

2
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO GENOTOXICO IN VIVO DE UN
COMPUÉSTO 1.4-DIHIDROPIRIDINICO
(FESCDIPINA) MEDIANTE LA EVALUACION DE LA
FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE
CROMATIDAS HERMANAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ROSA ISELA ALVAREZ GONZALEZ

DIRECTORA: M. EN C. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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).

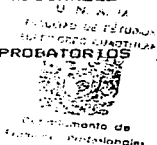
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
 INSTITUTO NACIONAL
 DE ESTUDIOS SUPERIORES
 CUAUTITLAN
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
 P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de tesis "Estudio genotóxico in vivo de un compuesto 1, 4-dihidropiridinico (FESCODIPINA) mediante la evaluación de la frecuencia de intercambio de
grasas comunes".

que presenta la pasante: Isabel Alvarez González
 con número de cuenta: 00000000 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Biológica.

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"
 Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 3 de Julio de 1997.

PRESIDENTE M. en C. Luisa Martínez Aguilar
 VOCAL Q.F.B. M. Esther Revuelta Miranda
 SECRETARIO M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo
 1er. SUPLENTE Dr. Francisco López Mejía
 2do. SUPLENTE Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez

Lys. A.
 [Firma]
 [Firma]
 [Firma]

Dedicatória

Isela

Contenido

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 2 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 1.1 ANTECEDENTES DE LA FESCDIPINA | 4 |
| 1.1.1 <i>Estudios de Toxicidad.</i> | 5 |
| 1.2 GENERALIDADES DE LAS 1,4-DHP | 7 |
| 1.2.1 <i>Relación Estructura-Actividad.</i> | 9 |
| 1.2.2 <i>Esteroselectividad, sitios de unión de las DHP.</i> | 11 |
| 1.3 CANALES DE CALCIO | 12 |
| 1.4 LA FARMACOCINÉTICA Y EL METABOLISMO DE LA NIFEDIPINA | 14 |
| 1.4.1 <i>Efectos metabólicos.</i> | 17 |
| 1.5 GENOTOXICOLOGÍA..... | 18 |
| 1.5.1 <i>Interacción del ADN con diferentes tipos de mutágenos.</i> | 20 |
| 1.5.2 <i>Intercambios de Cromátidas Hermanas.</i> | 22 |
| 1.5.3 <i>Importancia del estudio de los intercambios de cromátidas hermanas.</i> | 25 |
| 1.5.4 <i>Sistemas de estudio para ICH.</i> | 27 |
| II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 30 |
| 2.1 HIPÓTESIS..... | 30 |
| 2.2 OBJETIVOS..... | 30 |
| 2.2.1 <i>Objetivo general.</i> | 30 |
| 2.2.2 <i>Objetivos particulares.</i> | 30 |
| III. MÉTODO..... | 31 |
| 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO | 31 |
| 3.1 MATERIAL Y EQUIPO | 31 |
| 3.3 REACTIVOS | 32 |
| 3.4 PROCEDIMIENTO | 32 |
| IV. RESULTADOS..... | 34 |
| V. DISCUSIÓN | 38 |
| VII. CONCLUSIONES..... | 42 |
| VII. REFERENCIAS..... | 43 |

Resumen

La genotoxicología se encarga de estudiar el daño producido al material genético (ADN) causado por diversas sustancias a las que estamos expuestos constantemente. El daño puede presentarse a nivel cromosómico por ejemplo en forma de intercambios de cromátidas hermanas (ICH).

La FESCDIPINA pertenece a la familia de las 1,4-dihidropiridinas, se obtiene mediante la síntesis de Häntzsch y ha mostrado actividad farmacológica hipotensora, antiarrítmica, vasodilatadora y además un efecto cardioprotector. Actualmente se encuentra en proceso de ser patentada.

