos se encuentran el vigabatrin, que produce en humanos somnolencia, irritabilidad, vértigo e hipotonía. El progabide da lugar a fenómenos de ansiedad y hepatitis, y la zonisamida a somnolencia; en cambio, no se han observado efectos colaterales para la flunarizina. Otro de los compuestos en experimentación es la lamotrigina, que en los estudios hematológicos y bioquímicos sanguíneos, así como en las funciones cardiovasculares, renal y del SNC, no ha producido alteraciones importantes (Cohen y col., 1987). Se tienen pocos resultados para otros antiepilépticos como la oxcarbazepina, amatiolida, gabapentin, stílpental, felbamato y benzisuccimidias (Goehring y col., 1991).

En México los estudios de neurotoxicidad realizados en ratón, de los tres nuevos anticonvulsivos: DL-HEPB, y dos homólogos inferiores, DL-HEPP y DL-HEPA, demostraron que las dosis de 1.38, 2.67 y 1.64 mg/ml respectivamente

fueron tóxicas (Sánchez, 1987). El estudio subcrónico en la misma especie demostró que la DL-HEPB no alteró el aumento ponderal ni el consumo de agua ni alimento. Tampoco hubo modificación hemática, química sanguínea, orina, peso de órganos y estructura histológica (Chamorro y col., 1996; Fera-Velasco y Chamorro, 1996).

Asimismo, las pruebas de toxicidad subcrónica para el DL-HEPP demostraron que la dosis menores de 6.83 mg/ml no se observaron cambios significativos en los parámetros de consumo de agua y alimento, peso, química sanguínea, colesterol, histopatología, fosfatasa alcalina, ácido oxaloacético y pirúvico y pruebas funcionales renales (Gómez, 1993)

Considerando estos resultados es muy importante continuar realizando estudios de toxicidad que incluyan tanto estudios de teratogenicidad y genotoxicidad en diferentes sistemas preferentemente en mamíferos sobre todo en aquellos que involucren a las células gaméticas, ya que debido a la naturaleza terapéutica de estas sustancias, las cuales se utilizan de por vida, resultan más peligrosas durante el embarazo. Al realizar estos ensayos, se debe incluir la dosis con efecto anticonvulsionante en humanos (10mg/ml), ya que como se puede observar en este estudio los coeficientes de determinación obtenidos de las ecuaciones que rigen el efecto genotóxico para estos fármacos son de un 75.79% para DL-HEPB a las concentraciones de 1, 3 y 5, mg/ml y un 75.85% para DL-HEBA a las concentraciones de 1, 5 y 7 mg/ml y de 96.82% para DL-HEPP a las concentraciones de 1, 3, 5 y 7 mg/ml, en donde estos resultados nos indican una probabilidad alta de que el efecto genotóxico fue inducido solo por los fármacos antiepilépticos. Además, como se puede observar en las curvas dosis-efecto para estos nuevos anticonvulsivos, la concentración terapéutica de 10 mg/ml produce efectos citotóxicos como retraso del ciclo meiótico y muerte celular en las células madres del polen de *Tradescantia* Clon 4430.

VIII. CONCLUSIONES

- 1) El nuevo fármaco antiepiléptico (precursor) DL-4-hidroxi 4-etil- 4-fenilbutiramida (DL-HEPB) es genotóxico para las células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430 a la concentración de 7 mg/ml.
- 2) Para el segundo fármaco antiepiléptico, el homólogo inferior DL-3 hidroxi, 3-etil, 3-fenilpropionamida (DL-HEPP), la concentración de 3 mg/ml es genotóxica para las células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430.
- 3) La concentración de 7 mg/ml del tercer fármaco antiepiléptico, -homólogo inferior del fármaco precursor DL-HEPB, el DL-2-hidroxi, 2-etil, -2-fenilacetamida es genotóxica para las células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430.
- 4) Las concentraciones de 10 mg/ml de los fármacos (DL-HEPP y DL-HEPA) son tóxicas para las células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430.
- 5) La diferencia en los resultados obtenidos se debe muy probablemente a la estructura molecular de cada uno de los tres fármacos, a pesar de tener un origen común.
- 6) El presente estudio de genotoxicidad realizado a estos fármacos reveló que las concentraciones que inducen mutagenicidad a *Tradescantia* Clon 4430 son menores a las que se han utilizado en estudios preliminares en la terapéutica de la epilepsia (10 mg/ml).

IX. REFERENCIAS

Ahmed, I. y Ma, T.H., 1980. Chromosome breakage induced by maleic hidrazide in cultured human lymphocytes and *Tradescantia* pollen mother cells. *Environ. Mutagen.* 2: 287.

Alexander, P., 1992. "La formación de células sexuales" *Biología.* México. Prentice Hall (Ed.), pp:70-72.

Alving, J., Krogh, J.M. y Meyer, H., 1976. Diphenylhydantoin and chromosome morphology in man and rat. A negative report. *Mutation Res.* 40: 173-176.

Alving, J., Krogh, J.M. y Meyer, H., 1977. Chromosome studies of bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes from diphenylhydantoin-treated patients. *Mutation Res.* 48: 361-366

Ames, B.N., McCann, J. y Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutation Res.* 31: 347-364.

Andersson, H.C. y Kihlman, B.A., 1989. The production of chromosomal alterations in human lymphocytes by drugs known to interfere with the activity of DNA topoisomerase II. I. *m-AMSA*. *Carcinogenesis.* 10: 123-130.

Andersson, H.C. y Kihlman, B.A., 1992. Induction of chromosomal aberrations by camptothecin in root-tip cells of *Vicia faba*. *Mutation Res.* 268: 167-181.

