



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

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



Departamento de
Exámenes Profesionales

**ESTUDIO DEL DAÑO AL ADN EN CÉLULAS DE
ESTÓMAGO DE RATÓN ADMINISTRADO CON LOS
DERIVADOS CARBÁMICOS LQM919 Y LQM996**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :

JENNY ARRATIA QUIJADA

ASESOR: Dra. SANDRA DÍAZ-BARRIGA ARCEO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



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

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

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

_____ " Estudio del daño al ADN en células de estómago de ratón administrado con los derivados carbámicos LQM919 y LQM996 " _____

que presenta la pasante: _____ Jenny Arratia Quijada _____
con número de cuenta: 09950778-1 para obtener el título de :
_____ Química Farmacéutica Bióloga _____

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

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 5 de Marzo de 2004

PRESIDENTE	MC. Luisa Martínez Aguilar	
VOCAL	QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda	
SECRETARIO	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
SEGUNDO SUPLENTE	MC. Isela Álvarez González	

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por permitirme entrar a su casa y conocer lo que verdaderamente es la UNAM.

A mi asesora, Dra. Sandra: Gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted, por compartir sus conocimientos, por la atención y por el tiempo dedicado para llevar a cabo esta tesis. Gracias por su amistad y consejos.

A las profesoras del laboratorio de Citogenética, que me aportaron consejos y me ayudaron a lo largo de la elaboración de este trabajo. Gracias por hacer más agradable mi estancia dentro del laboratorio.

A mis sinodales, por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo y sus aportaciones para la mejora del mismo.

DEDICATORIAS

A mi madre, porque siempre fuiste mi amiga, mi compañera y mi verdadero apoyo a lo largo de toda mi formación. Fuiste mi incondicional desde que decidí tomar este camino, sin ti no hubiera logrado llegar hasta el final. Gracias por darme tú confianza y la libertad de elegir. TE AMO.

A mi padre, porque con tú dureza formaste mi carácter y me obligaste a demostrar que podía hacer las cosas que yo quería, aún en contra de ti. El esfuerzo valió la pena. TE QUIERO.

A mi hermano, a mis abuelos, a mi cuñada, a mi sobrino, a Tete y a toda la familia Arratia: Por los consejos, las sonrisas y abrazos que en el algún momento me brindaron y por compartir esta etapa conmigo; soy la primera y espero no ser la última.

A David: Por llegar a mi vida en el momento preciso, abrir una puerta que creía cerrada, y cambiar mi vida por completo dándole un nuevo matiz cada día, me convertiste en la persona más feliz del mundo. Por ser la ilusión de cada día.

A Chío, Manolo, Kenia, Chucho, César: Siempre me ofrecieron su verdadera amistad, consejos, respeto, confianza y apoyo en los momentos difíciles; es una fortuna encontrar personas como ustedes y saber que puedo contar con ellas, los quiero mucho.

A los distinguidos miembros de la generación 26, que permitieron que yo me llevaré algo de ellos dentro y fuera del salón de clase (Ruth, Norma, Adriana, Magali, Aarón, Vladimir, Lisbeth, Yesenia, Liliana, Carlos, Olga Lidia, Claudia M., Ángel M., Ezequiel, Abraham, Gaddiel e Israel) e hicieron muy divertida la estancia en la facultad.

A todo los compañeras (os) del laboratorio por los momentos de trabajo y diversión que compartimos.

**NUNCA CONSIDERES EL ESTUDIO COMO UN DEBER,
SINO COMO UNA OPORTUNIDAD PARA PENETRAR EN
EL MARAVILLOSO MUNDO DEL SABER.**

Albert Einstein

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Citogenética L-521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.

Los compuestos carbámicos fueron proporcionados por el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano.

CONTENIDO

Índice de tablas y figuras	i
Abreviaturas	ii
Resumen	iii
Introducción	v
1. Generalidades	
1.1 Genotoxicología	
1.1.1 Desarrollo histórico	1
1.1.2 Mutagénesis	3
1.1.3 Tipos de efectos mutagénicos	4
1.1.4 Mecanismos de formación de las mutaciones	5
1.1.5 Pruebas de genotoxicidad	6
1.1.6 Importancia del estudio genotóxico	7
1.2 Carbamatos	
1.2.1 Generalidades	9
1.2.2 Aplicaciones	10
1.2.3 Modo de acción	11
1.2.4 Farmacocinética	14
1.2.5 Toxicidad	15
1.3 Metocarbamol	
1.3.1 Características	19
1.3.2 Preparación	19
1.3.3 Farmacodinamia	20
1.3.4 Farmacocinética	20
1.3.5 Indicaciones terapéuticas	21
1.3.6 Reacciones secundarias y adversas	21
1.3.7 Toxicidad y precauciones	22

1.4 Nuevos derivados carbámicos	
1.4.1 Síntesis de los nuevos derivados carbámicos	23
1.4.2 Pruebas biológicas	24
1.4.3 Pruebas toxicológicas	25
1.4.4 Futuro de los nuevos derivados carbámicos	26
1.5 Ensayo cometa	
1.5.1 Generalidades	29
1.5.2 Principio de detección de rupturas al ADN	30
1.5.3 Evaluación del daño al ADN	31
1.5.4 Aplicaciones y ventajas	32
1.5.5 Tipos de tejidos utilizados	33
1.5.6 Sustancias estudiadas	35
1.6 El estómago	
1.6.1 Anatomía del estómago	36
1.6.2 Morfología del estómago	39
1.6.3 Función del estómago	41
1.6.4 Regeneración normal de la mucosa gástrica	42
1.6.5 Posibles daños al epitelio gástrico	42
2. Justificación	46
3. Objetivos	47
4. Metodología	
4.1 Material biológico	48
4.2 Material	48
4.3 Equipo	48
4.4 Reactivos	49
4.5 Diagrama del proceso experimental para el estudio genotóxico de los derivados carbámicos LQM919 y LQM996	50
4.6 Métodos	
4.6.1 Inducción de animales	51
4.6.2 Obtención del órgano	51
4.6.3 Evaluación del efecto ulceroso	51

4.6.4	Obtención de suspensión celular	52
4.6.5	Conteo celular y viabilidad	52
4.6.6	Técnica de ensayo cometa	53
4.6.6.1	Preparación de laminillas	53
4.6.6.2	Electroforesis	53
4.6.6.3	Tinción de las preparaciones	54
4.6.6.4	Evaluación del daño al ADN	54
5.	Resultados	
5.1	Efecto ulceroso	55
5.2	Conteo y viabilidad celular	57
5.3	Análisis del índice de daño al ADN	59
5.4	Distribución porcentual celular de la relación longitud/ diámetro	62
6.	Discusión	64
7.	Conclusiones	70
	Apéndice: Preparación de soluciones	71
	Referencias	75

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas.

Tabla 1. Ensayos de genotoxicidad	6
Tabla 2. Algunos usos de los carbamatos	10
Tabla 3. Propiedades de los 4-R-fenilcarbamatos de etilo	28
Tabla 4. Distribución de grupos de trabajo	51
Tabla 5. Efecto ulceroso producido por los diversos tratamientos	56
Tabla 6. Viabilidad y conteo celular	58
Tabla 7. Valores promedio +/- D.E. del índice de daño sobre las células del epitelio gástrico a las dosis empleadas de los diversos tratamientos	59

Figuras.

Figura 1. Estructura básica de los carbamatos	9
Figura 2. Interacción del carbamato con el grupo hidroxilo de la serina en el sitio activo de la AchE	13
Figura 3. Estructura del metocarbamol	19
Figura 4. Reacción general de síntesis de los 4-R-fenilcarbamatos de etilo	23
Figura 5. Anatomía del estómago	37
Figura 6. Morfología del estómago y composición celular de una glándula gástrica	39
Figura 7. Valores promedio +/- D.E. del índice de úlcera producido por los derivados carbámicos, el testigo positivo y el testigo negativo	57
Figura 8. Valores promedio +/- D.E. del índice de daño producido por los derivados carbámicos, el testigo positivo y el testigo negativo	60
Figura 9. Fotografías representativas de la apariencia de los núcleos celulares después del SCGE en condiciones alcalinas y tinción con bromuro de etidio (100X)	61
Figura 10. Distribución del daño celular producido por los diversos tratamientos en base a la relación longitud/ diámetro	62

ABREVIATURAS

AchE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATP	Adenosintrifosfato
D.E.	Desviación estándar
DE₅₀	Dosis efectiva media
DL₅₀	Dosis letal media
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPC/ ENC	Relación de eritrocitos policrómicos/ normocrómicos
EPCMN	Eritrocitos policrómicos con micronúcleos
h	Horas
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
L/D	Relación longitud/ diámetro
LMPA	Agarosa de bajo punto de fusión
MN	Micronúcleos
PBS	Solución buffer de fosfatos
SCGE	Electroforesis unicelular en gel de agarosa
SNC	Sistema nervioso central
SSF	Solución salina fisiológica

RESUMEN

ESTUDIO DEL DAÑO AL ADN EN CÉLULAS DE ESTÓMAGO DE RATÓN ADMINISTRADO CON LOS DERIVADOS CARBÁMICOS LQM919 Y LQM996.

El diseño y síntesis de nuevos compuestos químicos se ha incrementado rápidamente, con el fin de descubrir moléculas útiles en medicina que presenten mejores alternativas a las ya existentes en cuanto a costo y efectividad biológica. Así, los derivados carbámicos se sintetizaron en el Laboratorio de Química Medicinal de la FES-Cuautitlán, de acuerdo a una comparación teórica de la influencia de sustituyentes presentes en fármacos antihelmínticos y antibacterianos. Estos compuestos han mostrado efectividad contra *Hymenolepis nana* y 13 géneros de bacterias Gram negativas, dentro de las que se encuentran el género *Vibrio* y la bacteria *Helicobacter pylori*; esto ha permitido actualmente solicitar la patente de los compuestos, por lo cual se requiere que éstos sean sometidos a pruebas de toxicidad como parte de los estudios preclínicos realizados a todo nuevo compuesto.

Dentro de las pruebas de toxicidad se encuentra el estudio de la genotoxicidad de los derivados carbámicos *in vivo*, el cual es el objetivo principal de este trabajo; además se evalúa el posible efecto ulceroso de los compuestos.

Para ello se aplicó la técnica Ensayo de Electroforesis Unicelular en Gel de Agarosa (Ensayo Cometa) sobre las células del estómago de ratón perteneciente a la cepa CD1. Se establecieron grupos de 3 animales cada uno y se trataron oralmente con los siguientes compuestos: aceite de maíz (0.2 mL), LQM919 (30 mg/ kg) y LQM996 (30 mg/ kg). En el estudio se incluyó al metocarbamol (100 mg/ kg), el cual es un carbamato cuya administración también se realizó vía oral.

El efecto ulceroso se evaluó a las 24 horas posteriores a la administración, los derivados carbámicos mostraron lesiones, siendo mayor el índice de úlcera en el caso del LQM919 (3.0 mm) que en el LQM996 (1.7 mm), en comparación con el aceite de maíz (1.3

mm); sin embargo, ninguno de los compuestos presentó un índice de úlcera tan elevado como el metocarbamol (5.7 mm).

La formación de cometas resulta de la capacidad de un xenobiótico para dañar al ADN, el cual se manifiesta por la aparición de rupturas sencillas o dobles a la cadena de ADN o por la presencia de sitios álcali lábiles.

El derivado carbámico LQM919 no mostró un índice de daño al ADN significativo con respecto al testigo negativo (L/D de 1.0), a diferencia del LQM996; sin embargo, no hubo diferencia significativa entre ambos derivados carbámicos (L/D de 1.2 y 1.4 para el LQM919 y LQM996, respectivamente). Al comparar los nuevos compuestos con el metocarbamol, éste sí presentó genotoxicidad (L/D de 3.3).

En cuanto a la distribución celular del daño producido por los derivados carbámicos, se encontró que el LQM919, no presentó daño en el 79% de las células, mientras que el LQM996 presentó daño en el 69% de las células; sin embargo, ambos mostraron diferencia significativa con respecto al metocarbamol, que provocó daño en el 89% de las células.

Puesto que los derivados carbámicos no presentan un efecto ulceroso ni índice de daño al ADN considerable, se hace posible su uso como antihelmínticos y antibacterianos efectivos, de menor costo y toxicidad que los compuestos ya existentes con tal acción biológica, una vez que cumplan con todos los estudios preclínicos y clínicos correspondientes.

INTRODUCCIÓN

El hombre está expuesto a un gran número de agentes físicos y químicos que pueden dañar al ADN, los cuales contribuyen a incrementar la incidencia de mutaciones y por ende de padecimientos genéticos diversos (Velázquez, 2000), dado que la información genética es susceptible a cambios. Esto es una cuestión de interés general ya que el daño o lesión producido al ADN puede tener algún efecto sobre la progenie de las células, por el hecho de que la información genética se transmite de generación en generación, con o sin cambios aparentes. Por otro lado, el daño al ADN parece relacionarse de alguna manera con la carcinogenicidad de químicos particulares, de ahí la importancia en la realización de estudios de genotoxicidad a tales agentes.

Así, los agentes mutágenos (físicos, químicos o biológicos) que se encuentran en el ambiente pueden ser capaces de interactuar directamente con el ADN, o con alguno de los grandes complejos enzimáticos de los procesos de replicación o reparación del ácido nucleico, afectando así los mecanismos hereditarios de la célula u organismo (Velázquez, 2000). Además existen agentes clastógenos capaces de inducir rupturas al ADN tanto en células somáticas como germinales. Ambos tipos de agentes pueden incrementar la incidencia de cáncer en cualquier especie de mamíferos cuando se ponen en contacto con ellos (McCarthy et al., 1997).

Considerando lo anterior, resulta importante el estudio del daño que pueden causar estos nuevos compuestos carbámicos al ADN, dado que se pretende que éstos sean usados como tratamiento para infecciones a nivel del tracto gastrointestinal, sin que se produzca algún tipo de lesión al organismo, puesto que sus propiedades biológicas ya han sido determinadas. En particular, es importante conocer si estos compuestos son capaces de dañar en forma irreversible al material genético de las células de estómago; es decir, que si hay daño, éste no pueda ser reparado por los mecanismos propios de reparación del material genético y en consecuencia se produzca algún padecimiento genético que

involucre cualquiera de todas las alteraciones producidas por mutaciones e incluso desencadenar cáncer.

El estudio de la genotoxicidad de los derivados carbámicos LQM996 y LQM919, forma parte de los estudios preclínicos que deben hacerse a todo nuevo principio activo, con el fin de seguir su camino a la comercialización, considerando que estos nuevos compuestos pueden ofrecer una mejor opción en cuanto a costo, efectividad y baja toxicidad al compararlos con los compuestos existentes para el tratamiento de infecciones a nivel gastrointestinal.

Técnicas que permiten la detección sensible de daño al ADN han sido utilizadas en estudios de toxicología ambiental, carcinogénesis, y envejecimiento. Los efectos de los tóxicos ambientales, cancerígenos y los productores de envejecimiento son frecuentemente específicos de tejido y un tipo celular (Singh et al., 1988), de ahí la importancia del desarrollo y la utilización de técnicas capaces de detectar el daño al ADN en células individuales, como lo es el Ensayo de Electroforesis Unicelular en Gel de Agarosa, conocido comúnmente como Ensayo Cometa.

1. GENERALIDADES

1.1 GENOTOXICOLOGÍA

1.1.1 Desarrollo histórico.

El potente impacto de la mutagénesis, dio origen al surgimiento de una nueva disciplina: la Toxicología Genética o también conocida como Genotoxicología (Enciso, 2000). Las investigaciones sobre mutaciones se inician en 1927 con los trabajos de Müller acerca de los efectos de los rayos X sobre la mosca de la fruta, la *Drosophila melanogaster* y posteriormente sobre las plantas, así como con el estudio de la mutagenicidad de la luz UV. Sin embargo, la primera evidencia inequívoca de un caso de mutagénesis química corresponde al año 1942, cuando Auerbach y Robson demostraron los efectos tóxicos del gas mostaza sobre la *Drosophila* (Bello y López de Cerain, 2001).

Con el desarrollo ocurrido en la genética molecular a partir de los trabajos de Watson y Crick, que en 1953 elucidaron la estructura tridimensional del ADN, y los posteriores descubrimientos sobre la replicación del ADN, el código genético y la síntesis de proteínas, fue posible indagar acerca de los mecanismos de la mutagénesis. Entonces se comprendió que el simple cambio de una base podría dar lugar a la aparición de un nuevo fenotipo, por ello se comenzó a investigar intensamente sobre los efectos de los productos químicos en el ADN (Bello y López de Cerain, 2001). Para 1962, ya se contaba con estudios de mutagenicidad para diversos agentes químicos utilizando sistemas de prueba con microorganismos; por su parte, Müller, en 1963 puntualizó que los humanos estaban expuestos a un gran número de nuevos químicos, como los aditivos de alimentos, fármacos, pesticidas, cosméticos, etc., que no habían sido reconocidos como mutágenos por otras generaciones (Enciso, 2000). De ahí, que para finales de la década de los sesenta se afirma que la especie humana está expuesta a un número creciente de compuestos químicos con un posible efecto mutagénico, que ponen en peligro su salud y la de sus descendientes.

El problema de los posibles efectos mutagénicos de los productos químicos conduce a la creación en el año 1969 de la Environmental Mutagen Society (EMS) en los Estados Unidos, dirigida por Alexander Hollaender y otros genetistas interesados, reconociendo así formalmente a la Genotoxicología como ciencia. Un año más tarde se crea la European Environmental Mutagen Society (EEMS). Por otra parte, también a partir de la década de los setenta se elaboraron guías nacionales sobre protocolos de ensayos de mutagenicidad, y hoy en día, no es posible registrar un nuevo medicamento, aditivo alimentario, etc., o ni siquiera transportar un compuesto químico de uso industrial a través de los países industrializados, sin disponer de los datos básicos sobre su mutagenicidad (Bello y López de Cerain, 2001).

Los factores que impulsaron el rápido desarrollo de la Genotoxicología en la década de los setenta fueron el desarrollo y utilización de cepas de microorganismos genéticamente definidas con mutaciones en genes particulares que codificaban aminoácidos en la biosíntesis de enzimas. Además, se agregó el empleo de sistema de activación metabólica *in vitro* derivado del hígado de roedor, que permitió la obtención de metabolitos electrofílicos reactivos con el ADN (Enciso, 2000; Bello y López de Cerain, 2001).