El presente trabajo reporta los posibles efectos genotóxicos encontrados en un estudio agudo *in vivo*. Se experimentó con 6 lotes, cada uno con 5 ratones, a los que se les implantó subcutáneamente una tableta de 5-Bromodesoxiuridina cubierta parcialmente con parafina. Las dosis administradas intraperitonealmente fueron: 10, 30, 60 y 90 mg/Kg de FESCDIPINA, 30 mg/Kg de nifedipina y una mezcla de dimetilsulfóxido:agua (1:1) como control. A las 24 h se procedió a cosechar y teñir diferencialmente las células de la médula ósea.

Los resultados obtenidos muestran que los lotes tratados con FESCDIPINA presentan en relación a la dosis, una tendencia al incremento de ICH que comparte con la nifedipina. La cinética de proliferación celular se vió modificada por la nifedipina y por la FESCDIPINA en la dosis de 60 mg/Kg.

I. Introducción

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

Cuando se sintetiza una nueva molécula o se aísla un nuevo principio activo de un producto natural, se requiere probar los efectos de esta sustancia en un ser vivo; esto se lleva a cabo en animales antes de hacerlo en humanos para prevenir en lo posible la aparición de reacciones adversas en éstos últimos. Todos los estudios que se efectúan en animales o en preparaciones *in vitro* antes de que el fármaco se aplique a un ser humano y reciben el nombre de farmacología preclínica o experimental, a diferencia de los que se efectúan en seres humanos, que se llaman de farmacología clínica. Todos estos estudios forman parte de lo que se llama desarrollo de un nuevo medicamento. (Bondani, 1991)

La presente investigación consistió en realizar el estudio genotóxico *in vivo* de la FESCDIPINA, mediante la evaluación de la frecuencia de cromátides hermanas. La FESCDIPINA es una molécula recientemente sintetizada en la Sección de Química Orgánica de la FES Cuautitlán, la cual ha presentado las siguientes actividades farmacológicas: hipotensora, antiarrítmica, vasodilatadora y un efecto cardioprotector.

La prueba de ICH evalúa el potencial genotóxico de ciertas sustancias que pueden producir daño al material genético (ADN).

1.1 Antecedentes de la FESCDIPINA

En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se desarrolló una línea de investigación orientada a la síntesis y valoración biológica de nuevos compuestos. Se obtuvieron 16 compuestos 1,4-dihidropiridínicos mediante la síntesis de Hantzsch, los cuales fueron caracterizados por métodos espectroscópicos tradicionales como: resonancia magnética nuclear protónica y carbono 13, infrarrojo, ultravioleta y espectrometría de masas. La modificación de dichos compuestos fue realizada en la posición 4 de la estructura base (Fig. 1). El estudio conformacional se realizó usando la Supercomputadora CRAY YMP 4/4 32, de la UNAM y se usaron los programas especializados en diseño molecular como UNICHEM, ALCHEMY y CHEM-X. (Martínez, 1996).

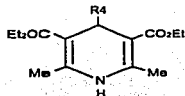


Figura 1. Estructura general de los compuestos 1,4-DHP sintetizados en la FESC

De los compuestos 1,4-dihidropiridínicos sintetizados, se seleccionó a la FESCDIPINA, la cual presentó actividad farmacológica y es el compuesto con el que se realizó el presente trabajo. A continuación se mencionan los estudios que se le han realizado.

Se determinó el efecto de la FESCDIPINA sobre el daño por isquemia en el modelo experimental de isquemia y reperfusión miocárdica, se observó que los lotes tratados con FESCDIPINA casi no desarrollaron arritmias cardíacas y mantuvieron un ritmo sinusal después de la reperfusión con una reducción de la frecuencia cardíaca, por lo que sugieren que la FESCDIPINA protege de las arritmias por reperfusión por un efecto sobre la frecuencia cardíaca. (Martínez, 1996; Rebollo, 1996)