- Aniceto, Ch.A.M., 1993. Estudio del efecto de la 3-hidroxi, 3-etil, 3-fenilpropionamida (HEPP) sobre la fertilidad y periodos peri y post-natal en ratón. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. pp:1-38
- Bausum, H.T. y Wagner, R.P., 1965. 'Selfing' and other forms of aberrant recombination in isoleucine valine mutations of *Neurospora*. *Genetics*, 51: 815-830.
- Barrera, R.R. y De la Garza, S.J., 1997. "Principios básicos de biología molecular." *Patología Oncológica*. México. Flores. G. (Ed), Mc Graw-Hill Interamericana (Ed.), pp:1-8
- Barrera, S.H.A., 1992. Información Genética: Su estructura, función y manipulación. México. CONACYT, Colección Ciencia Básica. pp: 9-13.
- Bevan, J.A., Thompson, J.H., Thomas, J.A., Jones, J.E., Beckerman, J.H., Lomax, P., Roth, R.H., Westfall, T.C., Paulus, H.E., Cho, A.K., 1982. *Fundamentos de Farmacología*. México. HARLA S.A. de C.V., (Ed.), pp: 285.
- Bignami, M., Morpugo, G., Pagliani, R., Carere, A., Conti, G. y de Giuseppe, G., 1974. Non disjunction and crossing over induced by pharmaceutical drugs in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 26: 159-170.
- Blaschke, V.G., Kraft, H.P., Fichentscher, K. y Kohler, F., 1979. Chromatographische Racemattrennung von Thalidomid und teratogene Wirkung der Enantiomere. *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 29: 1640-1642.
- Braylowsky, S., Montiel, T., Hernández, E., Marescaux, Ch. y Vergens, M., 1992. Effects of 3-hydroxy-3-ethyl-3-phenylpropionamide (HEPP) on rat models of generalized and focal epilepsy. *Epilepsy Res.* 11: 167-172.
- Brookes, P., 1971. On the interaction of carcinogens with DNA. *Biochem. Pharm.* 20: 99-1001.

Brown, J.M. y Davies, S.G., 1989. Chemical asymmetric synthesis. *Nature*, 342: 631-636.

Carvajal, G.; Russek, M.; Tapia, R.; y Massieu, H.G. 1964. Anticonvulsive action of substances designed as inhibitors of gamma-aminobutyric acid-alfa-ketoglutaric acid transaminase. *Biochem. Pharmacol.* 13:1059-1069.

Carvajal, G. y Massieu, H.G. 1979. Gamma-hidroxi-gamma-etil-gamma-fenil-butiramida (HEPB). Nuevo agente anticonvulsionante agonista del GABA. En: *Neurobiología. Symposium Internacional*. México. Velasco Suárez, M.M. y Escobedo Ríos, F. (Eds.), *Inst. Nac. Neurol. y Neurocir.* pp: 103-115.

Carvajal, S.G., 1989. "Planeación de fármacos antiepilépticos". *Epilepsia: Un enfoque multidisciplinario*. México. Feria, V.A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio, D.F. (Eds.), *Trillas*, 2a. ed., pp: 193-208.

Carvajal-Sandoval, G. y Meza-Toledo, S.E., 1997. "La planeación de fármacos antiepilépticos". En: *Epilepsia: aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. México. Feria-Velasco, A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio-Donnadieu, F. (Eds.), *Inst. Nal. Neurol. Neurocirg.* 1a. ed., pp: 158-191.

Castellano, E.E., Zukerman-Shpector. y Carvajal, G., 1981. 4-hidroxi, 4-phenyl-hexanamide, an anticonvulsant molecule. *Acta Crystallogr.* 337: 284-286.

Cebulska-Wasilewska, A., 1992. *Tradescantia*-Stamen-hair bioassay on the mutagenicity of radioisotope-contaminated air following the Chernobyl nuclear accident and one year later. *Mutation Res.* 270: 23-29.

Cohen, A.R., Land, G.S., Breimer, D.D., Yven, W.C., Winton, C. y Peck, A.W., 1987. Lamotrigine: A new anticonvulsant: pharmacokinetics in normal humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 42: 535-541.

Constantin, M.J. y Owens, E.T., 1982. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 99: 1-12.

Cortinas de Nava, C., Ostrosky W.P. y Galván, S., 1980. *Manual de Métodos para la Identificación de Mutágenos y Carcinógenos Químicos Ambientales*. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Vol. 1. pp: 1-10.

Crocker, M., 1982. Methaphase I delay as a factor influencing translocation yield from spermatogonial irradiation in mice carrying Robertsonian translocations. *Mutation Res.* 103: 339-343.

Curtis, H. y Barnes, N.S., 1994. *Biología*. México. Médica Panamericana (Ed.), 5a. ed., pp: 78-280.

Chamorro, G., Salazar, M., Salazar, S., Ulloa, V., Carvajal, G. y Martínez, D., 1994. Evaluation of the toxic and teratogenic potential of the anticonvulsant drug 4-hydroxy, 4-ethyl, 4-phenylbutyramide in mice. *Arch. Med. Res.* 25: 441-446.

Chamorro, G. y Salazar, M., 1996. Las malformaciones congénitas y los fármacos anticonvulsionantes. IPN. *Ciencia y Arte: Cultura*. Año II, No.10, pp: 11-14.

Chamorro, G., Pizaña, A., Fera, A., Salazar, M., Salazar, S., Ulloa, V., Morelos, E. y Carvajal, G., 1996. Estudio de toxicidad subcrónica de la DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (DL-HEPB) en el ratón. *Arch. Neurocién. (Mex)*, 1: 163-165.

Chamorro-Cevallos, G. y Salazar-Jacobo, M., 1997. "Toxicología de los fármacos antiépilépticos". *Epilepsia: aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. México. Fera-Velasco, A.; Martínez de Muñoz, D. y Rubio-Donnadieu, F., (Eds.), Inst. Nal. Neurol. Neurocirg. UNAM, 1a. ed. pp: 192-213.

Dansky, L.V. y Finnett, R.H., 1991. Parenteral epilepsy, anticonvulsant drugs, and reproductive outcomes epidemiologic and experimental findings spanning three decades. 2. Human studies. *Reprod. Toxicol.* 5: 301-305.

Degrassi, F. y Rizzoni, M., 1982. Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh water pollution. *Mutation Res.* 97: 19-33.

De Marini, D.M., 1978. The mutagenicity of cigarette smoke condensate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* 53: 84-90.

De Marini, D.M., 1981. Mutagenicity of fractions of cigarette smoke condensate in *Neurospora crassa* and *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* 88: 363-374.

de Serres, F.J., 1978 Introduction: Utilization of higher plant systems as monitors of environmental mutagens. *Environ. Health Perspect.* 27: 3-6.

de Serres, F.J., 1992. Higher plants as effective monitors of environmental mutagens. Preface. *Mutation Res.* 270: 1.