En un principio, fue considerado como objetivo primario de la Toxicología Genética la estimación del riesgo de mutación para las células reproductoras, pero al ponerse de manifiesto en la década siguiente la relación entre la mutagenicidad de algunas sustancias y sus efectos sobre el desarrollo de tumores, adquiere también relevancia un segundo objetivo: la predicción del riesgo de carcinogenicidad de productos químicos mediante la evaluación de su mutagenicidad (Bello y López de Cerain, 2001). Hoy en día, el campo de la Genotoxicología ha crecido ampliamente gracias al desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y la biología molecular, así como sus avances, ya que proporcionan nuevas metodologías para poder estudiar los eventos mutagénicos.

1.1.2 Mutagénesis.

Se entiende por mutación aquella modificación del material genético que resulta estable y transmisible a las células hijas que surgen del proceso de división celular; se pueden afectar células germinales o células somáticas. El agente que es capaz de inducir estas modificaciones se denomina mutágeno o agente genotóxico, en virtud de que se está afectando el material genético y por lo tanto las características hereditarias.

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

Las mutaciones pueden ser espontáneas, producto de un error en la replicación o en la reparación del material genético; o bien, inducidas por agentes físicos o químicos ajenos al organismo. Actualmente, el hombre se encuentra en constante exposición a un gran número de agentes físicos y químicos en el ambiente que pueden ser mutágenos, y que además contribuyen a la incidencia de cáncer.

Los genotóxicos físicos ambientales más comunes son los rayos ultravioleta y las radiaciones ionizantes, que pueden producir mutaciones formando dímeros de timina o rompimientos de cadena y alteración de las bases (Velázquez, 2000).

Un genotóxico químico puede reaccionar directamente con el ADN o bien sufrir algún tipo de reacción de biotransformación en el organismo y alterar al ácido nucleico debido a algún metabolito producto de tales reacciones, provocando eventualmente mutaciones (deleciones, inserciones, sustitución de pares de bases y rearreglos cromosómicos) (Velázquez, 2000).

Dentro de los agentes químicos que pueden afectar al organismo se encuentran algunos xenobióticos, que ejercen su actividad tóxica sobre las células de los diferentes

órganos y tejidos corporales, en cuyo material genético inducen la aparición de mutaciones, que alteran las estructuras celulares o bien sus funciones (Bello y López de Cerain, 2001).

Los xenobióticos como agentes mutágenos pueden contener grupos químicos considerados como alertas estructurales de su mutagenicidad (Bello y López de Cerain, 2001). El poseer grupos altamente electrofilicos sugiere la posibilidad de reaccionar con las zonas nucleofilicas del ADN, dando la oportunidad de provocar mutaciones.

Algunos grupos químicos identificados como posibles mutágenos por sus características estructurales (Bello y López de Cerain, 2001) son:

- Alquilésteres del ácido sulfónico
- Grupos nitro aromáticos y alifáticos
- Grupos azo aromáticos
- Grupos mono- y di-alquil-aldehídos
- N-metil derivados
- N-cloroaminas
- Propiolactonas
- Carbamatos

1.1.3 Tipos de efectos mutagénicos.

Los diversos tipos de modificaciones genéticas y otros efectos tóxicos dependen de la dosis, vía de exposición, propiedades físicas y químicas del agente, además de los aspectos inherentes al organismo vivo (Enciso, 2000).

Las mutaciones de acuerdo al efecto que producen se clasifican de la siguiente manera:

1. Génicas (microlesiones)
 - a. Sustituciones: transición y transversión.
 - b. Corrimiento de fase: delección e inserción de pares de bases.
2. Cromosómicas (aberraciones cromosómicas)
 - a. Alteraciones numéricas: aneuploidias y euploidias.
 - b. Alteraciones estructurales: delecciones, anillos, duplicaciones, inversiones, translocaciones.

Las consecuencias de las mutaciones pueden ser muy diversas: toxicidad a órganos, carcinogénesis, teratogénesis, enfermedades de carácter hereditario, conferir una mayor susceptibilidad para contraer determinadas enfermedades, entre otras (Enciso, 2000; Bello y López de Cerain, 2001).

1.1.4 Mecanismos de formación de las mutaciones.

Las mutaciones pueden ocurrir por diversos mecanismos (Bello y López de Cerain, 2001) como:

1. Sustitución de pares de bases: modificaciones espontáneas, unión de compuestos químicos, incorporación de análogos de bases, alteración química de las bases normales.
2. Corrimiento de fase: espontánea e inducida por compuestos químicos.
3. Alteraciones cromosómicas: inducidas por agentes clastogénicos en el caso de las alteraciones estructurales e inducidas por agentes aneugénicos en el caso de alteraciones numéricas.

1.1.5 Pruebas de genotoxicidad.

Debido a la gran variedad de mutaciones que se pueden producir sobre el ADN, ningún ensayo tiene capacidad por sí solo para detectar todos los tipos posibles. Por esta razón, para evaluar el potencial mutagénico de un compuesto químico, se utiliza una batería de ensayos. Ésta incluye no menos de tres ensayos: uno *in vitro* que detecta mutaciones génicas en bacterias; otro *in vitro* para alteraciones cromosómicas en células de mamíferos en cultivo; y uno *in vivo* en rata o ratón, el cual incluye factores como la absorción, la distribución, el metabolismo y excreción, así como la influencia genotóxica del compuesto (Bello y López de Cerain, 2001; Sasaki et al., 2002).

En la siguiente tabla se muestran los diferentes ensayos útiles en la detección de agentes capaces de inducir daño al ADN.

Tabla 1. **Ensayos de genotoxicidad.**

I. ENSAYOS BÁSICOS
Ensayo de mutaciones génicas en las bacterias <i>Salmonella typhimurium</i> (prueba de Ames) y <i>Escherichia coli</i> .
Ensayo de alteraciones cromosómicas en células de mamíferos en cultivo.
Ensayo de alteraciones cromosómicas o micronúcleos en médula ósea de roedor.
II. OTROS ENSAYOS
Ensayo de mutaciones génicas en células de mamífero en cultivo.
Ensayo letal recesivo ligado al sexo en <i>Drosophila</i> .
Ensayo de síntesis de ADN no programada en hepatocitos.
Ensayo de mutaciones en células germinales.
Ensayo de recombinación mitótica en levadura.
Ensayo de intercambios entre cromátidas hermanas.
Ensayo electroforético en gel unicelular (ensayo cometa).*

Tice et al., 2000; Bello y López de Cerain, 2001.

* Anexado a la batería por ser la herramienta a utilizar en el presente estudio.

1.1.6 Importancia del estudio genotóxico.

Cada día crece el número de compuestos químicos naturales y sintéticos, con posibilidad de inducir cambios en el material genético; esto se debe a la gran difusión en el empleo de sustancias químicas para el control de plagas y enriquecimiento de los suelos, preservadores y aditivos de alimentos, agentes terapéuticos, además de la constante exposición ambiental y ocupacional. Como resultado de esta excesiva exposición, resulta conveniente incluir los ensayos sobre la mutagenicidad directa e indirecta de las sustancias químicas entre las pruebas de evaluación toxicológica, antes de que tales sustancias sean empleadas por el hombre, ya que incluso un mutágeno identificado como tal puede modificar su mutagenicidad, por los metabolitos producto de su biotransformación en el organismo. De ahí que el empleo de pruebas genotóxicas se haga cada día más necesario en los estudios toxicológicos.

Los estudios genotóxicos y/ o carcinogénicos en humanos o animales de laboratorio tienen la finalidad de obtener la siguiente información: la relación dosis-respuesta del agente, vía de exposición, estructura química, metabolismo, farmacocinética; identificación de poblaciones sensibles, efectos genéticos y su mecanismo de acción, y por último detectar y/ o prevenir razonablemente el riesgo de las sustancias carcinogénicas en humanos (Velázquez, 2000). Hoy en día, además se sabe que la mayoría de los compuestos químicos carcinogénicos son también mutagénicos (carcinógenos genotóxicos) (Bello y López de Cerain, 2001).

Los ensayos genotóxicos además de identificar mutágenos y carcinógenos proporcionan información sobre diversas alteraciones genéticas relevantes para la salud humana, lo cual nos lleva a determinar el mecanismo de la mutagénesis y de esta manera formular medidas preventivas para evitar posibles riesgos a la salud (Márquez, 2002).

Considerando lo anterior, resulta necesario evaluar cada nuevo compuesto antes de que éste pueda ser empleado en la terapéutica. Primeramente tiene que estudiarse desde el punto de vista farmacológico e identificar claramente sus propiedades terapéuticas;

posteriormente se evalúan sus efectos tóxicos y genotóxicos, para así poder evitar su uso en caso de presentar efectos nocivos severos o mutagénicos que lleven a una alteración en la salud del individuo, sobre todo al ser conocido el papel que los desórdenes genéticos desempeñan en el desarrollo de algunas enfermedades.

En la actualidad se tienen registrados más de 4,000,000 de productos químicos orgánicos e inorgánicos, de los cuales 3,400,000 están estructuralmente definidos. Sin embargo, 6000 químicos se registran semanalmente y cerca de 63,000 se utilizan comúnmente; por lo tanto, éstos cuentan con un monitoreo previo de su toxicidad aguda y crónica. Aún así no se han logrado detectar todas las sustancias potencialmente peligrosas para el hombre (Velázquez, 2000).

1.2 CARBAMATOS

1.2.1 Generalidades.

En la época de la Segunda Guerra Mundial ocurrió un relevante desarrollo industrial químico impulsado por esta contienda bélica. En ese marco aparecieron los carbamatos junto con los organofosforados, primero como desarrollo militar (gases neurotóxicos) y posteriormente con un amplio uso agrícola.

Los carbamatos también llamados uretanos, son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico, que tienen un grupo $-NH_2$, $-NHR$ ó $-NR_2$ unido a un grupo carbonilo de éster (Santillán, 1993).

La estructura base de los carbamatos se muestra a continuación:

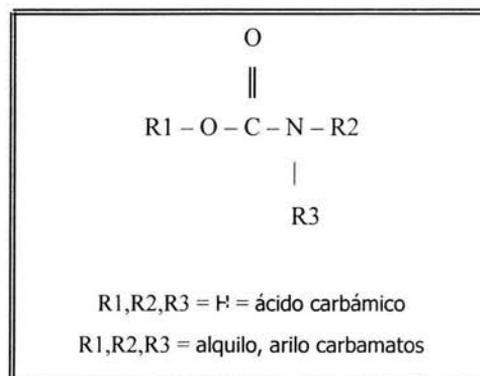


Figura 1. Estructura básica de los carbamatos (Santillán, 1993).

Los carbamatos eran utilizados principalmente como pesticidas y se sintetizaban en forma pura como análogos de la fisostigmina, un alcaloide tóxico anticolinesterasa extraído de las semillas de la planta de frijol Calabar, *Physostigma venenosum* (Klaassen, 1996).

Aunque algunos se han obtenido de fuentes naturales (como las bleomicinas y las mitomicinas, que se obtienen del actinomiceto *Streptomyces verticillus* y *Streptomyces caespitosus*, respectivamente) (Santillán, 1993), en la actualidad varios grupos de investigación se encuentran desarrollando métodos de síntesis de estos compuestos con utilidad práctica.

La síntesis de carbamatos se puede realizar a partir de los siguientes compuestos (Santillán, 1993):

- a) Isocianatos
- b) Aminas
- c) Amidas
- d) Nítrilos, nitrenos, nitroaromáticos y cuprolitiados
- e) Haluros de alquilo
- f) Alcoholes y cloroformatos
- g) Carbonato de metilo ó dietilo y aminas aromáticas

1.2.2 Aplicaciones.

Los pesticidas carbamatos se usan comúnmente porque son más biodegradables que los insecticidas organoclorados y tienen una toxicidad dérmica más baja que los pesticidas organofosforados más comunes (Márquez, 2002).

Como insecticidas se usan en el control de insectos, que no responden a los compuestos organofosforados, ejemplos de estos insectos son: moscos, hormigas, chinches, cucarachas, tijerillas y avispas (Márquez, 2002).

Por su parte, los fenilcarbamatos son un grupo pequeño de funguicidas, herbicidas e insecticidas; su desarrollo fue iniciado por el descubrimiento de algunos herbicidas N-fenilcarbamatos, quienes presentan actividad antimicótica, especialmente contra algunas

cepas del hongo *Botrytis cinerea* que dañan los viñedos, y que son resistentes a los bencimidazoles. Con los N-fenilcarbamatos se pretende en la actualidad reducir la fototoxicidad y la resistencia a los bencimidazoles que presentan éstas cepas (Hernández, 2003).

Actualmente, una gran variedad de estudios acerca de los carbamatos han reportado su aplicación en diversas áreas, en forma natural y como derivados de los mismos. En la siguiente tabla se presentan algunas de las aplicaciones de estos compuestos:

Tabla 2. **Algunos usos de los carbamatos.**

ÁREA	USOS
Medicina	Relajante muscular, hipnótico, sedante, ansiolítico, tranquilizante, anestésico local, anticonvulsivante, tratamiento del mal de Parkinson, anticarcinogénico, antiulceroso, antimicrobiano, antihelmíntico, aparatos ortopédicos, injertos arteriales, hemoaglutinante, compuestos hemocompatibles, antitrombogénico, corazón artificial, protector de piel, sustituto de piel temporal, piel sintética.
Cosmética	Deodorizantes.
Agrícola	Insecticida, herbicida, nematocida, rodenticida, funguicida.
Industria	Preservativo de pinturas, pintura para autos, accesorios para autos, cristales de seguridad, mezcla para bloque, pegamento para loseta vinílica, tuberías, salas, sillas, colchones, cuerdas, zapatos, telas, hilos.
Navegación	Recubrimiento de barcos y submarinos, elementos de flotación, velero, boyas.
Investigación	Inhibidores de proteasa, colinesterasa y elastasa.

Foye, 1984; Hassall, 1990; Santillán, 1993; Bernal, 2000.

1.2.3 Modo de acción.

Los carbamatos tienen una alta afinidad por las esterasas, tales como la quimiotripsina, la acetilcolinesterasa, la pseudocolinesterasa, carboxilesterasas plasmáticas y hepáticas, paraoxonasas, y otras esterasas no específicas dentro del cuerpo (Ford et al., 2001). Funcionan como el sustrato normal de las enzimas acilasas de este grupo, así los carbamatos son capaces de inhibir principalmente la acetilcolinesterasa en el sistema

nervioso, mediante la competencia con la acetilcolina por el sitio activo (Hassall, 1990). La acetilcolina es un neurotransmisor encontrado en la unión neuromuscular, en las terminales sinápticas preganglionares en el sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático, en las terminales ganglionares parasimpáticas (muscarínicas) y dentro del cerebro (Ford et al., 2001). La acetilcolina es responsable del evento que da lugar a una contracción muscular, el cual cesa cuando ésta es hidrolizada a ácido acético y colina por acción de la acetilcolinesterasa, la cual es una esterasa que contiene serina en el sitio activo; ésta reacciona con el grupo acetilo para formar un intermediario ligado a la enzima y terminar posteriormente la acción biológica del neurotransmisor. Por lo tanto, es un mediador sináptico de los impulsos nerviosos en mamíferos e insectos (Mínero, 1997; Hernández, 2003).

Cuando la acetilcolinesterasa es inhibida por un carbamato, ésta no puede hidrolizar la acetilcolina, de tal forma que su concentración permanece elevada dando lugar a la contracción, y generando una estimulación masiva de los receptores colinérgicos 1, 5 y 11 (receptores para acetilcolina nicotínico, localizado en músculo esquelético; receptor para acetilcolina M_2 muscarínico, localizado en músculo cardíaco y receptor para acetilcolina M_3 muscarínico, localizado en músculo liso, respectivamente), además de una crisis colinérgica (Klaassen, 1996), es decir, hay un aumento en la estimulación continua al músculo.

Los carbamatos forman un complejo inhibitorio reversible con la enzima acetilcolinesterasa, posteriormente se remueve el grupo sustituyente (alquilo o arilo) y se forma la enzima carbamilada, que por ser inestable lleva rápidamente al segundo paso de la hidrólisis, en el cual ocurre la descarbamilación de la enzima inhibida, que genera la enzima libre y activa, la cual puede entonces participar en más reacciones con el sustrato natural o con más carbamato. En general, todas éstas reacciones ocurren de manera muy rápida (Hassall, 1990; Klaassen, 1996). La disociación carbamato – enzima ocurre dentro de las 24 horas posteriores a su administración (Ford et al., 2001).

1.2.4 Farmacocinética.

La ruta metabólica de los carbamatos es básicamente la misma en plantas, insectos y mamíferos, son fácilmente absorbidos a través de membranas mucosas, tracto respiratorio y gastrointestinal (Minero, 1997); no atraviesan fácilmente barrera hematoencefálica, de ahí su toxicidad limitada en SNC (Ford et al., 2001). En el ratón, todos los carbamatos son distribuidos en forma rápida en tejidos y órganos; se han reportado residuos en varios órganos: hígado, riñones, cerebro y músculo. La vida media en rata es de 3-8 horas, mientras que en ratón es de 8-17 minutos (Minero, 1997). Los carbamatos insecticidas no requieren activación metabólica antes de manifestar sus propiedades inhibitorias enzimáticas (Foye, 1984).

El primer paso usual en el metabolismo de los ésteres carbamatos insecticidas en muchos animales es la oxidación natural, en la cual se introduce un grupo funcional hidroxilo que sirve como una forma de conjugación secundaria. Aún cuando la oxidación de carbamatos ocurre, no siempre hay destoxificación, generalmente el metabolismo oxidativo debilita la molécula y posibilita los cambios hidrolíticos catalizados por enzimas, llevando a productos de gran polaridad y solubilidad en agua que pueden ser excretados por vía urinaria o fecal (Hassall, 1990; Minero, 1997).

Las reacciones oxidativas incluyen: hidroxilación de anillos aromáticos o epoxidación, O-dealquilación, N-metil hidroxilación, N-dealquilación, hidroxilación y subsecuente oxidación de cadenas alifáticas, oxidación del tioéter a sulfóxidos y sulfonas (Klaassen, 1996; Minero, 1997).