También Escobar y col (1996) determinaron el efecto protector de la FESCDIPINA en el modelo de infarto miocárdico inducido mediante la oclusión coronaria en rata consciente. Utilizaron ratas Wistar macho con peso de 250 a 300 g. Para inducir el infarto, las ratas fueron anestesiadas con éter, se les realizó una toracotomía entre el 4º y 5º espacio intercostal, se les extrajo el corazón y se localizó la arteria coronaria izquierda, la cual fue ocluida con hilo seda 5/0 con ayuda de una aguja atraumática, el corazón se regresó a la cavidad torácica y ésta fue cerrada. Se permitió la recuperación de los animales y se les dejó por un período de 2 h. Tanto el vehículo (propilenglicol/acetona) como la FESCDIPINA fueron administrados por vía IM 30 minutos antes de la oclusión coronaria. Para determinar el efecto protector de este compuesto ante el infarto miocárdico, las ratas del grupo control y tratadas fueron sacrificadas, se les extrajo el corazón, posteriormente se utilizaron técnicas convencionales de microscopía electrónica para determinar los cambios morfológicos. El análisis de los resultados se realizó en base al efecto que presentaron sobre la mitocondria, considerando como parámetros el número de mitocondrias normales, hinchadas o lisadas. La FESCDIPINA ayuda a la salida de calcio de la mitocondria, por lo tanto se infiere que este compuesto presente efecto cardioprotector.

1.1.1 Estudios de Toxicidad.

A esta nueva molécula se le ha practicado una evaluación hepatotóxica. Para lo cual utilizaron una dosis oral única de 310 mg/Kg para el estudio agudo; y en el estudio subcrónico (30 días) una dosis oral diaria de 3.1 mg/kg. Se tomaron como indicadores de daño hepático el incremento de la actividad sérica de: transaminasa glutámico pirúvica, γ -glutamil transpeptidasa y fosfatasa alcalina, el aumento de la bilirrubina total, así como el aumento del grado de lipoperoxidación hepática medido por el malondialdehído y la disminución del contenido de

glucógeno hepático. Los resultados mostraron que la FESCDIPINA no produjo daño hepático agudo ni subcrónico a las dosis estudiadas. (Almanza, 1995; Martínez,1996)

Por otra parte también se le ha realizado la evaluación del efecto inmunotóxico de la FESCDIPINA. Las pruebas que se practicaron fueron las siguientes: 1) hematológicas: cuenta blanca, roja y diferencial. 2) inmunológicas: cuantificación de anticuerpos totales y específicos, activación de la fagocitosis, cuantificación de células hemolíticas formadoras de placas e histológicas. Los resultados hasta ahora obtenidos indican que no hay cambios o alteraciones en los parámetros evaluados por lo que se sugiere que la FESCDIPINA no produce efectos tóxicos al sistema inmune.(Martínez, A., 1995; Martínez,1996)

Contreras y col. (1996) realizaron el análisis histológico de la toxicidad de la FESCDIPINA en un estudio crónico. Utilizaron ratas macho Wistar de 200 a 250 g de peso, las cuales fueron sometidas a un tratamiento crónico, el cual consistió en la administración por vía oral de FESCDIPINA en una dosis de 3.1 mg/Kg de peso, diariamente durante 6 meses. Posteriormente, estos animales fueron sacrificados y se les tomó muestras de riñón, corazón, intestino delgado, intestino grueso. Estas muestras se procesaron para el análisis óptico mediante la técnica de tinción de Hematoxilina-Eosina. Los resultados mostraron que los órganos analizados presentan una estructura similar a los tejidos observados de los animales de los grupos control y tratados.