Diario Oficial de la Federacion Mexicana. 1998. Secretaria de Salud, Norma Oficial Mexicana, NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos 31 de julio de 1998. pp: 18.

Díaz-Barriga, F., Santos, M.A., Yañez, L. Cuellar, J.A., Ostrosky-Wegman, P., Montero, R., Pérez, A., Ruiz, E., García, A. y Gómez, H., 1993. Biological monitoring of workers at a recently opened hazardous waste disposal site. *J. Exposure Anal. Environ. Epidemiol.* 3: 63-71.

Doll, R. y Peto, R., 1981. The causes of cancer quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Nat. Cancer Inst.* 66: 1193-1308.

Dulout, F.N., Olivero, O.A., von Guradze, H. y Pastori, M.C., 1982. Cytogenetic effect of malathion assessed by the micronucleus test. *Mutation Res.* 105: 413-416.

Easson, L.H. y Stedman, E., 1933. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. V. Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochem. J.*, 27: 1257.

Eluani, V.J.J., 1992. Estudio genotóxico del 4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (HEPB) y homólogos inferiores mediante la prueba de AMES. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. pp: 1-78

EPA., 1988. Guías para Evaluar Riesgos de Mutagenicidad. Metepec, México, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud . OPS/OMS., (Eds.), pp: 5-6.

Escalza, P., Cortés, F. y López-Campos, J.L., 1983. Action of Vinclozolin on cell division and its effectiveness in the production of chromosomal aberrations but not sister chromatid exchanges. *Cytobios*, 38: 149-158.

Fabro, S., Smith, R.L., y Williams, R.T., 1967. Toxicity and teratogenicity of optical isomers of thalidomide. *Nature*, 215: 296.

Feria-Velasco, A. y Chamorro, G., 1996. Evaluación de la citotoxicidad de la DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida (HEPB) por métodos histopatológicos en ratón adulto. *Arch. Neurocién. (Mex)*. 1:166-168.

Finnell, R.H. y Dansky, L.V. 1991. Parenteral epilepsy, anticonvulsant drugs, and reproductive outcome: epidemiologic and experimental findings spanning three decades; 1: Experimental studies. *Reprod. Toxicol.* 5: 281-299.

Flores, R.T., 1989. "Electroencefalograma y epilepsia". *Epilepsia: Un enfoque multidisciplinario*. México. Feria, V.A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio, D.F., (Eds.), Trillas. 2a. ed., pp: 209-217.

García, P.P., 1997. "La epilepsia como un problema de salud pública". Epilepsia: aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. México. Feria-Velasco, A.; Martínez de Muñoz, D. y Rubio-Donnadieu, F. (Eds.), UNAM. 1a. ed. PP: 402-414.

García-Sagredo, J.M., 1988. Effect of anticonvulsants on human chromosomes. *Mutation Res.* 204: 623-626.

Gaudin, D., Gregg, R.S. y Yielding, K.L., 1971. DNA repair inhibition: a possible mechanism of action of co-carcinogens. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 45: 630-634.

Gentile, J.M., Gentile, G.J., Townsend, S. y Plewa, M.J., 1985. *In vitro* enhancement of the mutagenicity of 4-nitro-o-phenylenediamine by plant S-9. *Environ. Mutagen.* 7: 73-85.

Gichner, T. y Velemínský, J., 1982. Genetic effects of N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs. *Mutation Res.* 99: 129-242.

Gichner, T., Velemínský, J. y Pokorný, V., 1982. Somatic mutations induced by maleic hydrazide and its potassium and diethanolamine salts in the *Tradescantia* mutation assay. *Mutation Res.* 103: 289-293.

Gichner, T. y Velemínský, J., 1984. Inhibition of dimethylnitrosamine-induced mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* by diethyldithiocarbamate and carbon monoxide. *Mutation Res.* 139: 29-33.

Gichner, T., Badayev, S.A., Demenchenko, S.I., Relichova, J., Sandhu, S.S., Usmanov, O. y Velemínský, J., 1994. *Arabidopsis* assay for mutagenecicity. *Mutation Res.* 310: 249-256.

Gichner, T., Cabrera López G., Wagner, E.D. y Plewa, M.J., 1994. Induction of somatic mutations in *Tradescantia* clone 4430 by three phenylenediamine isomers and the antimutagenic mechanism of diethyldithiocarbamate and ammonium meta-vanadate. *Mutation Res.* 306: 165-172.

Gill, B.S. y Sandhu, S.S., 1992. Application of the *Tradescantia* micronucleus assay for the genetic evaluation of chemical mixtures in soil and aqueous media. *Mutation Res.* 270: 65-69.

Godínez, R., Valdósera, R. y Martínez de Muñoz, D., 1996. Efecto de la DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenil propionamida (DL-HEPP) sobre la actividad eléctrica de neuronas identificadas del hipocampo. *Arch. Neurocién. (Mex.)*, 1: 178-181.

Goehring, R.R., Greenwood, T.D., Pisipati, J.S. y Wolfe, J.F., 1991. Synthesis and anticonvulsant evaluation of some new-2-bencylsuccinimides. *J. Pharm. Sci.* 80: 790-792.

Goldberg, M.A., 1982. "Anticonvulsivos". *Fundamentos de Farmacología. México.* Bevan, J.A., Thompson, J.H., Thomas, J.A., Jones, J.E., Beckerman, J.H., Lomax, P., Roth, R.H., Westfall, T.C., Paulus, H.E., Cho, A.K. HARLA S.A. de C.V., (Ed.), pp: 316-327.

Goldstein, A., Lewis, A. y Summer M.K., 1995. *Farmacología. México. Limusa (Ed.)*, pp: 1001

Gómez, L., 1993. Estudios farmacocinéticos preclínicos del nuevo anticonvulsivante, DL-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida (HEPP). Tesis de Doctorado. IPN. pp:1 98

Gómez, R.R., 1994. Determinación de colorantes sintéticos en dulces y su efecto genotóxico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UAQ. pp:1 144.

Gómez-Arroyo, S., Castillo-Ruiz, P. y Villalobos-Pietrini, R., 1986. Chromosomal alterations induced in *Vicia faba* by different industrial solvents: Thinner, toluene, benzene, n-heptane y ethyl acetate. *Cytologia*, 51: 133-142.