La hidrólisis enzimática es frecuentemente rápida y es llevada a cabo en forma espontánea o por enzimas de dos tipos, llamadas esterasas y amidasas. Las esterasas atacan el enlace sobre el lado del grupo carbonilo unido al átomo de oxígeno, mientras que las amidasas atacan el enlace sobre el lado de unión al átomo de nitrógeno. El grado de hidrólisis catalizada por la esterasa va del 30 al 95%, dependiendo del carbamato y del organismo implicado (Hassall, 1990; Klaassen, 1996); ésta reacción es más rápida en

mamíferos que en plantas e insectos (Minero, 1997). Como producto final de la hidrólisis se obtiene ácido carbámico, que al ser inestable se descompone en CO_2 y su amina correspondiente (Hassall, 1990).

La conjugación de los hidroxiproductos está dada por un sistema de enzimas metabolizadoras de fármacos, llevando a la formación de compuestos solubles en agua tales como O⁻ y N⁻ glucurónidos, derivados de sulfatos y ácido mercaptúrico, los cuales son fácilmente eliminados por vía urinaria o por heces (Klaassen, 1996; Minero, 1997). La excreción de carbamatos por vía urinaria es rápida en el hombre y la ruta metabólica es la misma que en ratas (Minero, 1997).

1.2.5 Toxicidad.

El efecto tóxico de los carbamatos en animales es debido al hecho de que estos compuestos inhiben la acetilcolinesterasa en el sistema nervioso.

Los signos y síntomas de toxicidad están relacionados a sus efectos sobre tres áreas separadas del sistema nervioso colinérgico (Hassall, 1990; Klaassen, 1996; Ford et al., 2001):

- a) Efectos sobre las terminales ganglionares del sistema nervioso autónomo parasimpático (muscarínicos): Incremento de secreciones (salivación, lagrimación, sudoración, etc.), broncoconstricción, miosis, contracción de las pupilas, molestias gastrointestinales, incontinencia urinaria y fecal, diarrea, vómito, bradicardia, disminución de la presión sanguínea.

- b) Efectos sobre las terminales ganglionares del sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático, y unión neuromuscular somática (nicotínicos): Taquicardia, midriasis, hipertensión, falla respiratoria (hipoxia, anoxia, arresto cardiorespiratorio), debilidad diafragmática, temblores, fasciculaciones musculares,

espasmos, debilidad muscular, y/ o parálisis flácida, es decir, extremidades rígidas o clónicas, que inducen movimientos rápidos e incontrolados.

- c) Efectos sobre el SNC: Agitación, ataxia, letargia, confusión mental, pérdida de la memoria, desorientación, inhabilidad para concentrarse y para aprender, debilidad generalizada, dolor de cabeza, ansiedad, ataques, convulsiones, psicosis, cianosis, coma, muerte.

La toxicidad aguda de los diferentes carbamatos va desde una alta toxicidad hasta sólo ligera o nula toxicidad. La DL_{50} reportada para la rata varía de 1 mg/ kg a más de 5000 mg/ kg. Para ciertos metilcarbamatos la DL_{50} es 20 veces o más la correspondiente dosis efectiva cincuenta, además existe una relación dosis efecto, entre la severidad de los síntomas y el grado de inhibición de la colinesterasa (Minero, 1997).

La toxicidad aguda dérmica de los carbamatos es baja o moderada (excepto el aldilcarbamato) (Minero, 1997). Los carbamatos pueden producir neurotoxicidad debido a una sola exposición aguda en dosis masivas o bien a exposiciones repetidas a altas dosis del compuesto (Klaassen, 1996).

Se han estudiado los síntomas neurotóxicos de algunos carbamatos y tiocarbamatos en gallinas. Algunos tiocarbamatos causaron retraso típico de neurotoxicidad, incluyendo ataxia (pérdida de la movilidad), frecuentemente asociada con parálisis ascendente y con desmielinización nerviosa (Hassall, 1990). Otros como el carbaril, requieren dosis muy elevadas para producir ataxia y neuropatologías típicas, tales como las que producen los organofosforados (Márquez, 2002).

Se ha estudiado la exposición oral del aldicarb y el carbaril en pollos, encontrando que éstos producen una supresión aguda y algunas veces prolongada, de la producción de anticuerpos; el carbaril también suprime la generación de granulocitos fagocíticos hasta por

9 meses después de la exposición; de ahí que sean considerados agentes inmunotóxicos (Klaassen, 1996).

Evaluando la inmunotoxicidad del metilditiocarbamato de sodio, un químico ampliamente usado como herbicida, funguicida y nematocida en cultivos; se observó decremento en el peso del timo, depleción de la población CD4⁺/CD8⁺ de timocitos, y profunda supresión de la actividad de células NK, seguidas de exposición oral y dérmica (Klaassen, 1996).

Los carbamatos también pueden influir sobre la funcionalidad del sistema hematopoyético y en altas dosis puede haber degeneración de hígado, riñones y testículos. Estas anomalías en los diferentes órganos depende de la especie animal y la estructura química del carbamato (Minero, 1997).

Como efectos crónicos se reporta que a dosis elevadas producen alteraciones en el ciclo estral o inducen un impedimento en la fertilidad. Se han observado efectos teratogénicos en conejos alimentados con carbaril entre el día 6 al 18 de la gestación e incremento en el número de abortos en monos preñados durante la administración (Hassall, 1990). En un estudio de 22 meses se observó un decremento en los niveles de hemoglobina en ratas hembras administradas diariamente con 400 ppm de carbaril en el alimento (Márquez, 2002). El aldicarb y el carbaril producen aberraciones cromosómicas y retrasan el ciclo celular por inhibición de la mitosis; el carbofurán produce aberraciones cromosómicas *in vitro*. Por su parte, los carbamatos nitrogenados son mutágenos, que pueden producir sitios álcali lábiles (N-nitrosocarbaril), y algunos de ellos incluso son carcinógenos (Najera, 1995).

En estudios sobre reproducción y teratogenicidad, utilizando altas dosis, se encontraron anomalías tales como el incremento en la motilidad, disturbios en el sistema endocrino, efectos sobre la hipófisis y en el funcionamiento gonadotrófico. Los efectos fetales incluyen un incremento en la mortalidad, decremento del peso ganado

durante las primeras semanas después del nacimiento e inducción de muerte temprana del embrión (Minero, 1997).

Se han observado efectos carcinogénicos y teratogénicos por parte de los ditiocarbamatos. Éstos inducen mutaciones y aberraciones cromosómicas en humanos e incrementan el número de ICH, además retrasan la progresión del ciclo celular en células de ovario de hámster chino (CHO) (González et al., 2003).

Pese a que aquí se presentaron algunos de los efectos tóxicos de los pesticidas carbámicos, no existen reportes suficientes que evidencien los problemas de estos compuestos en humanos o modelos animales; por lo tanto, no se puede indicar que tales pesticidas poseen un riesgo significativo para la población humana.

1.3 METOCARBAMOL

1.3.1 Características.

El nombre químico del metocarbamol es 3-(2-metoxifenoxi)-1-2-propanodiol 1-carbamato, con la fórmula molecular $C_{11}H_{15}NO_5$ y un peso molecular de 241.24 (Moffat, 1986; PLM, 2002). Su estructura química es:

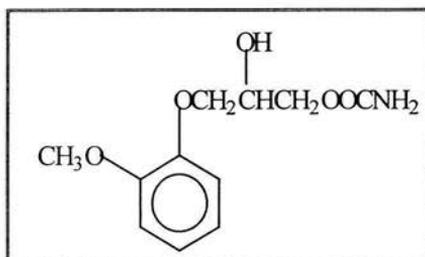


Figura 3. Estructura del metocarbamol (PLM, 2002).

El metocarbamol es un derivado carbamato de la guaifenesina; es un polvo blanco, fino, inodoro o con un leve olor característico, con un punto de fusión entre 93 y 97°C (Gennaro, 1985). Es soluble en agua a 20°C 1 g/ 40 mL, libremente soluble en alcohol con calentamiento, soluble en propilenglicol y escasamente soluble en cloroformo (Gennaro, 1985; Moffat, 1986).

1.3.2 Preparación.

El 3-(o-metoxifenoxi)-1,2-propanodiol participa en una reacción de transesterificación con el carbonato de etilo en presencia de un catalizador alcalino para eliminar etanol y producir el carbonato cíclico del diol inicial. Un tratamiento seguido con amonio rompe el anillo del carbonato cíclico y forma el carbamato primario del compuesto inicial (Moffat, 1986).

1.3.3 Farmacodinamia.

El mecanismo por el cual el metocarbamol relaja al músculo esquelético en el humano no ha sido establecido, pero podría deberse a su acción sedante y depresora del SNC. No tiene acción directa sobre el mecanismo contráctil del músculo estriado, la placa terminal motora o la fibra nerviosa (Rivero y Tanimoto, 1999; PLM, 2002).

Su efecto relajante se inicia 30 minutos después de administración oral y persiste 4 a 6 horas (Rivero y Tanimoto, 1999).

1.3.4 Farmacocinética.

El metocarbamol es absorbido rápidamente después de su administración oral, casi en su totalidad en el tracto gastrointestinal a través de la mucosa, y se distribuye ampliamente en el organismo; una pequeña cantidad atraviesa barrera placentaria (Rossoff, 2002). Siguiendo la administración oral de una sola dosis de 2 g de metocarbamol, la concentración máxima del fármaco en la sangre o el suero es de 25.8 µg/ mL en una a dos horas aproximadamente (Moffat, 1986; PLM, 2002).

El metocarbamol es metabolizado principalmente en el hígado, por dealquilación y p-hidroxilación; los dos metabolitos resultantes se encuentran primeramente como conjugados de glucurónido o de sulfato (Moffat, 1986; PLM, 2002). El fármaco y sus metabolitos son excretados en forma rápida y casi total en la orina; cerca del 98% de una dosis (4 a 6 g/ día vía oral, en adultos), es excretada en 72 horas, con menos del 1% como fármaco inalterado y el resto como metabolitos libres y conjugados. La mayor parte es excretado en las primeras 8 horas (Moffat, 1986). Una pequeña cantidad se excreta por glándula mamaria a través de la leche (Rossoff, 2002). Tiene una vida media plasmática de 0.9 – 2.2 horas (Rivero y Tanimoto, 1999).

1.3.5 Indicaciones terapéuticas.

El metocarbamol esta indicado en caso de dolor músculo esquelético, dado que es un relajante de acción central duradera. El metocarbamol no relaja directamente los músculos con contracción activa en el hombre (Rivero y Tanimoto, 1999; PLM, 2002).

Está indicado como coadyuvante del reposo, la fisioterapia y otras medidas, para el alivio de las molestias asociadas con afecciones músculo esqueléticas dolorosas agudas. Su uso es en forma oral y parenteral (PLM, 2002).

Ha sido utilizado con éxito limitado en el tratamiento de parálisis inquietante, parálisis cerebral, esclerosis múltiple, y accidentes cerebrovasculares (con espasmos). Tiene limitada eficacia especialmente por vía oral (Gennaro, 1985).

1.3.6 Reacciones secundarias y adversas.

Algunos efectos secundarios y/ o adversos a la administración oral son: mareo, náuseas, aturdimiento, desmayo, vértigo, anorexia, conjuntivitis, somnolencia, visión borrosa, cefalea, fiebre, congestión nasal, desórdenes gastrointestinales (adinamia intestinal) y raramente síncope, además de manifestaciones alérgicas, como urticaria, prurito y erupción cutánea (Foye, 1984; Gennaro, 1985; PLM, 2002; Rossoff, 2002).

Pueden presentarse enrojecimiento, ataques, cefalea, incoordinación muscular, diplopia, nistagmo, hipotensión, bradicardia, sabor metálico y anafilaxis después de la administración IM o IV (Gennaro, 1985). También se ha reportado dedos o lengua paralizados; además orina verde, café o negra (Rossoff, 2002).

En gatos y perros se presenta sialorrea, debilidad, temblores, ataxia y vómito (Rossoff, 2002).

1.3.7 Toxicidad y precauciones.

Puede provocar una interferencia de color en ciertas pruebas de selección para el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y el ácido vanililmandélico (VMA) (PLM, 2002).

No se han hecho estudios a largo plazo en animales para evaluar el posible efecto mutagénico, carcinogénico y teratogénico del metocarbamol. Se desconoce su efecto sobre la fertilidad humana (PLM, 2002).

La ingestión de metocarbamol y alcohol resulta fatal, las concentraciones encontradas en tejido postmortem fueron: sangre 525 µg/ mL de metocarbamol, alcohol 1400 µg/ mL y salicilato 20 µg/ mL; orina 575 µg/ mL de metocarbamol (Moffat, 1986).

El metocarbamol tiene una DL₅₀ de 1.3 g/ kg en rata, de 2 g/ kg en perro, de 1.5 g/ kg en ratón y de 1.4 g/ kg en hámster (Rossoff, 2002).

1.4 NUEVOS DERIVADOS CARBÁMICOS

1.4.1 Síntesis de los nuevos derivados carbámicos.

Con la finalidad de obtener nuevas moléculas con actividad biológica, menos dañinas y de bajo costo en relación a las ya existentes, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, surgió un proyecto para diseñar y sintetizar estos compuestos bajo la coordinación general del Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano.

La síntesis de los 4-R-fenilcarbamatos se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Medicinal, FES-C UNAM por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano, en el Instituto de Química de la UNAM por el Dr. Roberto Martínez y en el Laboratorio de Química Orgánica a cargo del Dr. Roberto Insuasty de la Universidad del Valle, Cali Colombia. La caracterización de los compuestos se realizó mediante métodos espectroscópicos, como resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono-13, espectroscopia de infrarrojo y espectrometría de masas (Ángeles et al., 1994).

En la figura 4 se muestra la reacción general de síntesis de los 4-R-fenilcarbamatos de etilo, en particular del LQM919 y LQM996, que son los derivados a estudiar en este trabajo.

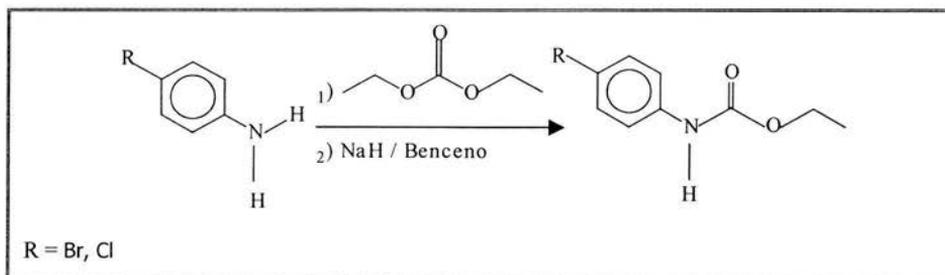


Figura 4. **Reacción general de síntesis de los 4-R-fenilcarbamatos de etilo**
(Ángeles et al., 1994).

Los compuestos se sintetizaron de acuerdo a una comparación teórica de la influencia de sustituyentes presentes en fármacos antihelmínticos y antibacterianos bencimidazólicos. Hasta ahora los compuestos han demostrado actividad antiparasitaria y antibacteriana, lo cual los convierte en posibles agentes terapéuticos.

1.4.2 Pruebas biológicas.

Actividad antiparasitaria.

En el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la asesoría del M.V.Z. Pablo Martínez Labat, se estudio la actividad antiparasitaria contra *Hymenolepis nana* en ratones CD1.

Los resultados mostraron que los compuestos probados a dosis de 5, 10, y 50 mg/kg, presentaron una eficacia de entre el 85 al 95% de actividad antiparasitaria, siendo muy similar esta respuesta a la del medicamento praziquantel (testigo), además, mediante microscopia electrónica se evidenció la desaparición de las vellosidades que recubren los proglótidos de los parásitos lo que afectaba la nutrición del organismo (Minero, 1997).

Por otro lado, se evaluaron *in vitro* algunos derivados carbámicos contra *Giardia lamblia*, y se determinó una concentración efectiva entre 3.80 y 18.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por la Dra. Enedina Jiménez Cardoso, del Hospital Infantil de México (Jiménez et al., 2003).

Actividad antibacteriana.

En el laboratorio de Microbiología Industrial de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la asesoría de la M. en C. Stella Reginensi, empleando la técnica de difusión en caja, utilizando sensidiscos impregnados con 500 y 2000 μg de los derivados carbámicos. Se evaluaron 18 cepas provenientes de muestras clínicas y pertenecientes a la colección ATCC, las cuales son agentes infecciosos gastrointestinales en su mayoría. Los resultados mostraron que los derivados carbámicos tienen efectividad

contra 13 géneros de bacterias Gram (-) al utilizar 2000 µg, dentro de las cuales el género *Vibrio* figuró como el más sensible (Moreno, 1997; Bernal, 2000).

En el laboratorio del Dr. Andrés Romero Rojas, en la FES-C, se determinó la actividad de los derivados carbámicos contra *Helicobacter pylori in vitro*, mediante los métodos de Kirby Bauer y de dilución en agar. Nueve compuestos mostraron actividad inhibitoria en diferentes grados, la concentración mínima de inhibición (CMI) fue de 12.33 a 14 mm de diámetro. En el caso del compuesto LQM996 se obtuvo una CMI de 32 mg/mL (Márquez, 2002).

Actualmente, se realiza la evaluación *in vitro* de 10 derivados carbámicos sobre la inhibición del crecimiento de *Entamoeba histolytica*, así como la evaluación del modo de acción de los compuestos. Estos estudios se realizan en el departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, por la M en C. Cynthia Ordaz, bajo la dirección de la Dra. Mireya de la Garza Amaya. Hasta ahora los resultados muestran que los compuestos en estudio presentan gran actividad inhibitoria, en particular el compuesto LQM996, comparado con el efecto del metronidazol (Márquez, 2002).

1.4.3 Pruebas toxicológicas.

Mutagénicas.

Se realizó la prueba de revertentes en *S. typhimurium*, mediante la prueba de Ames y de preincubación, por parte de la Dra. Miriam Arriaga del Hospital Juárez de la SSA. Se encontró que los derivados carbámicos no fueron mutagénicos a concentraciones mayores de 250 µg, en comparación con el metronidazol, que es mutagénico en concentración de nanogramos (Márquez, 2002).