1.2 Generalidades de las 1,4-DHP

La piridina es un compuesto heterocíclico de 6 miembros, siendo el heteroátomo el nitrógeno, por su semejanza estructural química con el benceno, posee propiedades importantes. (Paquette, 1992)

La piridina fue descubierta por Anderson en 1849 quien la aisló del producto de destilación del aceite de los huesos; donde también logró obtener la picolina pura (metil piridina) y la lutidina (dimetil piridina). En la naturaleza se le encuentra en forma abundante formando parte de entidades bioquímicas importantes como son: la piridoxina, piridoxal, nicotina, nicotinamida, etc. (Paquette, 1992)

Las 1,4-DHP se conocen como una clase de sustancias desde 1882, cuando Häntzsch las descubrió como intermediarios estables en su síntesis de piridinas, la cual consiste de manera general en dos pasos: (Paquette, 1992; Adelstein, 1986)

- a) La condensación de un aldehído con un β -cetoéster y alguna fuente de amoníaco dando como resultado una 1,4-dihidropiridina.
- b) La oxidación posterior de la 1,4-dihidropiridina para obtener la correspondiente piridina sustituida. (Fig. 2)

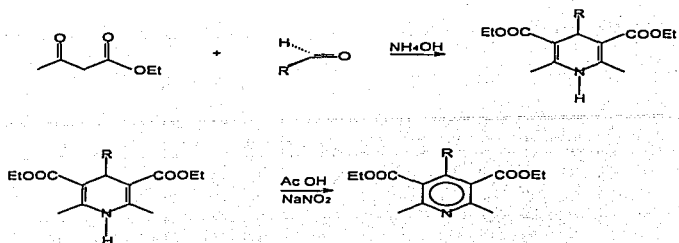





Figura 2 Síntesis de Häntzsch

La molécula prototipo de la familia de las 1,4-DHP es la nifedipina (Cuadro 1) y los resultados clínicos obtenidos con su uso han iniciado investigaciones alrededor del mundo acerca de las 1,4-DHP como antagonistas del calcio, esto es evidente por el número de productos que están en desarrollo, entre ellos la FESCDIPINA.

| Nombre | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
|-------------|---|-----------------|---|---|---|
| Nifedipina | H | CH ₃ | CH ₃ | 2-NO ₂ -C ₆ H ₄ | CH ₃ |
| Nicardipina | H | CH ₃ | CH ₂ CH ₂ CH ₂ N | 3-NO ₂ -C ₆ H ₄ | CH ₃ |
| Nifendipina | H | CH ₃ | C ₂ H ₅ | 3-NO ₂ -C ₆ H ₄ | CH ₃ |
| Nimodipina | H | CH ₃ | CH ₂ CH ₂ OCH ₃ | 3-NO ₂ -C ₆ H ₄ | CH(CH ₃) ₂ |
| Nisoldipina | H | CH ₃ | CH ₃ | 2-NO ₂ -C ₆ H ₄ | CH ₂ CH(CH ₃) ₂ |
| Felodipina | H | CH ₃ | C ₂ H ₅ | 2,3-DI-C ₆ H ₄ | CH ₃ |
| Nilvadipina | H | CN | CH ₃ | 3-NO ₂ -C ₆ H ₄ | CH(CH ₃) ₂ |
| Darodipina | H | CH ₃ | C ₂ H ₅ |  | C ₂ H ₅ |
| PN-200110 | H | CH ₃ | CH ₃ |  | CH(CH ₃) ₂ |
| Flordipina |  | CH ₃ | C ₂ H ₅ | 2-C ₆ H ₄ -C ₆ H ₅ | C ₂ H ₅ |

Cuadro 1. Grupo de la nifedipina y sustancias relacionadas

La diferenciación farmacológica de nuevos productos en desarrollo teniendo como sustancia patrón a la nifedipina, procede en tres direcciones: mejorar la eficacia, la selectividad vascular y aumentar la duración de la acción. (Opie,1984)

La nitrendipina, la cual ha sido desarrollada como un antihipertensivo presenta una actividad antihipertensiva más sostenida y como la nifedipina incrementa la excreción de sodio de los depósitos de sal en ratas normotensivas y espontáneamente normotensivas (Meyer, 1984; Opie, 1984).