Gómez-Arroyo, S., Armienta, M.A., Cortés-Eslava, J. y Villalobos-Pietrini, R., 1997. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic-contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, México. *Mutation Res.* 394: 1-7.

Goodman, L.S. y Gilman, A., 1994. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. México. Goddman, L.S., Gilman, A., Rall, T.W., Nies, A.S., y Taylor, P. (Eds.), Medica Panamericana, pp: 49-63.

Grant, W.F., 1978. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. *Environ. Health Perspect.* 27: 3743.

Grant, F.W., Zinoveva-Stahevitch, A.E. y Zura, K.D., 1981. "Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens". In: Short-Term Tests for Chemical Carcinogens. Stich, H.F., y San, R.H. C. (Eds.), New York. Springer Verlag, pp: 200-216.

Grant, W.F., 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 99: 273-291.

Grant, W.F., Lee, H.G., Logan, D.M. y Salamone, M.F., 1992. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the *in situ* detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutation Res.* 270: 53-64.

Grant, W.F., 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Res.* 310: 175-185.

Grant, W.F. y Salamone, M.F., 1994. Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the international Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. *Mutation Res.* 310: 186-195.

Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romgna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparrys, Ph. y MacGregor, J.T., 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.* 18: 277-291.

Higashi, K., 1988. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutation Res.* 197: 273-288.

Hook, E.B., 1971. Monitoring of human birth defects and mutations to detect environmental effects. *Science*, 172: 1363-1397.

Hughenoltz, A.P. y Bruce, W.R. 1983. Radiation induction of mutations affecting sperm morphology in mice. *Mutation Res.* 107: 177-185.

Jaimes-Aguilar, B.A., 1993. Evaluación de la genotoxicidad de compuestos anticonvulsivos en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ciencias, UAEM. pp:1-69.

Jerina, D.M. y Daly, J.W., 1974. Arene oxides, a new aspect of drug metabolism. *Science*, 185: 573-582.

Kale, P.G. y Baum, J.W., 1982. Mutagenicity of cigarette smoke in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 105: 149-156.

Kanaya, N., Gill, B.S., Crover, I.S., Murin, A., Osiecka, R., Sandhu, S.S. y Andersson, H.C., 1994. *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutation Res.* 310: 231-247.

Kanaya, N., 1996. Activation of aniline by extracts from plants and induction of chromosomal damages in Chinese hamster ovary cells. *Genes Genet. Syst.* 71: 319-322.

Kaneko, S., 1991. Antiepileptic drug therapy and reproductive consequences: Functional and morphologic effects. *Reprod. Toxicol.* 5: 179-198.

Kasamaki, A., Takahashi, H., Tsumura, N., Niwa, J., Fujita, T. y Urasawa, S., 1982. Genotoxicity of flavoring agents. *Mutation Res.* 105: 387-392.

Kato, R., Vassanelli, P., Frontino, G. y Chiesara, E., 1964. Variation in the activity of liver microsomal drug-metabolizing enzymes in rats in relation to the age. *Biochem. Pharmacol.* 13: 1037-1040.

Kato, R., Takanaka, A. y Onada, K. I., 1970. Studies on age difference in mice for the activity of drug-metabolizing enzymes of liver microsomes. *Jap. J. Pharmacol.* 20: 572-575.

Katzung, B.G., 1996. *Farmacología Básica y Clínica. México. El Manual Moderno, S.A. de C. V., (Ed.), pp:1 847.*

Kaye, B., 1991. Chiral drug metabolism: a perspective. *Biochem. Soc. Trans.* 19: 443-475.

Kihlman, B.A., 1971. Root tips for studying the effects of chemicals on chromosomes. In: A. Hollaender (Ed.), *Chemical Mutagens*, Plenum Press, New York, pp. 489-514.

Kihlman, B.A., 1975. Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. *Mutation Res.* 31: 401-412.

Kihlman, B.A. y Andersson, H.C., 1984. Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. in: Kilbey, B.J., Legator, M.S., Nichols, W. y Tanel, C., (Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier, Amsterdam. pp: 531-554.

Kimball, J.W., 1996. "Naturaleza química de los genes." *Biología*. México. Addison-Wesley Iberoamericana (Eds.), 4a. ed., pp: 299-314

Klaassen, C.D., 1994. "Principios de Toxicología y tratamiento de la Intoxicación". *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. México. Goddman, L.S., Gilman, A., Rall, T.W., Nies, A.S., y Taylor, P. (Eds.), Medica Panamericana, pp: 69-74.

Knuutila, S., Siimes, M., Simell, O., Tammisto, P. y Weber, T., 1977. Long-term use of phenytoin: effects on bone-marrow chromosomes in man. *Mutation Res.* 43: 309-312.

Knuutinen, J. y von Wright, A., 1982. The mutagenicity of *Lactarius* mushrooms. *Mutation Res.* 103: 115-118.

Kulling, S.E. y Metzler, M., 1997. Induction of Micronuclei, DNA Strand Breaks and HPRT Mutations in Cultured Chinese Hamster V79 Cells by the Phytoestrogen Coumestrol. *Food Chem. Toxicol.* 35: 605-613.

Lander, C.M. y Eadie, M. J., 1990. Antiepileptic drug intake during pregnancy and malformed offspring. *Epilepsy Res.* 7: 77-82.

Ländete, J., 1983. Meiotic micronuclei induced by adriamycin in male rats. *Mutation Res.* 119: 79-82.

Léonard, A., de Meester, C., Fabry, L., de Sain-Georges, L. y Dumont, P., 1984. Lack of mutagenicity of diphenylhydantoin *in vitro* short-term tests. *Mutation Res.* 137: 79-88.

Lhotka, M.M., Plewa, J. y Gentile, J.M., 1987. Plant activation of m-phenylenediamine by tobacco, cotton and carrot cell suspension cultures. *Environ. Mol. Mutagen.* 10: 79-88.

Livingston, G.K.; Reed, R.N.; Olson, B.I. y lochey, J.E., 1990. Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. *Environ. Molec. Mutagen.* 15: 136-144.

Lin, Y.Ch., Ho, I.Ch. y Lee, T.Ch., 1989. Ethanol and acetaldehyde potentiate the clastogenicity of ultraviolet light, methyl methanesulfonate, mitomycin C and bleomycin in Chinese hamster ovary cells. *Mutation. Res.* 216: 93-99.