Se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad de algunos derivados carbámicos, mediante la prueba de micronúcleos, bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz-Barriga Arceo y el Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar, en el laboratorio de Genética de la Escuela

Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Los resultados mostraron que los compuestos LQM919 y LQM920 son genotóxicos a partir de una dosis de 10 mg/ kg, mientras que los compuestos LQM996 y LQM181 presentaron genotoxicidad a partir de una dosis de 30 mg/ kg. En cuanto al efecto citotóxico, los compuestos LQM919, 996 y 181 no lo ejercieron a una dosis de 10 mg/ kg, mientras que éste ocurrió con el LQM920 a una dosis de 10 mg/ kg. También se evaluó el mecanismo de formación de MN, mediante la utilización de la tinción de anticuerpos CREST que detecta cinetocoros en los MN, encontrándose que los escasos MN que producen los nuevos derivados carbámicos son por ruptura y no por efecto aneugénico (Márquez, 2002).

Bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz-Barriga Arceo, en el laboratorio de Citogenética de la FES-C UNAM, se realizó el estudio del potencial genotóxico de los fenilcarbamatos mediante la técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas *in vitro*. Se trabajaron los compuestos a concentraciones de 25, 75 y 150 µg/ mL, obteniendo como resultado que éstos, no alteran ciclo celular, no interfieren con la división celular y no aumentan el número de ICH, en comparación con el metronidazol usado como testigo a las mismas concentraciones; por lo tanto, los nuevos compuestos no presentan efectos genotóxicos, ni citotóxicos (Hernández, 2003).

Inmunotoxicidad.

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

1.4.4 Futuro de los nuevos derivados carbámicos.

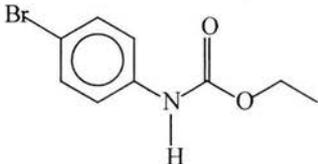
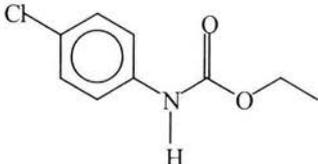
Actualmente, se efectúa el registro de la patente de los nuevos derivados carbámicos, en especial del compuesto que ha dado mejores resultados en las diferentes

pruebas (LQM996) *in vitro*, patente en trámite UNAM No: RPG/ 11186 (Dic. 2000) como antibiótico de amplio espectro, contra el género *Vibrio* y *Salmonella*, y bacterias como *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*; como antiparasitario contra los protozoarios *Giardia lamblia* y *Entamoeba*, contra céstodos como *Hymenolepis nana* y contra hongos del género *Tricophytum* (Márquez, 2002).

Sin embargo, aún se realizan evaluaciones en cuanto a la toxicidad, genotoxicidad y farmacología *in vivo* de los compuestos, de tal forma que se pueda conocer el grado de daño y comportamiento de éstos dentro del organismo, ya que se sabe que en muchas ocasiones los efectos mutagénicos y carcinogénicos de los fármacos son debido a sus metabolitos y no a la molécula intacta. De esta manera se podrá garantizar su uso en forma adecuada y segura, aprovechando su actividad biológica.

En este trabajo se presenta el estudio genotóxico *in vivo* de dos 4-R-fenilcarbamatos de etilo mediante la técnica de Ensayo Cometa; en la tabla 3 se muestran las propiedades previamente reportadas para los compuestos sometidos al mismo.

Tabla 3. Propiedades de los 4-R-fenilcarbamatos de etilo.

CLAVE	ESTRUCTURA	NOMBRE	p. f. (°C)	SOLUBILIDAD	DL ₅₀ (mg/kg)
LQM919		p-Br- carbarnato de etilo	76 - 78	Acetona, aceite de maíz y DMSO	2154.06
LQM996		p-Cl- carbarnato de etilo	64 - 66	Acetona, aceite de maíz y DMSO	471.16

Moreno, 1997; Ángeles et al., 2000; Márquez, 2002.

1.5 ENSAYO COMETA

1.5.1 Generalidades.

El ensayo cometa es también conocido como “Ensayo en gel Unicelular” (SCG), “Electroforesis Unicelular en Gel de Agarosa (SCGE)”, o “Electroforesis en microgel (MGE); éste ensayo surgió de la necesidad de detectar el daño al ADN en células individuales, ya que los efectos de los tóxicos ambientales, cancerígenos y los productores del envejecimiento frecuentemente son específicos de tejido y un tipo celular (Singh et al., 1988).

Östling y Johanson en 1984, fueron los primeros en cuantificar directamente el daño al ADN en células individuales irradiadas, mediante lisis de las células adheridas en agarosa sobre portaobjetos (Fairbairn et al., 1995; Rojas et al., 1999; Tice et al., 2000); a ésta preparación se le hacía un corrimiento electroforético bajo condiciones neutras y posteriormente era teñida con un colorante fluorescente de unión al ADN, el resultado fueron imágenes que por su apariencia fueron nombradas “cometas”. Estas imágenes eran medidas para determinar la extensión del daño al material genético, ya que ellos observaron que la extensión del ADN liberado de la cabeza del cometa durante la electroforesis estaba en función de la dosis de irradiación.

Posteriormente, ésta técnica fue modificada con el fin de mejorar la sensibilidad para detectar el daño al ADN producido por diversos agentes genotóxicos en células aisladas, así se desarrolló la técnica de electroforesis en microgel, que detectaba daño al ADN bajo condiciones neutras (Rojas et al., 1999). La versión del Ensayo Cometa que actualmente es utilizada, fue introducida por Singh y colaboradores (Rojas et al., 1999; Tice et al., 2000), la cual es más utilizada bajo condiciones alcalinas (pH >13) que neutras; esto es debido a que la mayoría de los agentes que provocan daño al ADN inducen de 5 a 2000 veces más rompimientos de cadena sencilla que doble, y las condiciones neutras no son tan sensibles para detectar el daño al ADN cuando se ha producido un rompimiento de este tipo y/ o sitios álcali lábiles (Singh et al., 1988; Rojas et al., 1999). En esta técnica se aprovecha

la desnaturalización óptima y la migración de la cadena sencilla de ADN, permitiendo así una evaluación de los rompimientos a la misma y los sitios álcali lábiles, tales como los sitios apurínicos y apirimídicos, y fosfotriésteres (Singh et al., 1988). El incremento en la migración del ADN está asociado con el incremento de rompimientos a cadena sencilla, y a su vez éstos se asocian con sitios de reparación por excisión incompleta, y sitios álcali lábiles (Rojas et al., 1999; Tice et al., 2000; Kleinsasser et al., 2000).

1.5.2 Principio de detección de rupturas al ADN.

La medición de las rupturas en las cadenas del ADN se basa en el principio de que los agentes que cortan dichas cadenas reducen el tamaño de la molécula dúplex de ADN (Fairbairn et al., 1995).

En el ensayo cometa, las imágenes se forman por rupturas terminales de la molécula de ADN cargadas negativamente; así el material genético queda libre para migrar en el campo eléctrico del núcleo hacia el ánodo (Singh et al., 1988; Fairbairn et al., 1995). La habilidad del ADN para migrar, está en función de su tamaño y del número de rompimientos terminales, los cuales pese a estar unidos a segmentos largos de ADN pueden migrar una distancia corta separados del núcleo (Fairbairn et al., 1995; Enciso, 2000).

El proceso electroforético empleado en éste ensayo hace que el ADN liberado del núcleo celular migre de forma diferencial poniendo de manifiesto el daño al mismo; de esta forma el ADN intacto migra íntegro, mientras que el ADN dañado o fragmentado migra de manera diferencial mostrando una cola de cometa; el grado de extensión de la cauda del ADN liberado del núcleo está en función del daño producido.

La intensidad de fluorescencia en la cauda con relación al núcleo proporciona información acerca de la cantidad de rupturas presentes en la cadena de ADN y por ende refleja el grado de daño producido por los agentes genotóxicos (Fairbairn et al., 1995; Enciso, 2000).

Pese a que la longitud de la cauda inicialmente se incrementa con el daño, alcanza un máximo cuando es definida por las condiciones de electroforesis, y no por el tamaño de los fragmentos (Fairbairn et al., 1995; Enciso, 2000). Así, tiempos cortos de electroforesis permiten cuantificar grandes cantidades de daño al ADN y por el contrario, un incremento en la duración de la electroforesis podría permitir la evaluación de niveles de daño al ADN extremadamente pequeños (Singh et al., 1988).

1.5.3 Evaluación del daño al ADN.

Las evaluaciones que se pueden hacer son variadas:

1. Método manual: Únicamente se evalúa el porcentaje de células con cauda y sin ella. Las imágenes se evalúan en forma visual y se clasifican de acuerdo al tamaño del cometa. El tamaño del cometa refleja el grado de daño y las imágenes son definidas como estados 0, 1, 2, 3 y 4 donde 0 indica sin daño y 4 indica máximo daño (Henderson, 1999).

Se puede medir la longitud de la imagen, el diámetro del núcleo y el área de la imagen, usando transparencias gráficas. Existe otro método en el que se mide directamente el diámetro del núcleo y la longitud de la imagen, con ayuda de un micrómetro ocular montado en el ocular del microscopio. En éste además se puede evaluar la proporción de células dañadas contra las no dañadas (Rojas et al., 1999; Enciso, 2000).

2. Método computarizado: El sistema de análisis de imágenes proporciona un amplio rango de parámetros cuantitativos para describir las propiedades geométricas y densitométricas de la imagen, como la longitud de la imagen, el diámetro del núcleo, la longitud de la cauda, el porcentaje de ADN en la cauda, y el momento de la cauda del cometa, que es la proporción de ADN en la cauda por la longitud de la misma, lo cual no puede realizarse por análisis manual (Henderson, 1999; Enciso, 2000).

1.5.4 Aplicaciones y ventajas.

La técnica de Ensayo Cometa ha sido aplicada a estudios de daño al ADN en soluciones de células individuales obtenidas de cultivos celulares, sangre periférica, tejidos de roedores y humanos. Esta técnica puede detectar daño al ADN en diferentes circunstancias experimentales, incluyendo la inducción de daño oxidativo (endógeno y exógeno) y exposición a radiación de ionización (Everett et al., 2000); además permite evaluar la capacidad de reparación de las células y su repuesta en diferentes fases del ciclo celular, mediante el empleo de enzimas de reparación purificadas durante el procedimiento del ensayo, incrementando así su sensibilidad y especificidad; éstas enzimas convierten lesiones particulares en rompimientos, facilitando la detección del agente que induce el daño en forma indirecta (Collins et al., 1997).

El Ensayo Cometa como una prueba de genotoxicidad ha tenido un gran desarrollo, empleo y explotación en la evaluación de muchos agentes químicos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Rojas et al., 1999), ya que permite distinguir entre daño cromosómico, citotóxico y genotóxico; identificar posibles mutágenos y carcinógenos humanos; y distinguir entre carcinógenos genotóxicos y no genotóxicos (Tice et al., 2000). Por otro lado, ésta técnica es útil en el seguimiento de tumores, antes y después del tratamiento físico o químico; puesto que detecta cruzamientos híbridos intracadena en el ADN (producto de la lesión citotóxica de muchos agentes quimioterapéuticos), debido a un retraso en la velocidad de migración del material genético (Fairbairn et al., 1995); proporcionando así la posibilidad de mejorar al alternativas de terapia, tomando en cuenta los efectos que éstas producen sobre las células y el ADN. Asimismo, es ampliamente utilizado en el monitoreo humano de poblaciones expuestas en forma accidental o habitual, y ambiental a determinados compuestos químicos; y en el monitoreo ambiental (suelo, el agua y el aire) (Collins et al., 1997; Rojas et al., 1999; Tice et al., 2000).

Dado que los rompimientos al ADN detectados por el ensayo cometa podrían también contener células apoptóticas, que dan la apariencia de cometas debido a su fragmentación, ésta técnica puede ser aplicada para estudiar tal proceso (Roser et al., 2001).

Comparado con otros ensayos de genotoxicidad, las ventajas de la técnica incluyen: (1) los datos obtenidos son a nivel de células individuales; (2) muestra sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN; (3) se requieren pequeños números de células por muestra, para proporcionar los datos del daño al ADN y de reparación por célula individual; (4) se puede usar casi cualquier tipo de población celular eucariótica; (5) permite la evaluación del daño al ADN en células no proliferativas; (6) las lesiones al ADN pueden ser medidas en ausencia de actividad mitótica; (7) flexibilidad; (8) habilidad para conducir estudios usando cantidades relativamente pequeñas de la sustancia a probar; (9) un periodo relativamente corto de tiempo (pocos días) necesario para completar un experimento; y (10) puede detectar respuestas no uniformes dentro de una población mezclada (Rojas et al., 1999; Tice et al., 2000).

Puesto que ésta técnica tiene gran capacidad para detectar genotoxicidad en varios órganos, sus aplicaciones potenciales en áreas como la genotoxicología, la clínica, estudios de reparación del ADN, biomonitoreo ambiental y, monitoreo humano son casi ilimitadas a partir de la última década. Actualmente, se emplea para la detección temprana de daño al ADN, probando especialmente aditivos de alimentos, medicamentos a dosis terapéuticas, cuya existencia está en uso o bien como parte de la investigación preclínica de nuevos compuestos con tales fines.

1.5.5 Tipos de tejidos utilizados.

Este ensayo fue diseñado para evaluar el daño al ADN en células eucariotas individuales y como tal puede emplearse en cualquier tipo de tejidos siempre cuando se disgreguen para permitir la obtención de células individuales, que puedan ser sometidas al ensayo. Considerando que tal proceso de aislamiento no debe permitir reparaciones o rupturas adicionales a las cadenas de ADN (Rojas et al., 1999; Enciso, 2000).

Entre los tejidos que se han utilizado para realizar estudios mediante el ensayo cometa, se puede mencionar (Rojas et al., 1999):

- Tejidos humanos: Sangre (linfocitos y granulocitos), epitelio de mucosa oral, células de mucosa gástrica y nasal (Pool-Zobel et al., 1994), células de colón, fibroblastos, espermatozoides, adenocarcinomas, células reproductoras, células pancreáticas, células epiteliales derivadas de piel, células epiteliales de pulmón.

- Tejidos animales:
 - Linfocitos (rata, ratón, perro)
 - Células de bazo (ratón)
 - Timocitos (ratón)
 - Células de cerebro (ratón, oveja, langostino)
 - Células de riñón (ratón, rata)
 - Células de hígado (ratón, rata, trucha)
 - Epitelio de mucosa (rata)
 - Células pancreáticas (rata)
 - Células de testículo (ratón)
 - Embriones (rata, ratón)
 - Otros: Ovario, piel, médula ósea.

- Células humanas en cultivo: Sangre (linfocitos B y T), carcinomas (cérvix, colón, próstata, vejiga), melanomas, gliomas, fibroblastos, queratinocitos de mama, células de pulmón.

- Células animales en cultivo: Hámster (CHO, HIT-T15, VT9), ratón (F0, L5178Y, SCCV11), rata (C6), cultivos primarios de hepatocitos.

1.5.6 Sustancias estudiadas.

Entre las sustancias que han sido evaluadas en cuanto a sus efectos genotóxicos mediante la técnica de ensayo cometa se han reportado:

- Rayos X y UV
- Isótopos radiactivos
- H₂O₂ (Peróxido de hidrógeno)
- MnCl₂ (Cloruro de manganeso)
- Benzo-(a)-pireno
- Ciclofosfamida
- Metronidazol y otros fármacos
- Bleomicina
- Sales de mercurio
- Morfina
- Mitomicina C
- Cafeína
- Lindano
- Mostaza nitrogenada
- Acrilamida
- Benceno y sus metabolitos
- Antioxidantes
- Tolueno
- Gasolina
- Cafeína
- Colchicina
- Fenoles

1.6 EL ESTÓMAGO

1.6.1 Anatomía del estómago.

El estómago es una prolongación del tubo digestivo, ubicado por debajo del diafragma, es un órgano exócrino y endocrino que digiere los alimentos y secreta hormonas (Ross, 1997; Junqueira y Carneiro, 2002).

Desde el punto de vista histológico, el estómago se divide en tres regiones diferenciadas, cada una de las cuales se designa de acuerdo a la naturaleza de las glándulas que contiene; en la figura 5 se pueden observar estas tres regiones.

- Región del cardias. Constituida por una banda de mucosa de 1.5 – 5 cm de longitud, dispuesta circularmente y localizada en la transición entre el esófago y el estómago. Las glándulas que contiene son tubulosas ramificadas o no. La mayor parte de las células secretoras producen moco y lizosima, puede haber algunas células parietales secretoras de HCl (Junqueira y Carneiro, 2002).

- Región del cuerpo y del fundus. Es la porción de mayor tamaño y se localiza entre el cardias y el píloro. Presenta glándulas tubulosas ramificadas, llamadas glándulas gástricas o fúndicas. El cuello de las glándulas está formado por células madre, células mucosas del cuello y células oxínticas o parietales. La base de la glándula contiene células parietales, células principales o cimogénicas y células enteroendocrinas (Junqueira y Carneiro, 2002).
 - a) Células madre pluripotenciales: Se encuentran en pequeño número en el cuello de la glándula, son cilíndricas o cúbicas con núcleos ovoides, sin gránulos u otros componentes específicos en el citoplasma, su localización es basal (Finn, 2002). Se dividen constantemente y aproximadamente la mitad de las células hijas permanecen como células madre; la otra mitad emigra a la superficie de la glándula para reponer las células de la foseta y de la superficie del estómago o bien a la parte

profunda de la glándula, diferenciándose en células parietales, mucosas del cuello y cimogénicas (Junqueira y Carneiro, 2002).

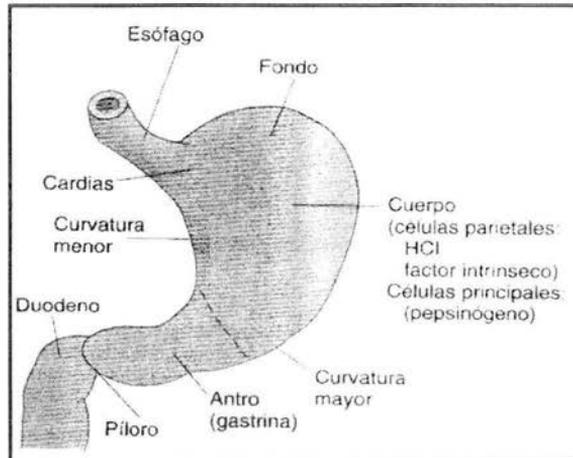


Figura 5. **Anatomía del estómago** (Ganong, 2002).