Una ventaja importante de la darodipina sobre la nifedipina es que tiene efecto antihipertensivo sin acelerar el ritmo cardíaco. Sin embargo experimentos en perros concientes no han sido reportados. La felodipina es más o menos comparable en su espectro de acción y eficacia con la nifedipina. La selectividad vascular ha sido reportada para la nisoldipina, PN200-110 y flordipina. Nivaldipina es un potente antagonista del calcio que ha probado efectividad en dosis bajas en un modelo de oclusión coronaria crónica en perro.(Aldestein, 1985)

Nicardipina y nimodipina incrementan el flujo sanguíneo cerebral en dosis que virtualmente no tienen efecto en el flujo periférico y la presión sanguínea. Nimodipina también ha mostrado poseer la vasoselectividad correspondiente *in vitro*. (Aldestein, 1986)

1.2.1 Relación Estructura-Actividad

Las propiedades farmacológicas de una sustancia están íntimamente relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas, y éstas a su vez son consecuencia de la estructura química. Para buscar las sustancias más idóneas dentro de una familia de individuos químicos con propiedades farmacológicas determinadas se realizan en la molécula ciertos cambios por introducción de grupos equivalentes de manera que las propiedades fisicoquímicas no varíen

esencialmente. Con ello se intenta que la acción biológica no varíe cualitativamente y sí cuantitativamente en el sentido que nos interesa. (Valdecasas,1977)

Erlenmeyer definió a los isósteros como átomos, iones o moléculas en los cuales los niveles periféricos de electrones se pueden considerar idénticos. Debe haber pues una analogía de campo eléctrico y una configuración estérica similar. En muchos casos el peso molecular de los isósteros es muy parecido.(Valdecasas,1977)

La 1,4-DHP obtenida por la síntesis de Hantzsch (Fig. 3) ofrece varias posibilidades para modificar su estructura. (Paquette,1992)

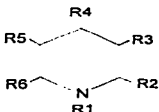


Figura3. Estructura general de las 1,4-DHP

Un buen efecto vasodilatador se puede obtener bajo las siguientes condiciones: la posición 1 (R1) debe no estar sustituida o bien, portar un sustituyente que sea rápidamente removido por procesos metabólicos. Los sustituyentes óptimos en las posiciones 2 y 6 (R2, R6) son grupos alquilo pequeños, especialmente metilo. Se puede reemplazar un grupo alquilo por un amino o un grupo ciano es tolerado sin la atenuación de la actividad, mientras que el desplazamiento por un H o un arilo causa un claro descenso en la actividad. Los alcoxicarbonilos son los sustituyentes óptimos en las posiciones 3 y 5 (R3 y R5). Uno de estos grupos ésteres carboxílicos los cuales caracterizan a todas las DHP en desarrollo, pueden ser reemplazados por sustituyentes aceptores como son acil, alquilsulfonil o ciano, con solo una ligera pérdida de la actividad. En lo que se refiere al componente hidroxilo de los ésteres, este puede ser el mismo o diferente, puede ser alifático o aromático y puede variar ampliamente en el largo de la

éster tienen una influencia particular sobre la selectividad vascular y la duración de la acción, mientras que la intensidad del efecto está determinado principalmente por el sustituyente en la posición 4 (R4) en donde la sustitución por un aromático o heteroaromático es esencial para una buena actividad. (Meyer,1984)

En el caso de un sustituyente 4-fenil dado, las siguientes reglas pueden ser aplicadas para monosustitución en núcleos benzoides: compuestos ortosustituídos son más activos que los correspondientes metasustituídos. La meta-sustitución por un grupo nitro o ciano es la única manera de asegurar un efecto comparable al producido por la orto-sustitución. Los compuestos parasustituídos son más o menos inactivos. (Meyer,1984)