López, R.R.; Díaz, B.F.; Cano, M.R. y Arias, N.S., 1986. *Biología Celular. México. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. SEP. Alhambra Mexicana (Eds.), 1a. ed., pp: 109-122.*

Ma, T.H., 1979. Micronuclei Induced by X-rays and Chemical Mutagens in Meiotic Pollen Mother Cell of *Tradescantia*. A promising Mutagen Test System. *Mutation Res.* 64: 307-313.

Ma, T.H., 1981. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening. *Environ. Health Perspect.* 37: 85-90.

Ma, T.H., 1982a. *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis). A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 99:293-302.

Ma, T.H., 1982b. *Vicia* cytogenetic tests for environmental mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.* 99: 293-302.

Ma, T.H., 1983. *Tradescantia* micronuclei (Trad-MCN) test for environmental clastogens. in: A.R. Kolber, Wong, T.K., Grant, L.D., De Woskin R.S., y Hughes (Eds.), *In Vitro Toxicity Testing of Environmental Agents. Pt. A*, Plenum, New York. pp: 191-214.

Ma, T.H., 1990. *Tradescantia* micronucleus test on clastogens and *in situ* monitoring. in: M: L. Mendelson y R.J. Albertini (Eds.), *Mutation and the Environment. Part E*, Wiley-Liss, New York. pp: 83-90.

Ma, T.H. y Anderson, V.A., 1978. Micronuclei induced by ultraviolet light and chemicals mutagens in pollen mother cells of *Tradescantia*. *Environ. Mut.* 1: 123-124.

Ma, T.H., Sparrow, A.H., Schirer, L.A. y Nauman, A.F., 1978. Effect of 1,2-dibromoethane (DBE) on Meiotic Chromosomes of *Tradescantia*. *Mutation Res.* 58: 251-258.

Ma, T.H., Jr. Kontos, G.J. y Anderson, V.A., 1980. Stage sensitivity and dose response of meiotic chromosomes of pollen mother cells of *Tradescantia* to X-rays. *Environ. Exp. Bot.* 20: 169-174.

Ma, T.H., Lower, W.R., Harris, F.D., Poku, J., Anderson, V.A., Harris, M.M. y Bare, J.L., 1983. Evaluation by *Tradescantia*-micronucleus test of the mutagenicity of internal combustion engine exhaust fume from diesel and diesel-soybean oil mixed fuels. in: M. D. Waters, S.S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, N. Chernoff y S. Nesnow (Eds.), *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III*, Plenum, New York. pp: 89-99.

Ma, T.H., Harris, M.M., Anderson, V.A., Ahmed, I., Mohamad, K., Bare, J.L. y Guanghai, L., 1984. *Tradescantia*-micronucleus (MCN-TRAD) tests on 140 health related agents. *Mutation Res.* 138: 157-167.

Ma, T.H., Anderson, V.A., Harris, M.M., Neas, R.E. y Lee, T.S., 1985. Mutagenicity of drinking water detected by the *Tradescantia* micronucleus test. *Can. J. Genet. Cytol.* 27:143-150.

Ma, T.H., Cabrera, G.L., Cebulska-Wasilewska, A., Chen, R., Loarca, F., Wandenberg, A.L. y Salamone, M.F., 1994a. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutation Res.* 310: 211-220.

Ma, T.H., Cabrera, G.L., Chen, R., Gill, B.S., Sandhu, S.S., Vandenberg, A.L. y Salamone, M.F., 1994b. *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutation Res.* 310: 221-230.

Ma, T.H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E.V., Arreola, G.A. y Zhang H., 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Res.* 334: 185-195.

Madrigal, E., Guerra, A. y Ortiz, R., 1988. Estudio genotóxico del difenilhidantoinato de sodio en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro*. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 19: 27-32.

Madrigal, E., Cassani, M. y Huerta, H., 1989. Estudio citogenético *in vitro* del efecto producido por el fenobarbital. *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, 20: 20-25.

Madrigal, E., Cassani, M. y Huerta, H., 1990. Estudio Citogenético *in vitro* del efecto producido por la carbamazepina. *Rev. Mex. Pat. Clin.* 37: 127-130.

Madrigal-Bujaidar, E., Rojas, C.A., Ramos, C.A., Rosas, P.E. y Díaz Barriga-Arceo, S., 1990. Mouse bone marrow cytogenetic damage produced by residues of tequila. *Mutation Res.* 241: 133-137.

Madrigal-Bujaidar, E., Calderón-Vargas, R. y Díaz Barriga-Arceo, S., 1991. Sister chromatid exchange frequencies induced *in vivo* an *in vitro* by the residues of brandy. *J. Toxicol. Environ. Health.* 32: 479-486.

Maldonado, M., 1992. *La Epilepsia: Un Antiguo Mal del Siglo XXI*. México. ICyT, CONACYT. 14: 33-39.

Maitre, M., Ciesielski, L., Lehmann, A., Kempf, E. y Mandel, P., 1974. Protective effect of adenosine and nicotinamide against audiogenic seizure. *Biochem. Pharmacol.* 23: 2807-2816.

Manahan, S.E., 1992. "Toxicology". *Toxicological Chemistry*. New York. Lewis Publishers (Ed.), 2a. ed., pp: 193-229.

Martínez de Muñoz, D. y Oscos, A., 1977. Effects of cyclic analogs of GABA on protein synthesis and discrimination learning. *Psychopharmacology*, 54: 149-152.

Martínez de Muñoz, D. 1991. "Cernimiento de anticonvulsivos". *Epilepsia Experimental*. Otero, E. (Ed.), Academia Mexicana de Neurología, A. C. Series en Neurología. No. 2. pp: 257-266.

Martínez de Muñoz, D. y Mandel, P., 1997. "Mecanismos de acción de fármacos anti-epilépticos". En: *Epilepsia: aspectos neurobiológicos, médicos y sociales*. México. Feria-Velasco, A; Martínez de Muñoz, D. y Rubio-Donnadieu, F. (Eds.), Ins. Nal. Neurol. Neurocirg. pp: 158-172.