- b) Células parietales u oxínticas. Se encuentran principalmente en la región del cuello, entre las células mucosas. Son células grandes, redondeadas o piramidales, con un núcleo esférico y oscuro en posición central, su citoplasma es intensamente eosinófilo (Finn, 2002; Junqueira y Carneiro, 2002).

Las células parietales secretan HCl (0.16 M), KCl (0.07 M) y vestigios de otros electrolitos. Son ricas en anhidrasa carbónica, una enzima que cataliza la reacción de disociación de H_2CO_3 en el citoplasma en H^+ y en el ión bicarbonato. Contienen mitocondrias en abundancia ya que se requiere gran cantidad de energía en forma de ATP, para el transporte de los iones (principalmente de H^+) a través de la membrana celular (Junqueira y Carneiro, 2002).

La secreción de HCl está controlada a través de terminaciones nerviosas colinérgicas, por la histamina y la gastrina (principal agente estimulante) producidas en la mucosa gástrica (Junqueira y Carneiro, 2002).

En el humano, éstas células también secretan el factor intrínseco, que es una glucoproteína que forma un complejo con la vitamina B₁₂ en el estómago, para que posteriormente se pueda absorber la vitamina en el íleon (Ross, 1997).

- c) Células mucosas del cuello. Se encuentran en pequeño número, aisladas o en grupos, insertadas entre las células parietales en el cuello de las glándulas. Tienen forma irregular, con el núcleo esférico en la base de la célula y gránulos de secreción apicales (Ross, 1997; Finn, 2002). Secretan moco soluble por estimulación no vagal (Ross, 1997).
 - d) Células cimogénicas o principales. Son las más abundantes y se encuentran en la base de la glándula; son de tipo seroso, con basofilia en la porción basal y con gránulos apicales que contienen la proenzima pepsinógeno (se convierte en pepsina con el pH ácido del estómago) (Ross, 1997; Finn, 2002). En el caso del hombre, estas células también producen la enzima lipasa (Ross, 1997; Junqueira y Carneiro, 2002).
 - e) Células endocrinas del tubo digestivo. Son células pequeñas, solitarias y aisladas que producen hormonas polipeptídicas como histamina, serotonina, sustancia P, polipéptido intestinal vasoactivo, gastrina, colecistocinina, glucagón, somatostatina, entre otras (Finn, 2002; Junqueira y Carneiro, 2002).
- Región pilórica. Es la parte más cercana al esfínter pilórico y presenta fosetas muy profundas con glándulas tubulosas, simples, ramificadas o espiraladas, productoras de moco, y muy semejantes a las glándulas de la región del cardias. Contiene abundantes células enteroendocrinas, productoras de gastrina, sustancia que estimula la secreción de las células parietales (Junqueira y Carneiro, 2002).

En la siguiente figura se pueden observar los diferentes tipos celulares que contienen las glándulas gástricas.

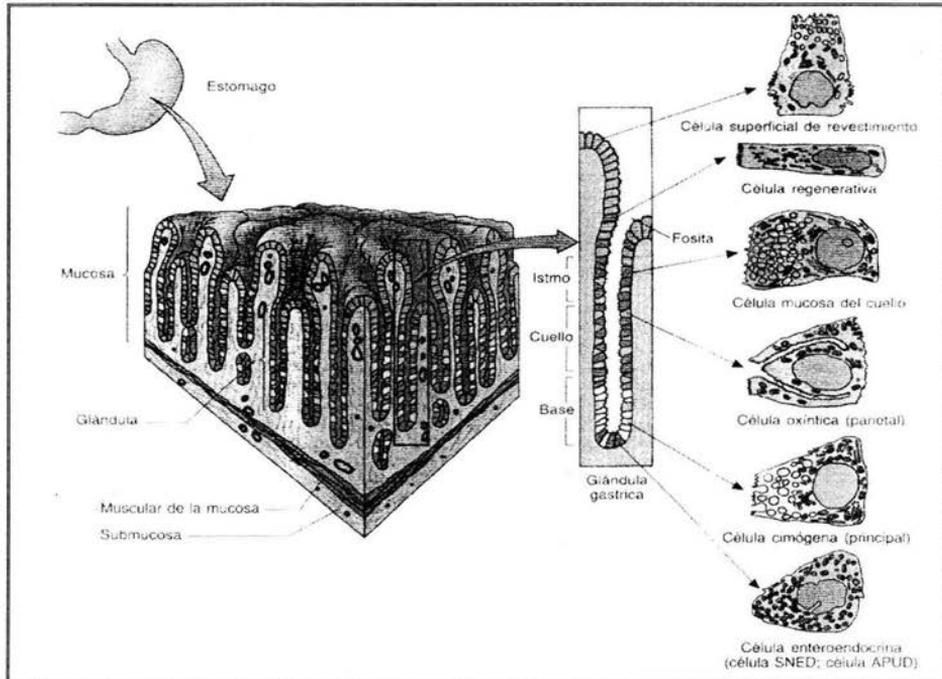


Figura 6. **Morfología del estómago y composición celular de una glándula gástrica** (Gartner y Hiatt, 1997).

1.6.2 Morfología del estómago.

Las paredes del estómago están formadas por cuatro capas principales, que son desde la luz hacia afuera: la mucosa, la submucosa, la muscular y la serosa. Éstas se pueden apreciar en la figura 6.

- Capa mucosa: El revestimiento epitelial del estómago está constituido por células prismáticas secretoras de moco. La superficie interna del estómago se caracteriza por la

presencia de invaginaciones del epitelio de revestimiento dentro de la lámina propia, formando depresiones microscópicas llamadas fosetas gástricas. La mucosa del estómago está constituida esencialmente por un gran número de pequeñas glándulas que se abren en el fondo de esas fosetas. Las glándulas gástricas se localizan en la lámina propia y en la muscular de la mucosa. (Junqueira y Carneiro, 2002).

La lámina propia del estómago es relativamente escasa (alrededor de criptas y glándulas gástricas) y está formada por tejido conjuntivo laxo, entremezclado con fibras musculares lisas e intensamente infiltrado por células del sistema inmune (linfocitos, plasmocitos, macrófagos y algunos eosinófilos). Ocasionalmente se encuentran nódulos linfáticos, cerca de la muscular de la mucosa (Ross, 1997; Junqueira y Carneiro, 2002). La muscular de la mucosa está compuesta por dos capas muy finas, dispuestas en forma circular interna y longitudinal externa. Se encuentran células musculares lisas que se cree facilitan el flujo hacia el exterior de las secreciones de las glándulas gástricas (Ross, 1997).

- Capa submucosa: Formada por tejido conectivo denso rico en vasos sanguíneos y linfáticos, infiltrado por células linfoides, fibras nerviosas, macrófagos y mastocitos (Junqueira y Carneiro, 2002). Además, contiene cantidades variables de tejido adiposo (Ross, 1997).
- Capa muscular: Formada por fibras dispuestas en espiral y orientadas en tres direcciones distintas: longitudinal, circular y oblicua. Entre las capas musculares se encuentran grupos de células ganglionares y haces de fibras nerviosas amielínicas (Ross, 1997; Junqueira y Carneiro, 2002).

La disposición de las capas musculares es importante para recibir grandes volúmenes de alimentos y bebidas ingeridos durante las comidas, para llevar a cabo la acción de mezclar el quimo durante el proceso digestivo, además de la capacidad de forzar el contenido parcialmente digerido hacia el intestino delgado (Ross, 1997).

- **Capa serosa:** Es una membrana serosa compuesta por una capa de epitelio simple plano, el mesotelio, y escasa cantidad de tejido conectivo subyacente. Es la capa más superficial de las porciones del tubo digestivo, se continúa con el mesenterio que lo sostiene y con el revestimiento de la cavidad abdominal (Ross, 1997).

Por la serosa transcurren vasos sanguíneos de gran calibre, vasos linfáticos y troncos nerviosos (desde y hacia el mesenterio). En el tejido conectivo de la serosa se puede desarrollar gran cantidad de tejido adiposo (Ross, 1997).

1.6.3 Función del estómago.

El estómago recibe el bolo de alimentos macerados desde el esófago, y sus funciones principales son continuar la digestión de los carbohidratos iniciada en la boca, proporcionar un líquido ácido a los alimentos ingeridos y transformarlos por acción enzimática y por la contracción muscular en una masa viscosa, el quimo. El quimo pasa entonces al intestino, para seguir la digestión e iniciar la absorción.

El estómago produce la enzima pepsina a través de sus glándulas, la cual inicia la hidrólisis de las proteínas; por su parte, la mucosa del estómago produce una lipasa que digiere los triglicéridos y completa la acción de la lipasa salival.

El revestimiento del estómago no tiene función absorptiva; sin embargo, se puede absorber cierta cantidad de agua, sales y fármacos liposolubles (Ross, 1997).

Para que se lleven a cabo las funciones del estómago, las glándulas gástricas secretan casi 2 litros de líquido por día, el cual incluye además de agua y electrolitos, otras sustancias (Ross, 1997) como:

- Pepsinógeno, un precursor inactivo de la enzima proteolítica pepsina.
- Ácido clorhídrico (HCl 0.16 N), que confiere al jugo gástrico un pH bajo que estimula la hidrólisis ácida de los sustratos y convierte al pepsinógeno en pepsina.

- Factor intrínseco, una glucoproteína esencial para la absorción de vitamina B₁₂ en las porciones más distales del tubo digestivo.

Por su parte, las células enteroendocrinas del epitelio gástrico producen hormonas, como la gastrina y otras secreciones similares a hormonas.

1.6.4 Regeneración normal de la mucosa gástrica.

El epitelio de la mucosa del estómago se renueva por la actividad mitótica de las células madre que se produce en la profundidad de las criptas y en la región del cuello vecina de las glándulas gástricas (Ross, 1997). En estas regiones se originan dos corrientes de células, una se dirige a la superficie de la mucosa y se diferencia en células mucosas de revestimiento (Junqueira y Carneiro, 2002), siendo un proceso relativamente rápido (se calcula que el tiempo de vida promedio de éstas células es de 3 a 5 días en el hombre y luego son eliminadas en la luz del órgano por descamación) (Finn, 2002); mientras que la otra corriente de células se desplaza en dirección opuesta y lentamente se diferencian en células mucosas del cuello, enteroendocrinas, parietales y principales que constituyen el epitelio glandular. Como este último proceso es bastante lento, la regeneración de la región secretora de las glándulas gástricas no se realiza rápidamente; las células de las glándulas gástricas se reemplazan una vez por año, aproximadamente (Ross, 1997; Junqueira y Carneiro, 2002).

1.6.5 Posibles daños al epitelio gástrico.

El estrés, factores psicosomáticos y ciertas sustancias como la aspirina y el alcohol, provocan irritación gástrica, con lo que rompen la capa superficial del epitelio y provocan lesiones en la mucosa. Sin embargo, gracias al poder de proliferación de las células epiteliales el área que sufre erosión puede ser recubierta por nuevas células, o por el contrario, agravada por la acción de la pepsina y el ácido clorhídrico, puede hacerse crónica, dando lugar a la formación de úlceras gástricas y duodenales (Junqueira y Carneiro, 2002).

Por definición, se entiende como úlcera aquella lesión o excavación local en la superficie epitelial de alguna membrana mucosa, un tejido u órgano interno, a causa de la desintegración de tejido necrótico y erosionado, acompañada casi siempre de inflamación subepitelial aguda y crónica (Kumar et al., 2000; Bennington, 2000). Se caracteriza por bordes inflamados, resistencia a la cicatrización, en ocasiones segrega sangre o pus y además produce dolores más o menos intensos.

Las úlceras gástricas además de ser consecuencia de una lesión tóxica a la superficie epitelial del estómago, también pueden ser producidas por compromiso vascular (Kumar et al., 2000). En general se localizan en la curvatura menor del estómago o cerca de ella, particularmente en la pared posterior, a no más de 5 cm del esfínter pilórico (Bennington, 2000). Éstas lesiones generalmente son pequeñas, redondas, perforantes, con bordes bien definidos y suelen convertirse en un mal crónico (Bennington, 2000), habitualmente hay infiltrado neutrofilico intenso temprano con dilatación vascular. En lesiones crónicas donde existen agresiones repetidas, el área que rodea a la úlcera desarrolla proliferación fibroblástica, cicatrización y acumulación de células inflamatorias crónicas (Kumar et al., 2000). Las complicaciones de las úlceras gástricas incluyen hemorragias, perforación y obstrucción (Bennington, 2000).

Por otro lado, pese a que un gran número de factores de riesgo han sido ligados epidemiológicamente con el cáncer gástrico (estómago y colon principalmente), los estudios de daño al ADN en células epiteliales gástricas es limitado. Los factores de riesgo incluyen dietas no balanceadas, tales como dietas altas en sales de sodio o picante, dietas bajas en frutas frescas y vegetales que aporten vitaminas antioxidantes, y la infección con la bacteria *Helicobacter pylori* (Pool-Zobel et al., 1994; Everett et al., 2000). Otro mecanismo que se puede incluir es la acción de carcinógenos heterogéneos, ingeridos en los alimentos o formados endógenamente (Pool-Zobel et al., 1994).

La bacteria *Helicobacter pylori*, puede aumentar el riesgo de cáncer gástrico a través del incremento en la actividad de las especies reactivas de oxígeno, induciendo así

daño oxidativo al ADN. Consecuentemente, el daño oxidativo al ADN ha sido propuesto como un medio de inducción de carcinogénesis gástrica (Everett et al., 2000). La presencia de ésta bacteria se asocia con el desarrollo de úlcera péptica, linfoma gástrico y carcinoma gástrico (Roser et al., 2001).

A través de la vía de administración oral se está expuesto a mutágenos que actúan en forma directa dañando la mucosa gástrica y/ o órganos gastrointestinales. Mientras que los químicos ácido-lábiles pueden ser descompuestos en el estómago y causar directamente daño, algunos mutágenos tienen que ser activados por la microflora en el intestino para que éste sea inducido; la bacteria intestinal normal, por ejemplo, puede reducir azo compuestos a aminas aromáticas (Sekihashi et al., 2001), que son capaces de inducir daño al ADN.

Por otra parte, aunque el tracto gastrointestinal y en particular la mucosa gástrica es el primer sitio directamente expuesto a los químicos administrados oralmente, no siempre existe daño al ADN en un corto tiempo, debido a que pueden presentarse efectos sistémicos, ya que incluso existen sustancias químicas que no actúan en forma directa en el tracto gastrointestinal sino en hígado, pero pueden llegar a producir daño en tracto gastrointestinal debido a recirculación enterohepática (Sekihashi et al., 2001).

El ácido ascórbico es utilizado como antimutágeno en hígado, pero produce daño al ADN en estómago en presencia de nitrito de sodio, debido a que provoca la reducción de éste a óxido nítrico, el cual es responsable del daño (Ohsawa et al., 2003).

Es probable que el óxido nítrico sea convertido dentro del organismo en otras especies reactivas de óxido de nitrógeno, por contacto con oxígeno molecular en el estómago. El óxido nítrico causa sitios abásicos *in vivo*, conduciendo al rompimiento de cadena doble y sencilla del ADN. En un estudio se reportó que los papilomas en estómago, la hiperplasia y la hiperqueratocis era inducidos en ratas alimentadas con morfolina y nitrito al incluir en la dieta ascorbato de sodio. La genotoxicidad del NO en estómago puede ser prevenida por algunos componentes de los jugos de fruta frescos (Ohsawa et al., 2003).

Las nitrosaminas se han propuesto como un factor etiológico del cáncer gástrico y productoras de daño al ADN, éstas pueden formarse endógenamente en el lumen del estómago a pH ácido de sus precursores amina y nitrito (Pool-Zobel et al., 1994; Ohsawa et al., 2003).

Las sales de metales como el cadmio y el níquel, producen efectos genotóxicos en células de mucosa gástrica, puesto que se absorben a lo largo del tracto gastrointestinal después de la exposición oral. Sin embargo, no se ha reportado que éstos sean inductores específicos de tumores gástricos (Pool-Zobel et al., 1994).

La habilidad para estudiar el daño al ADN en el estómago como órgano blanco de algunos xenobióticos, permite una identificación más precisa de los factores de riesgo y así mismo evaluar estrategias de prevención, tales como el tratamiento de la infección por *H. pylori* o la suplementación de vitaminas en la dieta (Everett et al., 2000).

Algunos de los estudios realizados en células epiteliales gástricas empleando la técnica Electroforesis Unicelular en Gel de Agarosa o Ensayo Cometa, muestran que ésta es una técnica reproducible en la medición del daño al ADN en éste tipo celular (Everett et al., 2000). Los pocos estudios realizados quizá se deban a que el propio medio de aislamiento de las células del epitelio gástrico puede inducir daño al ADN y alterar los resultados o la interpretación del Ensayo Cometa (Everett et al., 2000).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que los 4-R-fenilcarbamatos de etilo han mostrado efectividad biológica como antibacterianos y antihelmínticos, es importante conocer los posibles efectos tóxicos que estos compuestos puedan producir en el organismo. Anteriormente se han realizado pruebas de toxicidad *in vitro*, en las cuales los compuestos no han mostrado efectos considerables; sin embargo, se requiere evaluarlos en sistemas vivos, para de esta forma emitir una conclusión acerca de su toxicidad. En el presente estudio se pretende evaluar la capacidad genotóxica de los compuestos considerados como líderes, sobre las células epiteliales del estómago, el cual es su órgano blanco, mediante la técnica de ensayo cometa, elegida en base a todas las ventajas que ofrece como una prueba de monitoreo genotóxico.

Por otro lado, con la evaluación macroscópica del órgano se podrá estudiar el efecto ulceroso que producen los derivados carbámicos y el metocarbamol, dado que la vía de administración para dichos compuestos es oral, lo cual permitirá además realizar una comparación entre dichos efectos, y concluir acerca del grado de daño que inducen los nuevos compuestos.

Con las evaluaciones realizadas en este trabajo se contribuirá con los estudios preclínicos, por los que todo nuevo principio activo debe pasar antes de ser comercializado, considerando que se pretende que los derivados carbámicos sean utilizados como tratamiento para infección a nivel del tracto gastrointestinal, ofreciendo una mejor opción en comparación a los compuestos ya existentes tanto en efectividad como en la capacidad para no producir lesiones en el organismo consumidor.