1.2.2 Estereoselectividad, sitios de unión de las DHP

Las 1,4-dihidropiridina-3,5-ésteres dicarboxílicos con diferentes grupos ésteres representan un subestructura particularmente interesante, en la mayoría de los casos ellas son más activas que los correspondientes compuestos sustituidos simétricamente. Por esta razón muchos de los productos que se encuentran en desarrollo son caracterizados por grupos éster no idénticos. Como resultado de la sustitución no simétrica, estos compuestos también son quirales. (Aldestein, 1986)

La estereoselectividad del efecto es indicativa de interacciones con el receptor. En realidad, un sitio de unión el cual es el mejor ligando específico ha sido identificado en varios tejidos con la ayuda de 3H-nitrendipina (Brehm, 1978. Noble, 1984) 3H-nimodipina (Noble, 1981). Este sitio de unión es estereoselectivo, por lo que ha sido claramente distinguible entre los enantiómeros de las DHP quirales y confirma los descubrimientos obtenidos en modelos de prueba *in vitro*. Los antagonistas del calcio como son diltiazem o verapemil, que son estructuralmente diferentes a las DHP, ambos no se unen o se unen débilmente por varios órdenes de

diferentes a las DHP, ambos no se unen o se unen débilmente por varios órdenes de magnitud. (Pelzer, 1992)

La estereoselectividad de un sitio de unión es uno de los criterios necesarios para poder hablar de un receptor para todas. Los potentes calcio agonistas descubiertos entre las 1,4-DHP forma parte de este concepto. Solo pequeños cambios en la estructura básica clásica de los calcio antagonistas puede llevar a un perfil reverso de la acción. Entre otros, 3-nitro-1,4-dihidropiridina-3-éster carboxílicos y 5-oxo-1,4,5,7-tetra hidrofuro/3,4.b/piridina-3-éster carboxílico han sido identificadas como estructuras básicas interesantes con actividad calcio agonista. (Triggle, 1991)

1.3 Canales de calcio

Los canales de calcio son proteínas de membrana intrínsecas que participan en la regulación del flujo transmembranal de iones y otras funciones celulares en el corazón y otras células excitables. Los canales se abren en respuesta a cambios en el potencial de membrana y permiten que los iones de calcio entren a la célula bajo un gradiente de concentración. Este movimiento interior de cargas positivas despolariza la membrana celular del corazón y contribuye a la actividad del marcapasos, la conducción del impulso y la fase de meseta del potencial de acción. En suma, el influjo de calcio causa una salida transitoria en la concentración de calcio intracelular, la cual en verdad puede evocar una variedad de respuestas celulares. La transducción voltaje-respuesta por los canales de calcio en células del corazón incluye la iniciación y la graduación de la actividad contráctil y la regulación de mensajeros intracelulares. (Pelzer, 1992)

Cabe mencionar que los sitios intracelulares donde la sobrecarga de calcio induce alteraciones funcionales y estructurales están en la mitocondria, el sarcolema membranar, el retículo sarcoplásmico y las miofibrillas. (Rebollo, 1996)

Con el incremento de calcio, la mitocondria está severamente dañada. La sobrecarga de calcio asistólica induce la apertura de un poro no específico, permeable para masa molecular pequeña de soluto, subsecuentemente, la mitocondria se hincha y es incapaz de sintetizar ATP y fomentar acumulación de calcio.

De este modo la homeostasis de calcio no controlado causa irreversible daño celular, seguido de un catabolismo abrumador de nucleótidos, proteínas y fosfolípidos con cierto daño mitocondrial. (Rebollo, 1996)

La coexistencia de canales de calcio tipo L y tipo T en el corazón ha sido demostrada claramente en miocitos del nodo senoarterial de conejo, ventrículo de perro, arteria de perro, etc. (Hagiwara, 1988)