Martínez, C.R. y Velázquez, L.R., 1995. Identificación, cuantificación y su posible efecto genotóxico de colorantes sintéticos presentes en refrescos de mayor venta en la ciudad de Querétaro, Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UAQ. pp: 1-196.

Mayes, A.P., 1997. "Carbohidratos de importancia fisiológica". *Bioquímica de Harper*. Murray, K.R.; Granner, D.K.; Mayes, A.P.; Rodwell, W.V. México. El Manual Moderno (Ed.), 14ª. Ed., pp 166-167.

Mendenhall, W. y Sincich, T., 1997. "Regresión lineal simple". *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias*. México. Prentice:Hall Hispanamericana S. A., (Ed.), 4a. ed., pp: 561-569; 1099

Meyers, F.H., Jawetz, E. y Goldfien, A., 1982. "Medicamentos anticonvulsivos". *Farmacología Clínica*. México. El Manual Moderno (Ed.), pp: 302-306.

Meza-Toledo, S.E., Zenteno-García, S.T., Martínez de Muñoz, D. y Carvajal-Sandoval, G., 1990. New homologous series anticonvulsants: phenyl alcohol amides, synthesis and pharmacological evaluation. *Arzneim. Forsch. Drug. Res.* 40: 1289-1291.

Mohandas, T. y Grant, W.F., 1972. Citogenetic effects of 2,4-D and amitrole in relation to nuclear volume and DNA content in some higher plants. *Can. J. Genet. Citol.* 14: 773-783.

Morrison, R.T. y Boyd, R.N., 1996. *Química Orgánica*. México. Fondo Educativo Interamericano (Ed.), pp: 120-137.

Nauman, C.H., Sparrow, A.H. y Schairer, L.A., 1976. Comparative effects of ionizing radiation and two gaseous chemical mutagens on somatic mutation induction in one mutable and two non-mutable clones of *Tradescantia*. *Mutation Res.* 38: 53-70.

Nauman, C.H., Schairer, L.A. y Sparrow, A.H., 1978. Influence of temperature on spontaneous and radiation-induced somatic mutations in *Tradescantia*-stamen hairs. *Mutation Res.* 50: 207-218.

Neel, J.V. y Bloom, A.D., 1969. The detection of environmental mutagens. *Med. Clin. of N. Am.* 53: 1243- 1247.

Nilan, R.A. y Vig, B.K., 1976. "Plant test systems for detection of chemical mutagens." In *Chemical Mutagens. Vol. 4.* Holsander, A., (Ed.), New York. Plenum. pp: 143-170.

Obe, G., Natarajan, A.T., Meyer, M. y Den Hertog, A., 1979. Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood *in vitro*, and of SCEs in bone-marrow cells of mice *in vivo* by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutation Res.* 68: 291-294.

O' Neill, J.P., 1982. Induction and expression of mutations in mammalian cells in the absence of DNA synthesis and cell division. *Mutation Res.* 106: 113-122.

OPS., 1980. *Criterios de Salud Ambiental 6.* Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte I. México. OPS/OMS. Caps 4 y 7.

Orizaga, S.J., 1987. "Anticonvulsivos". *Guía Profesional de Medicamentos.* México. Manual Moderno (Ed.), 2a. ed., pp: 270-285.

Pacheco, Mauro F., Velasco, R. y Flores, A.M. 1996. Estudio electrofisiológico de la DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida y de sus homólogos inferiores sobre la actividad espontánea del hipocampo. *Arch. Neurocién.* 1: 90-93.

Parry, J.M. y Wilcox, P., 1982. The genetic toxicology in fungi of 4-chloromethylbiphenyl (4CMB), 4-hidroximethylbiphenyl (4HMB) and benzyl chloride (BC). Survey of the Results of the U.K.E.M.S. Collaborative Genotoxicity Trial 1981. *Mutation Res.* 100: 185-200.

- Paschin, Y.V., Zacepilova, T.A. y Kosachenko, V.I., 1982. Induction of dominant lethal mutations in male mice by potassium dichromate. *Mutation Res.* 103: 345-347.
- Paulus, H. E., 1982. "Obtención y evaluación de nuevos fármacos". *Fundamentos de Farmacología*. México. Bevan, J.A., Thompson, J.H., Thomas, J.A., Jones, J.E., Beckerman, J.H., Lomax, P., Roth, R.H., Westfall, T.C., Paulus, H.E., Cho, A.K. HARLA S.A. de C. V., (Ed.), pp: 52-61
- Piña-Calva, A. y Madrigal-Bujaidar, E., 1993. SCE frequencies induced by ethanol, tequila and brandy in mouse bone marrow cells *in vivo*. *Toxicol. Lett.* 66: 1-5.
- Piña-Calva, A., Quezada-Medina, R. y Madrigal-Bujaidar, E., 1997. Synaptonemal complex damage in mouse spermatocytes exposed to tequila and brandy. *Cancer Detect. Prevent.* 21: 196-200.
- Plewa, M.J. y Gentile, J.M., 1976. Mutagenicity of atrazine: a maize-microbe bioassay. *Mutation Res.* 38: 287-292.
- Plewa, M.J. y Gentile, J.M., 1982. The activation of chemicals into mutagens by green plants. In: *Chemical Mutagens. Principles and Methods for their detection*. New York. de Serres, F.J. y Hollaender, A. (Eds.), Plenum. 7: 401-420.
- Plewa, M.J. y Wagner, E.D., 1993. Activation of promutagens by green plants. *Annu. Rev. Genet.* 27: 93-113.
- Porter, R.J. y Meldrum, B.S., 1996. "Antiepilépticos". *Farmacología Básica y Clínica*. México. Katzung, B.G. *Manual Moderno*, S.A. de C. V., (Ed.), pp:411-434
- Potier, M., Lakhdar, B., Mdrlet, D. y Cambar, J., 1995. Interest and limits of human tissue and cell use in pharmacotoxicology. *Cell. Biol. Toxicol.* 11: 133-139.
- Quah, S.K., von Borstel, R.C. y Hasting, P.J., 1980. The origin of spontaneous mutation during mitosis in *Sacharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 96: 819-839.
- Radford, A.E., Dickson, W.C., Massey, J.R. y Bell, C.R., 1974. "Embryological Evidence". *Vascular Plant Systematics*. Harper & Row, Publishers, N. y Evanston, Sn. Foo., London. Chap. 10. pp: 237-258.