3. OBJETIVOS

Estudiar el daño que producen los compuestos carbámicos (LQM919, LQM996) sobre el ADN, mediante la administración oral de estos compuestos a ratones y la posterior obtención de células epiteliales de estómago a las 24 horas, para aplicar la técnica de Ensayo Cometa a las mismas y así determinar su capacidad genotóxica.

Determinar el efecto ulceroso de los compuestos carbámicos y el metocarbamol administrados oralmente a ratones, mediante la evaluación macroscópica del estómago, con el fin de comparar éste efecto entre ellos.

4. METODOLOGÍA

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron 12 ratones machos entre 24-30 g de peso, pertenecientes a la cepa CD1, obtenidos de los laboratorios Birmex. Los animales se mantuvieron en cajas, bajo las condiciones de temperatura y humedad del laboratorio de Citogenética de la FES-Cuautitlán, con alimento y agua *ad libitum*.

4.2 MATERIAL

- Tubos de ensaye para centrifuga
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Pipetas pasteur
- Micropipeta 50 a 150 μ L
- Tubos de eppendorff
- Tubos de ensaye
- Vasos deprecipitados de 50, 100, 250, 2000 mL
- Matracas Erlenmeyer de 250, 500, 1000 mL
- Probeta de 100 mL
- Matracas volumétricos de 50, 250, 500, 1000 mL
- Puntas para micropipeta
- Cubreobjetos largos
- Vasos Copplin
- Portaobjetos esmerilados
- Gradillas
- Estuche de disección
- Cámara de Neubauer
- Cajas y alimento para animales

4.3 EQUIPO

- Microscopio de fluorescencia Iroscope, con filtro de excitación de 515-560 nm y filtro de barrido de 590 nm
- Microscopio óptico Karl Zeiss
- Cámara de electroforesis Bio-Rad sub cell, modelo 192
- Centrífuga clínica BHG Boto-Uni II
- Balanza analítica Scaltec
- Estufa de incubación Blue M
- pH-metro Conductronic pH 130
- Parrilla con agitación Corning

4.4 REACTIVOS

Tripsina Sigma

KCl (Cloruro de potasio) J.T. Baker

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fosfato de sodio dibásico) J.T. Baker

KH_2PO_4 (Fosfato de potasio monobásico) J.T. Baker

NaH_2PO_4 (Fosfato de sodio monobásico) J.T. Baker

NaHCO_3 (Bicarbonato de sodio) J.T. Baker

Dextrosa J.T. Baker

Azul de Tripán Sigma

NaCl (Cloruro de sodio) Sigma

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) Sigma

Tris (Trizma base) Sigma

NaOH (Hidróxido de sodio) Sigma

HCl (Ácido clorhídrico) J.T. Baker

Tritón X-100 Sigma

DMSO (Dimetil sulfóxido) Sigma

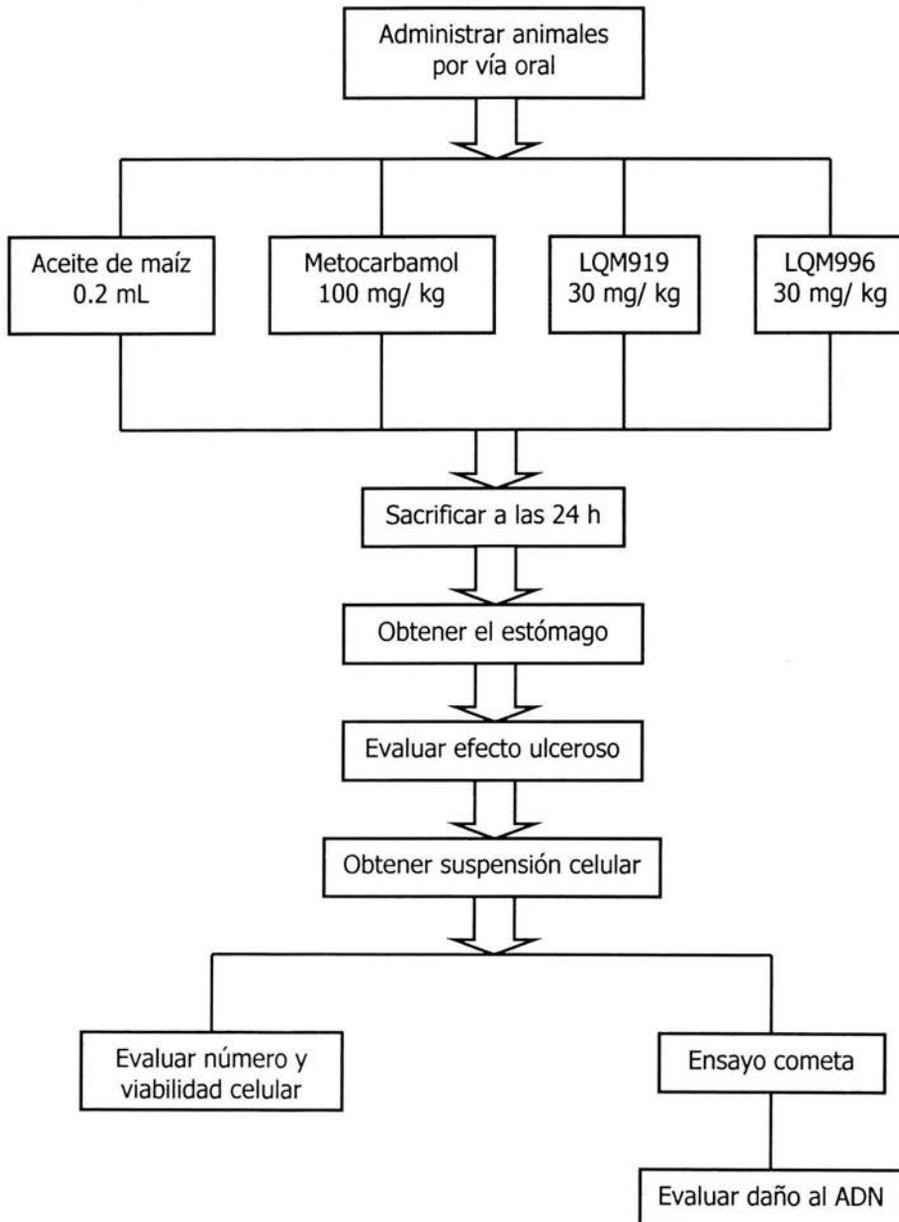
Bromuro de etidio Sigma

Agarosa normal y LMPA (Agarosa de bajo punto de fusión) Sigma

Agua desionizada

Agua destilada

4.5 Diagrama del proceso experimental para el estudio genotóxico de los derivados carbámicos LQM919 y LQM996.



4.6 MÉTODOS

4.6.1 Inducción de animales.

Pesar y distribuir aleatoriamente los ratones. Establecer 4 lotes de 3 animales cada uno, como se muestra en la tabla 4 y administrar los diversos tratamientos por vía oral, sin período de vaciamiento gástrico.

Tabla 4. **Distribución de grupos de trabajo.**

LOTE	TRATAMIENTO
TESTIGO NEGATIVO	Aceite de maíz (0.2 mL)*
TESTIGO POSITIVO	Metocarbamol (100 mg/ kg)
LQM919	30 mg/ kg
LQM996	30 mg/ kg

* Vehículo de los derivados carbámicos.

4.6.2 Obtención del órgano.

1. Sacrificar al animal por dislocación cervical a las 24 horas de la inducción y obtener el estómago. Recibir en PBS frío y limpiar el órgano de restos de grasa y tejido.

4.6.3 Evaluación del efecto ulceroso (Khattab et al., 2001).

1. Lavar el órgano con aproximadamente 5 mL de SSF (antes de abrirlo). Abrir el estómago siguiendo la curvatura menor, lavar en PBS frío y posteriormente en SSF.
2. Realizar la observación macroscópica del órgano con una lupa y medir el tamaño de la lesión con una regla.
3. Evaluar estadísticamente los resultados del promedio de cada grupo mediante el análisis de varianza y la posterior comparación múltiple de los grupos con la prueba de Student-Newman-Keuls, con $\alpha = 0.05$. Utilizar el programa estadístico INSTAT PAD, versión 2.03, para el tratamiento de los datos.

4.6.4 Obtención de la suspensión celular (Morales et al., 1994; Velázquez, 2000; modificada).

1. Cortar aproximadamente 1 cm del cuerpo del estómago, y lavar con PBS. Finalizar con un lavado en SSF.
2. Realizar pequeños cortes a la porción de órgano y colocar en un matraz que contenga: tripsina 1% (0.5 mL), EDTA 40 mM (1 mL), medio para tripsina (8.5 mL), previamente a 37°C. Mantener en estas condiciones durante 13 minutos, con agitación constante.
3. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm. Retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 10 mL de EDTA 4 mM.
4. Disgregar aún más el tejido con ayuda de tijeras y pasar por jeringa de 5 mL con aguja calibre 32 x 21 mm. Centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos.
5. Retirar sobrenadante y resuspender en 10 mL de EDTA 4mM. Pasar nuevamente por jeringa de 5 mL con aguja calibre 32 x 21 mm y centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos.
6. Realizar un último lavado con 10 mL de EDTA 4 mM, centrifugando a 1500 rpm por 5 minutos.
7. Retirar el exceso de sobrenadante (dejar aproximadamente 0.7 mL) para obtener la suspensión celular.

4.6.5 Conteo celular y viabilidad (Pool-Zobel et al., 1994; Enciso, 2000).

1. Colocar 100 μ L de la suspensión celular en un tubo de eppendorff y adicionar 100 μ L de azul de tripán. Homogeneizar.
2. Llenar la cámara de Neubauer y dejar reposar durante 5 minutos.
3. Contar las células de 2 cuadros primarios de la cámara de Neubauer y obtener el número de células promedio, así como el porcentaje de células vivas y células muertas.

El azul de tripán es un colorante de exclusión, el cual permite diferenciar las células vivas de las muertas, éstas últimas aparecen completamente teñidas por el colorante.

4.6.6 Técnica de Ensayo cometa (Singh et al., 1988; Everett et al., 2000; modificada).

4.6.6.1 Preparación de laminillas.

1. Preparar una cámara con solución de lisis pH 10 (NaCl 2.5M, Na₂EDTA 100mM, Tris 10mM, NaOH, Tritón X-100 y DMSO) y colocar en refrigeración.
2. Colocar una capa de agarosa normal al 0.5% por la parte esmerilada de los portaobjetos (dejar que solidifique sobre una placa de hielo de 3 a 5 minutos).
3. Calentar la agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% y mantenerla en baño de agua a 37°C durante su utilización.
4. Mezclar 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión (por cada laminilla) con la suspensión celular.
5. Adicionar 75 µL de la mezcla agarosa-células sobre un cubreobjetos y colocar inmediatamente el portaobjeto con agarosa regular, de manera que ésta entre en contacto con la mezcla. Dejar solidificar sobre una placa de hielo de 3 a 5 minutos.
6. Retirar los cubreobjetos con cuidado por desplazamiento y colocar los portaobjetos dentro de la cámara con solución de lisis fría, recién preparada. Proteger de la luz y colocar en el refrigerador a 4°C durante 1 hora.

4.6.6.2 Electroforesis.

1. Retirar los portaobjetos de la solución de lisis y colocar en la cámara de electroforesis.
2. Llenar la cámara con buffer de electroforesis pH 13, recién preparado hasta cubrir los portaobjetos. Mantener en estas condiciones durante 5 minutos.
3. Realizar el corrimiento electroforético a 25 volts y 300 miliamperes, durante 25 minutos.
4. Retirar los portaobjetos de la cámara y colocar en una bandeja de tinción, gotear buffer de neutralización hasta cubrirlos en tres ocasiones a intervalos de 5 minutos.
5. Escurrir los portaobjetos y colocar en cámara húmeda. Pueden guardarse a 4°C hasta por 72 horas.

4.6.6.3 Tinción de las preparaciones.

1. Adicionar 50 μ L de solución de bromuro de etidio 1X sobre un cubreobjetos y colocar la preparación de manera que ésta entre en contacto con el colorante.
2. Examinar las laminillas después de secar el exceso de colorante en el reverso y los bordes con una gasa.

4.6.6.4 Evaluación del daño al ADN.

1. Realizar la visualización del daño al ADN con el objetivo de 40X, mediante un micrómetro ocular montado en un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrido de 590 nm.
2. Realizar la evaluación en 25 células por cada animal, incluyendo los respectivos testigos (+) y (-): medir el diámetro del núcleo celular y la longitud total de la imagen observada (longitud del cometa).
3. Obtener el promedio y la media de medias de los datos de cada grupo, y con ello realizar el análisis de varianza y la posterior comparación múltiple mediante la prueba de Student-Newman-Keuls, con $\alpha = 0.05$.

El programa estadístico que se utilizó para el tratamiento de los datos fue INSTAT PAD, versión 2.03.

5. RESULTADOS

5.1 EFECTO ULCEROSO

El efecto de los derivados carbámicos LQM919 y LQM996, así como del testigo positivo y negativo, sobre la formación de lesiones en el epitelio gástrico se muestra en la tabla 5 y figura 7, reportado como el índice de úlcera.

El índice de úlcera se estimó de acuerdo al método de Khattab, mediante la siguiente fórmula (Khattab et al., 2001):

$$\text{Índice de úlcera} = \Sigma \text{Tamaño de las lesiones (mm)}$$

Como se puede observar los derivados carbámicos mostraron diferente acción ulcerativa. Mientras que el compuesto LQM919 alcanzó un Í.U. = 3.0 mm, siendo estadísticamente significativo con respecto al testigo negativo, el compuesto LQM996 tuvo un Í.U. = 1.7 mm, similar al efecto del aceite de maíz.

No obstante que el carbamato LQM919 produjo un efecto ulcerativo, éste nunca fue igual al obtenido por el metocarbamol, que al ser la sustancia utilizada como testigo positivo alcanzó un Í.U. = 5.7 mm. Ambos derivados carbámicos mostraron diferencia estadística significativa con el grupo anterior, puesto que presentaron un índice del úlcera menor (Tabla 5 y Figura 7).

Tabla 5. Efecto ulceroso producido por los diversos tratamientos.

LOTE	TRATAMIENTO	ÍNDICE DE ÚLCERA (mm) +/- D.E.
TESTIGO NEGATIVO	Aceite de maíz	1.3 +/- 0.58
TESTIGO POSITIVO	Metocarbamol 100 mg/ kg	5.7 +/- 0.58 *
LQM919	30 mg/ kg	3.0 +/- 1.0 *
LQM996	30 mg/ kg	1.7 +/- 0.58

Los resultados son el promedio +/- D.E. de las lesiones (n = 3).

* Diferencia estadística significativa con respecto al aceite de maíz, Student-Newman-Keuls $p < 0.05$.

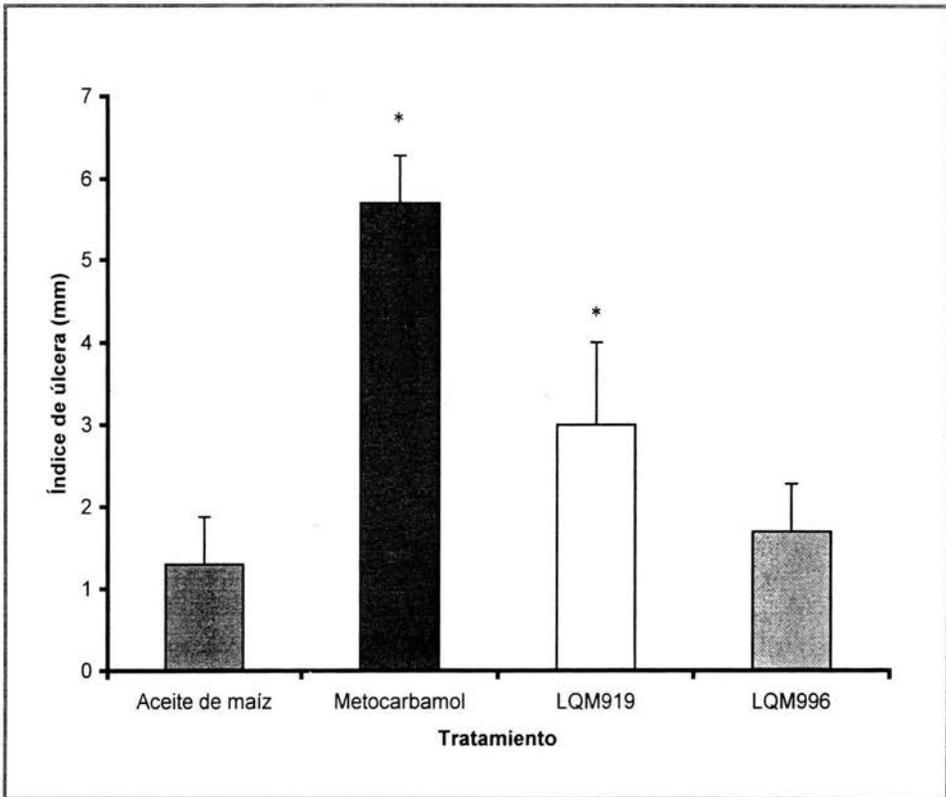


Figura 7. Valores promedio +/- D.E. del índice de úlcera producido por los derivados carbámicos, el testigo positivo y el testigo negativo.

* Diferencia estadística significativa con respecto al aceite de maíz, Student-Newman-Keuls $p < 0.05$.

5.2 CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR

En el aislamiento de células epiteliales de estómago mediante digestión enzimática con tripsina/ EDTA, se obtuvo un número y viabilidad celular aceptable por cada grupo (125×10^4 células/ cm^3 y mayor al 90%, respectivamente).

El conteo celular se estimó de acuerdo a la siguiente fórmula (Freshney, 1991):

$$\text{Células/ cm}^3 = \text{Número de células} \times 10^4$$

La viabilidad celular se estimó de acuerdo a la siguiente fórmula (Enciso, 2000; www.cometassay.com):

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{Promedio de células vivas} / \text{Promedio de células totales}) \times 100$$

Los resultados de cada grupo se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Viabilidad y conteo celular.

LOTE	TRATAMIENTO	CÉLULAS/ cm ³	% VIABILIDAD CELULAR +/- D.E.
TESTIGO NEGATIVO	Aceite de maíz	125 x 10 ⁴	90.85 +/- 0.81
TESTIGO POSITIVO	Metocarbamol 100 mg/ kg	126 x 10 ⁴	90.18 +/- 0.56
LQM919	30 mg/ kg	126 x 10 ⁴	90.44 +/- 1.11
LQM996	30 mg/ kg	125 x 10 ⁴	90.12 +/- 1.05

Los resultados son el promedio +/- D.E. del número de células (n = 3).
No hubo diferencia estadística significativa entre los grupos, ANOVA p>0.05.