Rall, T.W. y Schleifer, L.S., 1994. "Fármacos efectivos en el tratamiento de la epilepsia". Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. México. Goddman, L.S., Gilman, A., Rall, T.W., Nies, A.S., y Taylor, P. (Eds.), Médica Panamericana pp: 433-457.

Rang, H.P. y Dale, M.M., 1992. "Fármacos utilizados en el tratamiento de los trastornos motores: Epilepsia, Parkinsonismo y Espasticidad." Farmacología. México. Churchill Livingstone (Ed.), pp: 741-764.

Rank, J. y Nielsen, M.H., 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Res.* 390: 121-127.

Rédei, G.P., 1982. Mutagen assay with *Arabidopsis*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 99: 243-255.

Ren, L., Yang, J. y Zahng, H., 1991. Use of the cytokinesis-block micronucleus method in mouse splenocytes. *Mutation Res.* 262: 119-124.

Rodríguez, E., Ruiz Flores, E., Chamorro, G., Salazar, Ma. y Juárez, F.G. 1998. Evaluación de la posible actividad de alfa-asarona en células gaméticas y somáticas de vegetales. V. Congreso Conjunto de la Sociedad Mexicana de Genética y Sociedad Mexicana de Toxicología Genética. Acapulco, Guerrero. México.

Rodríguez, M.M.E., 1982. Detección de la actividad mutagénica por aguas residuales. Estudio comparativo con dos sistemas biológicos de prueba *Tradescantia* y *Allium cepa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UAQ. pp: 1-86.

Rodwell, W.V., 1997. "Nucleótidos". Bioquímica de Harper. Murray, K.R.; Granner, D.K.; Mayes, A.P.; Rodwell, W.V. México. El Manual Moderno (Ed.), 14ª. Ed., pp 419-423.

Rojas, M.J.I., 1992. Aislamiento, identificación y cuantificación de aditivos colorantes presentes en bebidas no carbonatadas no alcohólicas de mayor consumo en la Cd. de Querétaro y su relación con posibles efectos genotóxicos. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UAQ. pp:1 189.

Rubio, D.F., Feria, V.A. y Martínez de Muñoz, 1989. "Generalidades y clasificación de la epilepsia". *Epilepsia: Un enfoque multidisciplinario*. México. Feria, V.A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio, D.F., (Eds.), Trillas. 2a. ed., pp: 19-27.

Ruiz, F.L.E. y Ma, T.H., 1991. Valoración del efecto mutagénico de tres nuevos productos químicos (sintéticos) con perspectiva de salir al mercado. *Avances. UAQ. Año II. No. 8 enero 1991*, pp: 38-39.

Ruiz, F.L.E., Valtierra, M.E., Lecona, S., Pérez, S.A. y Ma, T.H., 1992. *Tradescantia-micronucleus (MCN-TRAD) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring*. *Mutation Res.* 270: 45-51.

Ruiz, F.L.E. y Guerrero, H.G., 1994. Frecuencia espontánea de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* Clon 4430. Informe Final. CEACA. UAQ. pp: 15

Ruiz, F.L.E. y Rea, L.M.A., 1995. Genotoxicidad de la atmósfera en la Ciudad de Querétaro. *Investigación*. No. 6: 26-34.

Sadao, I., 1992. *Tradescantia stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: its responses to ionizing radiations and chemical mutagens, and some synergistic effects found*. *Mutation Res.* 270: 3-22.

Salam, A.Z. El-Abidin., Hussein, E.H.A., El-Itriby, H.A., Anwar, W.A. y Mansour, S.A., 1993. The mutagenicity of Gramoxone (paraquat) on different eukaryotic systems. *Mutation Res.* 319: 89-101.

Salazar, M., Rojas, M., Chamorro, G. y Carbajal, G., 1989. Estudio teratogénico de la 4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida en rata. VI Congreso Brasileiro de Toxicología. Libro de resúmenes. Sao Paulo, Brasil. pp: 2-14.

Sánchez, R.G., 1987. Evaluación de la potencia anticonvulsionante y de la toxicidad de la 4-hidroxi, 4-etil, 4-fenilbutiramida y de sus homólogos inferiores. Tesis de Maestría. CINVESTAV, IPN. pp: 86.

Sandhu, S.S., de Serres, F.J., Gopalan, H.N.B., Grant, W.F., Valeminsky, J. y Becking, G.C., 1991. Status report of the International Programme on Chemical Safety Collaborative Study on plant test systems. *Mutation Res.* 257: 19-25.

- Sardas, S., Ada, M., Karakaya, A.E. y Aydin, N., 1994. Sister-chromatid exchanges in epileptic patients on anticonvulsant therapy. *Mutation Res.* 313: 21-24.
- Schaumann, B., Johnson, S.B., Wang, N. y Brunt, S.V., 1985. Sister chromatid exchanges in adult epileptic patients on phenytoin therapy. *Environ. Mutagen.* 7: 711-714.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutation Res.* 31: 9-15.
- Seo, K.Y., Riley, J., Cortez, D., Wagner, E.D. y Plewa, M.J., 1993. Characterization of stable high molecular weight mutagenic product(s) of plant-activated m-phenylenediamine. *Mutation Res.* 299: 11-120.
- Sezzano, P., Raymondi, A., Arboix, M. y Pantarotto, C., 1982. Mutagenicity of diphenylhydantoin and some of its metabolites towards *Salmonella typhimurium* strains. *Mutation Res.* 103: 219-228.
- Sipes, I.G. y Gandolfi, A.J., 1991. "Biotransformation of Toxicants". *Toxicology The Basic Science of Poisons.*, Amdur, M.O., Doull, J., Klaassen, C.D., Casarett, (Eds), Mc Graw-Hill, Inc., pp: 88.89
- Smith, C.M. y Reynard A.M., 1993. *Farmacología. México. Medica Panamericana* (Ed.), pp: 318-336.
- Snow, R., 1963. Alcoholic hydrochloric acid-carmin as a stain for chromosomes in squash preparations. *Stain Tech.* 38: 9-13.
- Sorsa, M., Norppa, H., Leppänen, A. y Rimpela, M., 1982. Induction of sister-chromatid exchange in human lymphocytes by smoke condensates from different brands of cigarette. *Mutation Res.* 103: 149-153.
- Sparrow, A.H., Schairer, L. y Villalobos-Pietrini, R., 1974. Comparasion of somatic mutation rates induced in *Tradescantia* by chemical and physical mutagens. *Mutation Res.* 26: 265-276.
- Stansfield, W. D., 1997. "Las bases bioquímicas de la herencia". *Genética. México, Mc Graw-Hill* (Ed.), 3a. ed., pp: 348-351.