5.3 ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE DAÑO AL ADN

El índice de daño al ADN obtenido a través de la relación longitud/ diámetro de las imágenes de cometas observadas en las células del epitelio gástrico de cada grupo después de los diversos tratamientos se muestra en la tabla 7 y figura 8.

En éstas se observa que el índice de daño al ADN producido por el derivado carbámico LQM919 no mostró diferencia estadística significativa con respecto al testigo negativo ($p>0.05$); mientras que el derivado LQM996 sí la presentó ($p<0.05$). Sin embargo, entre ambos derivados carbámicos no existió diferencia estadística alguna ($p>0.05$).

Tabla 7. Valores promedio +/- D.E. del índice de daño sobre las células del epitelio gástrico a las dosis empleadas de los diversos tratamientos.

LOTE	TRATAMIENTO	PROMEDIO ¹ +/- D.E.	PROMEDIO ² +/- D.E.
TESTIGO NEGATIVO	Aceite de maíz	1.0 +/- 0	1.0 +/- 0
		1.0 +/- 0	
		1.0 +/- 0	
TESTIGO POSITIVO	Metocarbamol 100 mg/ Kg	4.1 +/- 1.53	3.3 +/- 1.63 *
		3.9 +/- 1.90	
		3.8 +/- 1.39	
LQM919	30 mg/ Kg	1.2 +/- 0.54	1.2 +/- 0.58
		1.4 +/- 0.80	
		1.1 +/- 0.19	
LQM996	30 mg/ Kg	1.4 +/- 0.53	1.4 +/- 0.47 *
		1.6 +/- 0.47	
		1.2 +/- 0.31	

¹ Los resultados son el promedio +/- D.E. de 25 células por animal.

² Los resultados son la media de medias +/- D.E. de cada grupo (n = 3).

* Diferencia estadística significativa con respecto al aceite de maíz, Student-Newman-Keuls $p<0.05$.

Por lo que respecta al testigo positivo (grupo administrado con metocarbamol), el índice de daño al ADN alcanzó un promedio cuatro veces mayor en relación a los demás grupos, siendo un valor estadísticamente significativo con todos ellos ($p < 0.001$) (Tabla 7 y Figura 8), lo que pone de manifiesto el bajo efecto genotóxico de los nuevos derivados carbámicos.

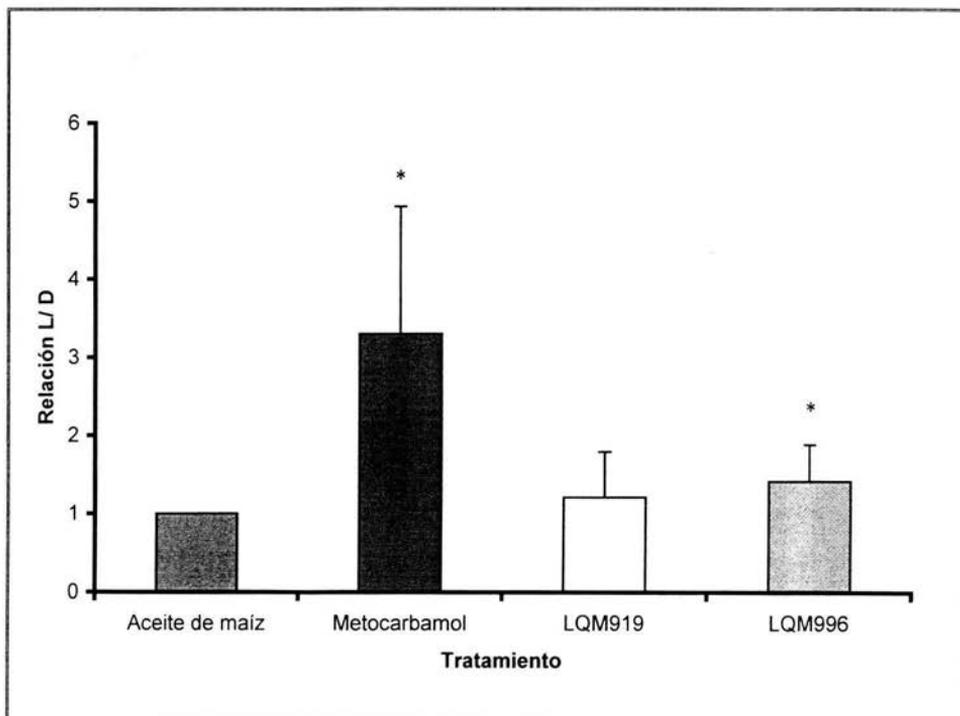


Figura 8. Valores promedio \pm D.E. del índice de daño producido por los derivados carbámicos, el testigo positivo y el testigo negativo.

* Diferencia estadística significativa con respecto al aceite de maíz, Student-Newman-Keuls $p < 0.05$.

La apariencia de las imágenes típicas de las células con cometas producto de la administración de los diferentes tratamientos y la posterior aplicación del SCGE en condiciones alcalinas y tinción con bromuro de etidio, puede observarse en la figura 9A a 9E.

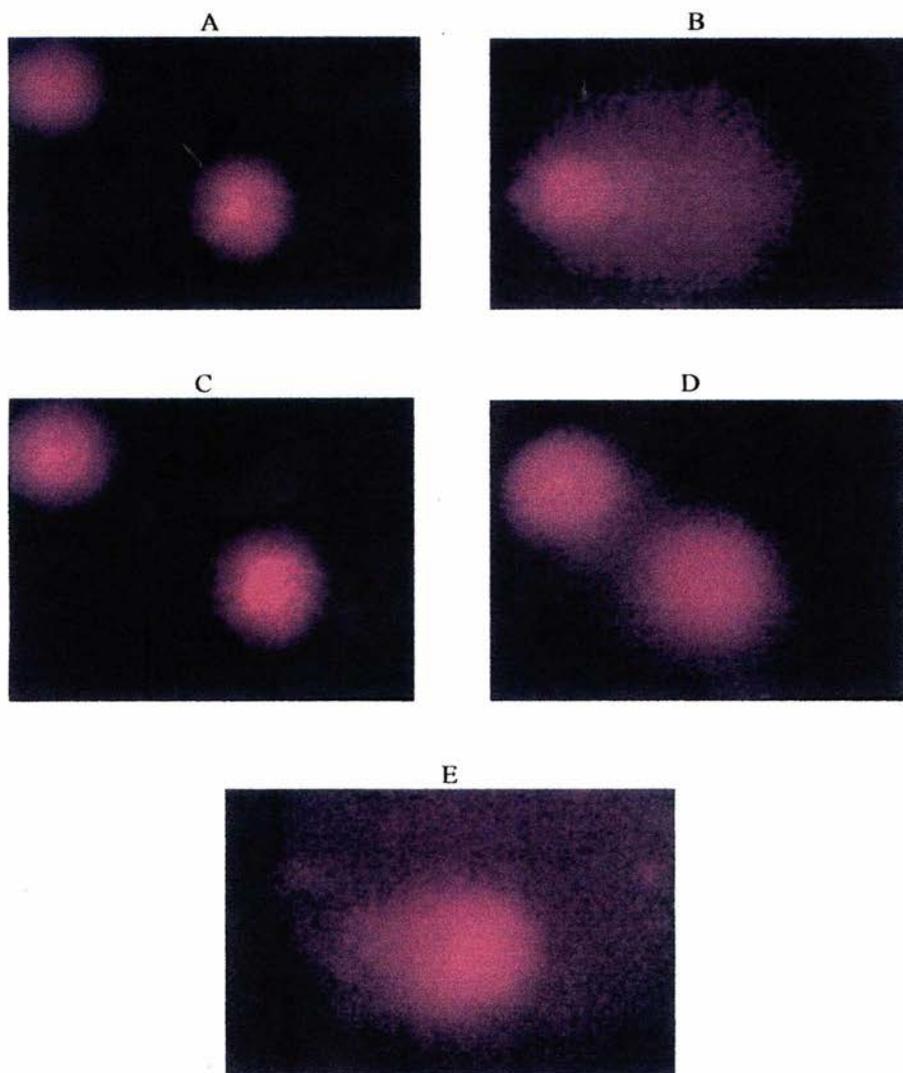


Figura 9. Fotografías representativas de la apariencia de los núcleos celulares después del SCGE en condiciones alcalinas y tinción con bromuro de etidio (100X). (A) Testigo negativo con núcleo celular circular perfectamente definido; (B) testigo positivo, núcleo con apariencia típica de cometa; (C) LQM919, núcleo celular perfectamente definido; (D) LQM996, núcleo celular definido sin alto grado de compactación del ADN; (E) LQM996, cantidad moderada de ADN dañado se aprecia en forma de cometa.

5.4 DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL CELULAR DE LA RELACIÓN LONGITUD/ DIÁMETRO

En la distribución porcentual celular de la relación longitud/ diámetro obtenida en el estudio (Figura 10), se observa que el derivado carbámico LQM919 presentó un comportamiento semejante al testigo negativo, es decir, el 79% de las células presenta valores de la relación longitud/ diámetro muy cercanos del valor de 1.0, el cual es representado por el 100% de las células del testigo negativo.

En el caso del derivado carbámico LQM996, éste presentó daño en el 69% de células, siendo mayor la frecuencia de valores de la relación longitud/ diámetro en el intervalo de 1.1 a 2.0, alejándose un tanto del valor de 1.0.

Por lo que respecta al testigo positivo, se observa la formación de cometas en el 89% de las células, las cuales presentan valores de la relación longitud/ diámetro alejados del valor de 1.0, encontrándose una mayor frecuencia de células con valores de la relación longitud/ diámetro en el intervalo de 2.0 a 4.0.

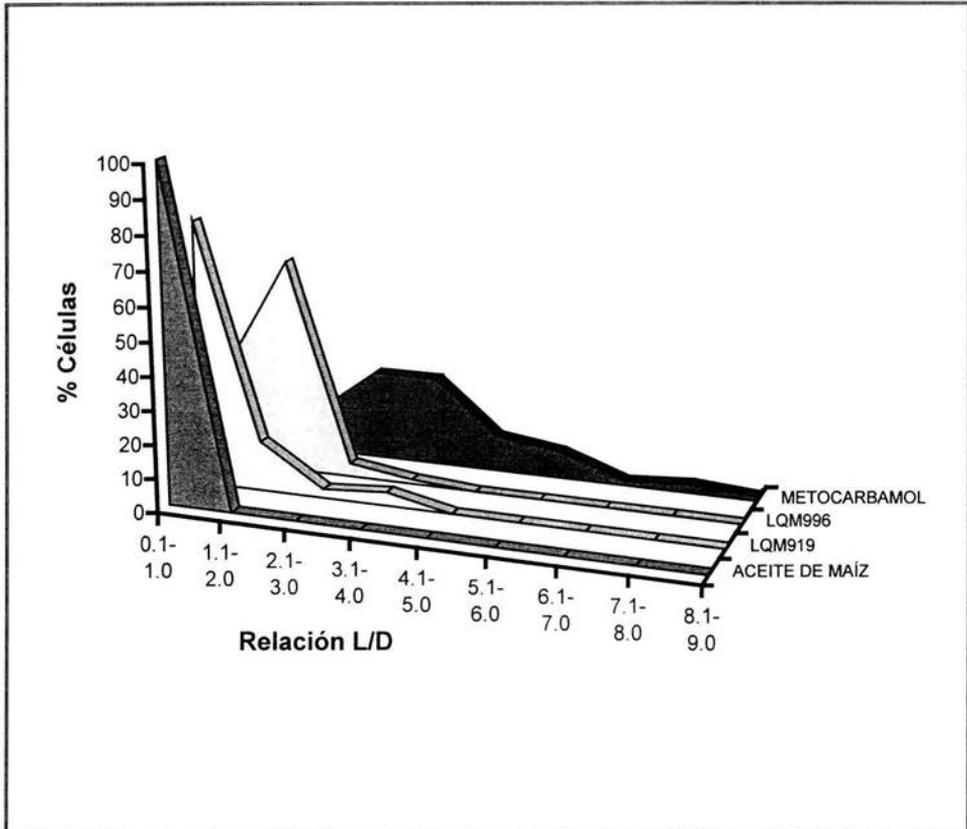


Figura 10. Distribución del daño celular producido por los diversos tratamientos, en base a la relación longitud/ diámetro.

6. DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos del índice de úlcera, se observó que las lesiones se presentaron a las 24 horas de administración con ambos derivados carbámicos, siendo mayor en el caso del LQM919 (3.0 mm); sin embargo, fue menor con respecto al metocarbamol (5.7 mm). Por su parte, el LQM996 tuvo un índice de úlcera similar al testigo negativo (1.7 y 1.3 mm respectivamente).

Las lesiones de apariencia redonda y pequeña, se localizaron en la curvatura menor del estómago, cerca de la región pilórica; éstas se acompañaban de un proceso inflamatorio e irritación, características principales de lo que es propiamente una lesión de tipo ulcerativo en su fase inicial, ya que no se observó perforación ni segregación de sangre o pus; sin embargo, es importante considerar que el tiempo de exposición no fue el necesario para producir una lesión de tipo ulcerativo perforante y crónico, puesto que este tipo de lesión se produce sólo en caso de una administración repetida, dañando así en forma continua al epitelio gástrico. Por otro lado, para confirmar el efecto ulcerativo se requiere la determinación de la presencia de células inflamatorias en el área de la lesión y del factor de crecimiento transformante α , éste último es normalmente expresado en la mucosa gástrica para mantener las funciones fisiológicas de la misma e incrementa significativamente su expresión en la mucosa gástrica ulcerada (Konturek, et al., 2002).

En este estudio, se empleó una dosis de 30 mg/ kg de los derivados carbámicos sobre las células de un órgano blanco, el estómago; sin embargo, el tiempo de exposición fue corto, por lo cual se presume que no se inició un proceso de reparación de las lesiones inducidas al epitelio gástrico, por los diversos tratamientos. Así, bajo estas condiciones, los derivados carbámicos no producen lesiones considerables sobre la mucosa gástrica en comparación con el metocarbamol. El bajo índice de úlcera que mostró el derivado LQM996, similar al testigo negativo, indica que éste provoca un menor daño a la mucosa gástrica en comparación con el derivado LQM919 (Tabla 5 y Figura 7), lo cual puede

relacionarse con la citotoxicidad que éste último presenta, la cual fue evaluada mediante la relación EPC/ ENC en la prueba de MN (Márquez, 2002).

Puesto que el tiempo de exposición a los derivados carbámicos fue corto, se recomienda realizar un estudio subagudo y crónico, que permita evaluar si las lesiones de tipo ulcerativo sobre la mucosa gástrica son considerables. Cabe señalar que en un estudio prolongado intervendría el proceso de reparación de las lesiones, donde el NO (óxido nítrico) como molécula endógena protege la mucosa gástrica, disminuyendo el efecto ulceroso y acelerando la reparación de las úlceras, ya que promueve el crecimiento de músculo liso y modula la adhesión leucocitaria (Mahmoud et al., 2001). De esta forma, si las lesiones persisten aún después del proceso de reparación, entonces el efecto producido por los derivados carbámicos sería importante de considerar.

Por otro lado, la realización de estudios *in vivo*, requiere la obtención de una suspensión celular del material de biopsia sólido (Everett et al., 2000). En este estudio se reportan las condiciones óptimas para la digestión del material sólido mediante el empleo de tripsina y EDTA, bajo las cuales se logró obtener suficientes células del epitelio gástrico para estudiar el efecto genotóxico de los derivados carbámicos mediante el ensayo cometa (Tabla 6).

Es importante señalar que la aparición de lesiones en el epitelio gástrico no afectó la viabilidad y cuenta celular, puesto que la porción del órgano empleada para la evaluación del efecto genotóxico fue del cuerpo del estómago, en la cual se encuentra la mayor proporción de células parietales y principales.

Los resultados obtenidos de la viabilidad celular por exclusión con azul de tripán, muestran que el promedio fue mayor al 90% (Tabla 6), lo cual indica que las células epiteliales gástricas se obtuvieron adecuadamente y que tenían las condiciones suficientes para entrar al ensayo cometa, considerando que para llevar a cabo tal ensayo en forma confiable el valor mínimo requerido es del 80%.

Otras técnicas de aislamiento celular en las que se ha empleado digestión enzimática con pronasa y colagenasa, seguidas por exclusión con azul de tripán, producen una viabilidad media del 73% (Everett et al., 2000); por lo que, tales células no podrían ser sometidas al ensayo cometa. Sin embargo, es importante señalar que en estas técnicas de aislamiento celular es crucial la concentración de enzimas y el tiempo de digestión, de tal forma que no se comprometa la viabilidad celular y, no se liberen células de edad variada y diferenciación de la cripta epitelial (Everett et al., 2000).

Bajo las condiciones de ensayo en este trabajo, se encontró que el aislamiento celular mediante digestión enzimática no indujo daño al ADN, lo cual concuerda con el método empleado por Everett (2000), y puede observarse en el índice de daño que presentó el testigo negativo, de acuerdo al valor de la relación longitud/ diámetro celular (Tabla 7 y Figura 8), aunque se ha reportado que la tripsinización e incluso cualquier otro medio de aislamiento de células del epitelio gástrico, pueden inducir daño al ADN y alterar los resultados o interpretación del ensayo cometa (Everett et al., 2000).

Lo anterior, aunado a que el estómago no presentó lesiones de tipo ulcerativo y que la viabilidad celular fue adecuada, nos lleva a considerar que no hubo efecto citotóxico, ni daño al ADN ajeno a los tratamientos; por lo tanto, el efecto que presentaron las células epiteliales gástricas se debe a los compuestos administrados, por mecanismos de genotoxicidad.

Así, el derivado carbámico LQM996 a una dosis de 30 mg/ kg, presenta un índice de daño mayor en comparación con el testigo negativo, aunque no produce un efecto genotóxico como el testigo positivo (Tabla 7 y Figura 8). Entre ambos compuestos no se presentó una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al índice de daño a la dosis empleada; sin embargo, el derivado carbámico LQM919 no produce un efecto genotóxico sobre las células del epitelio gástrico, ya que en la observación el 79% de los núcleos celulares aparecieron íntegros, en comparación con el 100% reportado por el testigo negativo. Por su parte, el derivado LQM996 presentó daño al ADN en el 69% de las células gástricas, mientras que el metocarbamol presentó tal efecto en el 80% de la población

celular (Figura 10). El índice de daño producto de las rupturas al ADN que presentó el derivado carbámico LQM996 no es elevado, en comparación con el testigo positivo, considerando que las células observadas con cometas, no mostraban grandes longitudes de extensión de la cauda, con base a la distribución de la relación longitud/ diámetro celular (Figura 8 y 9); sin embargo, es importante señalar que el daño al ADN producido por éste compuesto se reporta a nivel unicelular, motivo por el cual es conveniente la realización de una curva de inducción a diferentes horas, en la cual se pueda observar el efecto del compuesto y de esta manera descartar la posibilidad de un comportamiento genotóxico por parte del mismo.

En la relación longitud/ diámetro celular es importante interpretar que el valor de 1.0 o muy cercano a éste, representa células con núcleo íntegro o casi íntegro, perfectamente definido en forma circular por el grado de compactación del ADN. Por el contrario, cuando el valor de la relación longitud diámetro celular se aleja de 1.0 resulta la formación de cometas, lo cual refleja que las células han experimentado un efecto genotóxico, como el que muestra el testigo positivo (Figura 8 y 9).

De acuerdo a lo anterior, el tiempo de tratamiento con los diversos compuestos fue suficiente para inducir daño al ADN, aunque éste no fue considerable por parte de los derivados carbámicos. Éste se dio por la formación de sitios álcali lábiles y rompimientos sencillos en la cadena de ADN, los cuales fue posible evaluar mediante la técnica de ensayo cometa en condiciones alcalinas; sin embargo, éste ensayo no indica el mecanismo por el cual ocurren los rompimientos.

En la prueba de MN realizada por Márquez (2002), se observó que la escasa formación de MN fue mayor por parte del derivado carbámico LQM919 y que éstos fueron producto de ruptura cromosómica; mientras que con la prueba de ensayo cometa, empleada en este estudio, el derivado LQM996 mostró un mayor número núcleos con migración del ADN dañado, dando la apariencia de cometa (Figura 9E). Esto indica que hay diversos mecanismos por los cuales se puede dañar al ADN, de ahí que sea necesario realizar ensayos *in vitro* e *in vivo*, con baterías de pruebas que determinen el daño al ADN (Tabla

1), para de esta forma asegurar que los compuestos sometidos a las mismas producen o no daño genotóxico. Además, se puede definir si el compuesto es mutágeno, al obtener resultados positivos en por lo menos dos pruebas de genotoxicidad.

Dado que el índice de daño al ADN producido por la administración de los derivados carbámicos no fue considerable en ninguna prueba, en comparación con el marcado efecto genotóxico que mostraron los testigos positivos empleados en las respectivas pruebas, éstos derivados se visualizan como agentes no genotóxicos .

El comportamiento de los nuevos derivados carbámicos como agentes capaces de inducir escasas rupturas al ADN, puede deberse a que son compuestos halogenados, lo cual implica que poseen cierto carácter electrofílico influenciado por el propio sustituyente de cada compuesto, éste carácter es mayor en el caso del derivado LQM919, que posee como sustituyente al Bromo. Un estudio realizado por Holmstrom (1990), reporta que un etil carbamato como el uretano, el cual no posee halógenos en su estructura, al ser sometido a una evaluación de genotoxicidad como la prueba de MN, resultó negativo al no inducir la formación de EPCMN. Por otro lado, él que los nuevos derivados carbámicos sean compuestos halogenados contribuye a que su destoxificación se de en forma lenta, y por lo tanto a que se produzca algún tipo de daño.

De acuerdo a éste estudio, los derivados carbámicos LQM919 y LQM996 no producen un efecto genotóxico, ni lesiones importantes sobre la mucosa gástrica, a la dosis de 30 mg/ kg. dosis a la cual se ha estudiado su actividad biológica antiparasitaria; sin embargo, en el caso del LQM996 contar con la DE_{50} resulta necesario para poder discernir si el daño unicelular al ADN producido por éste, es considerable, ya que posiblemente la dosis empleada en el estudio fue mayor a ésta, reduciendo así el margen de seguridad del compuesto, llegando a una dosis tóxica en la cual fue capaz de inducir tal daño. Otros parámetros que serían importantes de conocer y que ayudarían a indicar la dosis adecuada a la cual se conserva la actividad biológica del compuesto, sin producir algún tipo de daño, son la farmacocinética y la farmacodinamia del mismo; ya que la farmacocinética por su parte asegura la disponibilidad del compuesto en el organismo para llevar a cabo el efecto

farmacológico e incluso manifestar su toxicidad, teniendo en cuenta que algunos compuestos pueden producir daño por recirculación enterohepática (Sekihashi et al., 2001). Mientras que la farmacodinamia indica la forma en la cual el compuesto o sus metabolitos están manifestando tales efectos.

Presumiendo que éstos compuestos no causan riesgo al organismo y que muestran importante actividad biológica, se recomienda que se sometan a los estudios farmacológicos correspondientes, para que así puedan pasar a la siguiente fase de investigación, que comprende los estudios clínicos.

Puesto que el ensayo cometa resultó ser una técnica válida en células gástricas, como lo reporta Everett (2000), ésta puede ser empleada para estudiar carcinógenos sobre dichas células *in vitro* o para ensayar los factores de riesgo *in vivo* de sustancias administradas vía oral e incluso monitorear el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*, contribuyendo así en forma significativa a los estudios de genotoxicidad.

7. CONCLUSIONES

1. La digestión enzimática como método de aislamiento celular permitió obtener un número y viabilidad celular adecuados sin la inducción de daño al ADN.
2. El índice de úlcera como parámetro de evaluación de las lesiones producidas sobre la mucosa gástrica indicó que los derivados carbámicos no las producen en forma significativa.
3. El ensayo cometa es una técnica sensible que permitió detectar el índice de daño inducido por el derivado carbámico LQM996 sobre las células del epitelio gástrico a la dosis empleada, aún cuando éste no produjo un efecto genotóxico como el metocarbamol.
4. El derivado carbámico LQM919 se comporta de manera similar al testigo negativo, siendo un agente no genotóxico, pero presenta un mayor índice de úlcera que el derivado carbámico LQM996.
5. Se recomienda estudiar la genotoxicidad de los derivados carbámicos a tiempos de exposición prolongados.
6. Es necesario realizar todas las evaluaciones farmacológicas a los nuevos compuestos carbámicos.

APÉNDICE: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

PBS (Solución buffer de fosfatos)

NaCl	10.00 g
KCl	0.25 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g

Diluir en 1000 mL de agua desionizada. Se recomienda preparar poco, filtrarlo y refrigerar.

Medio para tripsina

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
NaH ₂ PO ₄	0.50 g
NaHCO ₃	1.00 g
Dextrosa	2.00 g

Diluir en 1000 mL de agua destilada y refrigerar.

EDTA 40 mM

Pesar 1.4896 g de EDTA y diluir en 100 mL de medio para tripsina.

Mantener en refrigeración.

EDTA 4 mM

Tomar 20 mL de EDTA 40 mM y diluir con 180 mL de medio para tripsina.

Mantener en refrigeración.

Tripsina 1%

Diluir 0.1 g de tripsina en agua destilada y aforar a 10 mL. Mantener en refrigeración.

Agarosas

La agarosa de normal punto de fusión y de bajo punto de fusión (LMP) se preparan al 0.5% en PBS (libre de Ca^{++} y Mg^{++} , o sea preparada en agua desionizada).

0.125 g en 25 mL

0.250 g en 50 mL

1. Pesar la agarosa, colocarla en un vaso de precipitado de 50 mL que contenga el PBS y mezclar un poco.
2. Comenzar su calentamiento en placa agitando continuamente hasta que la solución sea transparente (cuidar la ebullición, no debe ser excesiva).
3. Guardar en el refrigerador (4°C), en viales de 5 mL el LMP y en un vaso pequeño el agarosa normal.

Utilizar el horno de microondas o un baño maría para su fusión al momento de emplearla.

NOTA: El agarosa normal puede prepararse a otras concentraciones con la finalidad de lograr una fuerte adherencia a los portaobjetos. Las variaciones usuales son: 0.75% o 1.0%.

Solución stock de lisis

		g/ 1000 mL
NaCl	2.5 M	146.1
EDTA	100 mM	37.2
Trizma base	10 mM	1.2
NaOH		≈10.0
Agua destilada	c.b.p.	890 mL

Con el NaOH poner a pH = 10, así se solubilizan todas las sales. Esterilizar por filtración y guardar a temperatura ambiente.

Solución lisis de trabajo

Por vaso coplin de 30 mL

Solución stock de lisis	26.7 mL
Dimetilsulfóxido	3.0 mL
Tritón X-100	0.3 mL

Buffer de electroforesis

Solución "A"

NaOH 10 N, 200 g en 500 mL de agua desionizada fría.

Esta solución caduca en dos semanas.

Solución "B"

EDTA sal disódica 200 mM, 14.89 g en 200 mL de agua desionizada.

Mantener ambas soluciones en refrigeración.

Buffer de trabajo de electroforesis

Mezclar 30 mL de la solución "A" con 5 mL de la solución "B". Ajustar a pH = 13 con NaOH y aforar a 1000 mL con agua desionizada.

Preparar al momento de la electroforesis.

Solución de neutralización

Tris 0.4 M

Pesar 48.5 g de Tris y diluir en agua desionizada.

Llevar a un pH = 7.5 con HCl concentrado, aforar a 1000 mL con agua desionizada y guardar en refrigeración.

Solución colorante fluorescente

Solución stock de bromuro de etidio 20 µg/ mL (10X).

10 mg en 50 mL de agua desionizada.

Guardar protegida de la luz y en refrigeración.

Para una solución 1X, mezclar 1 mL de la solución stock con 9 mL de agua desionizada.

Cámara húmeda

A un recipiente plano con tapa (vidrio o plástico), cubrirle el fondo con algún material absorbente (papel, tela o algodón). Ésta se humedece con agua desionizada y encima podrán colocarse las laminillas, cerrar herméticamente.

REFERENCIAS

1. Ángeles, E., Santillán A., Martínez, I., Ramírez, A., Solomon, M., Martínez, R., y Moreno, E. (1994). A simple method for the synthesis of carbamates. *Synt. Comm.* 24, 2441-2447.
2. Bello, J., y López de Cerain, A. (2001). Fundamentos de ciencia toxicológica. Ediciones Díaz de Santos. España. p. 128-143.
3. Bennington, John. (2000). Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico. Médica Panamericana. España. p. 1406-1407.
4. Bernal, Sandra. (2000). Evaluación de algunos productos derivados del ácido carbámico como agentes antimicrobianos. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
5. Collins, A., Dobson, V., Dusinská, M., Kennedy, G., y Stetina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.* 375, 183-193.
6. Enciso, Susana. (2000). Estudio del efecto genotóxico del metotrexato con el ensayo cometa en linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
7. Everett, S.M., White, K.L.M., Schorah, C.J., Calvert, R.J., Skinner, C., Miller, D., y Axon, A.T.R. (2000). In vivo DNA damage in gastric epithelial cells. *Mutat. Res.* 468, 73-85.
8. Fairbairn, D., Olive, P., y O'Neill, K. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-59.
9. Finn, Geneser. (2002). Histología sobre bases biomoleculares. 3ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. p. 490-493.
10. Ford, M., Delaney, K., Ling, L., y Erickson, T. (2001). Clinical toxicology. Saunders Company. USA. p. 819-827.
11. Foye, William. (1984). Principios de química farmacéutica. Vol 1 y 2. 2ed. Reverté. Barcelona, España. p. 262, 267, 876, 878.
12. Freshney, Ian. (1991). Culture of animal cells. A manual of basic technique. 2ed. Wiley-Liss. USA. p. 228, 229.
13. Ganong, William. (2002). Fisiología médica. 18ed. El Manual Moderno. México. p. 535.
14. Gartner, L., y Hiatt, J. (1997). Histología texto y atlas. McGraw-Hill Interamericana. México. p. 334.
15. Gennaro, Alfonso. (1985). Remington's pharmaceutical sciences. 17ed. Marck Publishing Company. USA. p. 927.

16. González, M., Soloneski, S., Reigosa, M., y Larramendy, M. (2003). Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its comercial formulation, azurro. IV. DNA damage and repair kinetics assessed by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay on Chinese hamster ovary (CHO) cells. Mutat. Res. 534, 145-154.
17. Hassall, Kenneth. (1990). The biochemistry and uses of pesticides. Structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. 2ed. VCH Publishers Inc. USA. p. 62, 92-94, 96, 115, 125-128, 131-133, 245, 374, 424, 435, 439, 458-463.
18. Henderson, Daryl. (1999). Methods in molecular biology. DNA repair protocol eukaryotic systems. Humana Press Inc. USA. p. 203-212.
19. Hernández, Mayra. (2003). Estudio genotóxico de fenilcarbamatos en cultivo de linfocitos humanos por medio de frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
20. Holmstrom, M. (1990). Induction of micronuclei in bone marrow of mice exposed to 1, 2 or 3 daily doses of urethane. Mutat. Res. 234, 147-154.
21. Jiménez, E., Flores, A., Ángeles, E., Martínez, P., López, C., Castañeda, H., y Pérez, U. (2003). In vitro anti-giardial activity of IRE-6^a and IRE-7B, two ethyl-phenylcarbamate derivates. La Revista de Investigación Clínica, 02-076.
22. Junqueira, L., y Carneiro, J. (2002). Histología básica. 5ed. Masson. Barcelona, España. p. 281-294.
23. Khattab, M., Gad, M.Z., y Abdallah, D. (2001). Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. Pharmacological Res. 43, 463-467.
24. Klaassen, Curtis. (1996). Toxicology. The basic science of poisons. 5ed. McGraw-Hill. USA. p. 49,118, 378, 379, 655-666.
25. Kleinsasser, N.H., Wallner, B.C., Kastenbauer, E.R., Muenzenrieder, R.K., y Harréus, U.A. (2000). Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. Mutat. Res. 467, 21-30.
26. Konturek, P.C., Brzozowski, T., Kwiecién, S., Drozdowicz, D., Harsch, I.A., Meixner, H., Stachura, J., Hahn, E.G., y Konturek, S.J. (2002). Effect of *Helicobacter pylori* on delay in ulcer healing induced by aspirin in rats. Eur. J. Pharmacol. 451, 191-202.
27. Kumar, V., Cotran, R., y Collins, T. (2000). Patología estructural y funcional. 6ed. McGraw-Hill Interamericana. México. p. 91.
28. Márquez, Pilar. (2002). Actividad antigenotóxica de 4 derivados carbámicos en ratón y análisis de la relación de dicho efecto con su estructura química. Tesis de Maestría. ENCB, IPN. México.

29. McCarthy, P., Sweetman, S., McKenna, P., y McKelvey-Martin, V. (1997). Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 12:4 209-214.
30. Minero, Claudia. (1997). Comparación de la eficacia anticestódica de 2 principios de nueva síntesis contra el Praziquantel usando *H. Nana* como modelo en ratones. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
31. Moffat, A. (1986). Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and postmortem material. 2ed. The Pharmaceutical Press. London, England. p. 752, 753.
32. Morales, R.P., Mendiola, M.T., Vallarino, K.T., y Rodríguez, R.R. (1994). Comparison of sister chromatid exchange induction in murine germinal and somatic cells by gamma radiation exposure *in vivo*. *Environ. Mol. Mutagen*. 24, 89-95.
33. Moreno, Enrique. (1997). Diseño molecular y síntesis orgánica de fenilcarbamatos de etilo con actividad antihelmíntica. Relación estructura química-actividad biológica. Tesis de Maestría. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
34. Najera, Rocío. (1995). Efectos carcinógenos de los insecticidas de uso permitido en México. Revisión bibliográfica. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
35. Ohsawa, K., Nakagawa, S., Kimura, M., Shimada, C., Tsuda, S., Kabasawa, K., Kawaguchi, S., y Sasaki Y. (2003). Detection of *in vivo* genotoxicity of endogenously formed N-nitroso compounds and suppression by ascorbic acid, teas and fruit juices. *Mutat. Res*. 539, 65-76.
36. PLM. (2002). Diccionario de especialidades farmacéuticas. 48ed. Thomson PLM. México. p. 2026, 2027.
37. Pool-Zobel, B., Lotzmann, N., Knoll, M., Kuchenmeister, F., Lambertz, R., Leucht, U., Schröder, H., y Schmezer, P. (1994). Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ. Mol. Mutagen*. 24, 23-45.
38. Rivero, O., y Tanimoto, M. (1999). Uso de los medicamentos en la clínica. McGraw-Hill Interamericana. México. p. 452, 453.
39. Rojas, E., López, M., y Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chrom. B*. 722, 225-254.
40. Roser, S., Pool-Zobel, B., y Rechkemmer, G. (2001). Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutat. Res*. 497, 169-175.
41. Rosoff, Irving. (2002). Enciclopedia of clinical toxicology. A comprehensive guide and reference. The Parthenon Publishing Group. USA. p. 667.
42. Ross, M., Romrell, L., y Kaye, G. (1997). Histología texto y atlas color. 3ed. Médica Panamericana. México. p. 442-450.

-
43. Salamanca, Fabio. (1990). Citogenética humana. Fundamentos y aplicaciones clínicas. Ed. Médica Panamericana. México.
 44. Santillán, Odilón. (1993). Síntesis de carbamatos a partir de aminas aromáticas. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, México.
 45. Sasaki, Y., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., y Tsuda, S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.* 519, 103-119.
 46. Sekihashi, K., Sasaki, T., Yamamoto, A., Kawamura, K., Ikka, T., Tsuda, S., y Sasaki, Y. (2001). A comparison of intraperitoneal and oral gavage administration in comet assay in mouse eight organs. *Mutat. Res.* 493, 39-54.
 47. Singh, P.N., McCoy, T.M., Tice, R.R., y Schneider, L.E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
 48. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., y Sasaki Y. F. (2000). Single cell gel/ comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.
 49. Velázquez, Norma. (2000). Efecto genotóxico del acetaldehído y de la inhibición de la aldehído deshidrogenasa con Disulfiram en espermatogonias de ratón *in vivo*. Tesis de Maestría. ENCB, IPN. México.