- Swinyard, E.A., 1992. "Introducción de drogas nuevas". Farmacia. México. Remington, Médica Panamericana (Ed.), 17a. ed., Vol. 2. pp: 1836-1852.
- Takehisa, S., Kanaya, N. y Rieger, R., 1982. Induction of SCEs in CHO cells by extracts from *Vicia faba* roots exposed to ethanol. *Mutation Res.* 105: 169-174.
- Taneja, N., Kucheria, K., Jain, S., Tandon, J.K. y Maheshwari, M.C., 1992. Sister-chromatid exchanges are increased in epileptics, but not by sodium valproate. *Mutation Res.* 283: 233-235.
- Tapia, P.F., Madrigal-Bujaidar, E. y Aguirre, V.S., 1992. The effect of tequila in the synaptonemal complex structure of mouse spermatocytes. *Mutation Res.* 281: 283-286.
- Tapia, R., 1979. "The synaptic function of GABA and its relationship to convulsive states". *Neurobiología. Symposium Internacional. México. Velasco-Suárez M.M. y Escobedo, R.F. (Eds.), pp: 95-101*
- Tates, A.D., Neuteboom, I., de Vogel, N. y den Engelse, L., 1983. "The induction of chromosomal damage in rat hepatocytes and lymphocytes". I. Time-dependent changes of the clastogenic effects of diethylnitrosamine, dimethylnitrosamine and ethyl methanesulfonate. *Mutation Res.* 107: 131-151.
- Tempelaar, M.J., de Both, M.T.J. y Versteegh, J.E.G., 1982. Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Feulgen-staining procedure for *Vicia faba*. *Mutation Res.* 103: 321-326.
- Trzos, R.J., Petzold, M.N. y Swenberg, J.A., 1978. The evaluation of sixteen carcinogens in the rat using the micronucleus test. *Mutation Res.* 58: 79-86.
- Upshall, A. y Johnson, P.E., 1981. Thiram-induced abnormal chromosome segregation in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* 89: 297-301.
- Valeminsky, J. y Gichner, T., 1968. The mutagenic activity of nitrosamines in *Arabidopsis thaliana*. *Mutation Res.* 5: 429-431.

Valeminsky, J. y Gichner, T., 1988. Mutagenicity activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. *Mutation Res.* 197: 221-242.

van Zeeland, A.A., Mohn, G.R., Aaron, C.S., Glickman, B.W., Brendel, M., de Serres, F.J., Hung, C.Y. y Brockman, H.E., 1983. "Molecular dosimetry of the chemical mutagen ethyl methanesulfonate". Quantitative comparison of the mutagenic potency in *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* 119: 45-54.

Vant' Hof, J. y Schairer, L.A., 1982. *Tradescantia* assay system for gaseous mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* 99: 303-315.

Vega, S., 1985a. "Genotoxicidad y daño al sistema reproductor". En: Evaluación Epidemiológica de Riesgos Causados por Agentes Químicos Ambientales. Toxicología V. México. OPS/OMS, pp: 3-5.

Vega, S., 1985b. "Evaluación del riesgo en la exposición a sustancias químicas". En: Evaluación Epidemiológica de Riesgos Causados por Agentes Químicos Ambientales. Toxicología VI México. OPS/OMS, pp: 2-17.

Velasco-Suárez, M., 1979. Gamma-hidroxi, gamma-etil, gamma-fenil-butiramida (HEPB) nuevo agente anticonvulsivante agonista del GABA. Neurobiología. Simposium Internacinal de Neurobiología, pp: 103-115.

Vogel, E., 1981. Recent Achievements with *Drosophila* as an Assay System for Carcinogens, in: H.F. Stich y R.H.C. San (Eds.), *Short-Term Tests for Chemical Carcinogens*. Springer, New York. pp: 379-398.

Vogel, E.W., Zijlstra, J.A. y Blijleven, W.G.H., 1983. Mutagenic activity of selected aromatic amines and polycyclic hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 107: 53-77.

Waksvik, H. y Boysen, M., 1982. Cytogenetic analyses of lymphocytes from workers in a nickel refinery. *Mutation Res.* 103: 185-190.

Wayne, W.D., 1977. Bioestadística. México. Limusa (Ed.), pp: 132-137.

Watkins, P., 1982. Testing for mitotic crossingover and induced aneuploidy using *Aspergillus nidulans* as part of the ukems test programme. *Mutation Res.* 100: 133-138.

Watson, W.A.F., 1982. The mutagenic activity of quercetin and kaempferol in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 103: 145-147.

Winchester A. M., 1977. "La duplicación de los genes y de las células". *Genética. México. C.E.C.S.A (Ed.)*, pp: 49-60.

Wright, Ch., Gingold, E., Stanley, V. y Crofton-Sleikgh, C., 1983. Mutagenic activity of Kathon, an industrial biocide and cosmetics preservative containing 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one. *Mutation Res.* 119: 35-43.

Wyrobek, A.J. y Bruce, W.R., 1978. The induction of sperm shape abnormalities in mice and humans, in: A. Hollaender y F.J. de Serres (Eds.), *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*. Vol. 5. Plenum, New York. pp: 257-285.

Xing, W. y Zhang, Z., 1990. A comparison of SCE test in human lymphocytes and *Vicia faba*: a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens. *Mutation Res.* 241: 109-113.

Yadav, A.S., Washishat, R.K. y Kakar, S.N., 1982. Testing of endosulfan and fenitrothion for genotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* 105: 403-407.

Yerby, M.S., 1991. Pregnancy and epilepsy. *Epilepsy*, 32 Suppl. 6: 551-559.

Zimmermann, F.K., 1971. Genetic aspects of carcinogenesis. *Biochem. Pharm.* 20: 985-989.

Zimmerman, F.K., 1982. Can we determine mutagenicity or only a mutagenic potential? *Mutation Res.* 92: 3-7.