Aunque las propiedades de los canales de calcio tipo T se asemejan a las de los canales de calcio tipo L en algunos aspectos, ellos difieren en muchos otros. Lo parecido incluye lo siguiente: a) la cinética abrir-cerrar está caracterizada por breves aberturas que ocurren en explosiones, con transiciones ocasionales dentro de las formas de entrada con aberturas más grandes, B) la selectividad por el calcio parece que involucra los sitios de unión de alta afinidad con la trayectoria de permeación de iones, y c) son permeables a cationes monovalentes en la ausencia de cationes divalentes. Los canales tipo T difieren de los tipo L en que tienen a) umbral bajo (más negativo); b) inactivación relativamente rápida dependiente del voltaje con componentes calcio-no dependientes; c) conductancia máxima a calcio y bario que son similares uno u otro pero distintos a los canales de conductancia de bario de tipo L; d) Una insensibilidad a los antagonistas de calcio y a los agonistas de las DHP, fenilalquilamina, y a

las clases de benzotiazinona; e) Una alta sensibilidad para bloquear por bajas concentraciones de iones de níquel y amilorida; f) una alta resistencia a la estimulación β -adrenérgica y al desgaste durante la perfusión intracelular o investigación de parche aislado. (Pelzer,1992)

Los canales de calcio tipo L presentan cinéticas y propiedades de permeación que facilitan la conversión de despolarización de membrana hacia un calcio intracelular notable, el cual puede provocar respuestas celulares como son excitación-contracción acoplada. Aunque el papel parecido de los canales de calcio tipo L en la función cardíaca no se ha establecido todavía, su distribución y activación en potenciales de membrana negativos sugieren un posible papel en la actividad del marcapasos. (Tanabe,1991)

Un nuevo tercer tipo de canales de calcio fue identificado en membranas de sarcolema cardíaco bovino fusionado a la bicapa lipídica y se denominó tipo B porque esto puede contribuir a corrientes de fondo estables en potenciales de membrana negativos. (Glossman,1990)

Desarrollos en los campos de farmacología molecular, bioquímica y biología han proporcionado herramientas poderosas para la caracterización de la estructura de los canales de calcio tipo L. Un requisito experimental ha sido el aislamiento y purificación parcial de el canal monitoreando la actividad de la unión de calcio antagonistas trititados con los receptores del canal. La actividad de la unión fue determinada por marcaje reversible después de la solubilización con detergentes o bien siguiendo el complejo ligando-receptor formado después de la solubilización; la purificación fue intentada por cromatografía de afinidad con lectina y por centrifugación (Glossman,1990)

1.4 La farmacocinética y el metabolismo de la nifedipina

Hasta el momento no contamos con los estudios farmacocinéticos de la FESCDIPINA, pero al ser un análogo de la nifedipina hemos considerado la farmacocinética de esta última, ya que la molécula como tal o bien algún metabolito, pueden causar efectos tóxicos.

La nifedipina como sustancia activa se absorbe en forma rápida y casi completa. La biodisponibilidad sistémica de la administración oral de nifedipina es de 45-68%, debido a un efecto de primer paso. Las concentraciones plasmáticas y séricas máximas se alcanzan después de 30-60 minutos de la administración y corresponden a 65-100 μ L. La nifedipina se une a proteínas plasmáticas (albúmina) en un 95%. La sustancia activa se metaboliza casi completamente en el hígado y los metabolitos no muestran actividad farmacodinámica. La nifedipina se excreta como metabolitos por vía renal principalmente; sólo 5-15% es eliminado por la bilis en las heces. La vida media de eliminación es de 1.7-3.4 horas. (Opie,1989)

Se muestra como ejemplo de biotransformación la de nifedipina (Fig. 4), que es representativa de las DHP antagonistas del calcio. Existe un incremento de compuestos cada vez más hidrofílicos, iniciando con las estructuras básicas comparativamente lipofílicas. En el caso de productos con diferentes grupos éster, se espera lógicamente un número sustancial de metabolitos, puesto que los grupos ésteres son hidrolizados en una etapa anterior. El metabolismo de la nifedipina representa un ejemplo típico. (Meyer,1984)

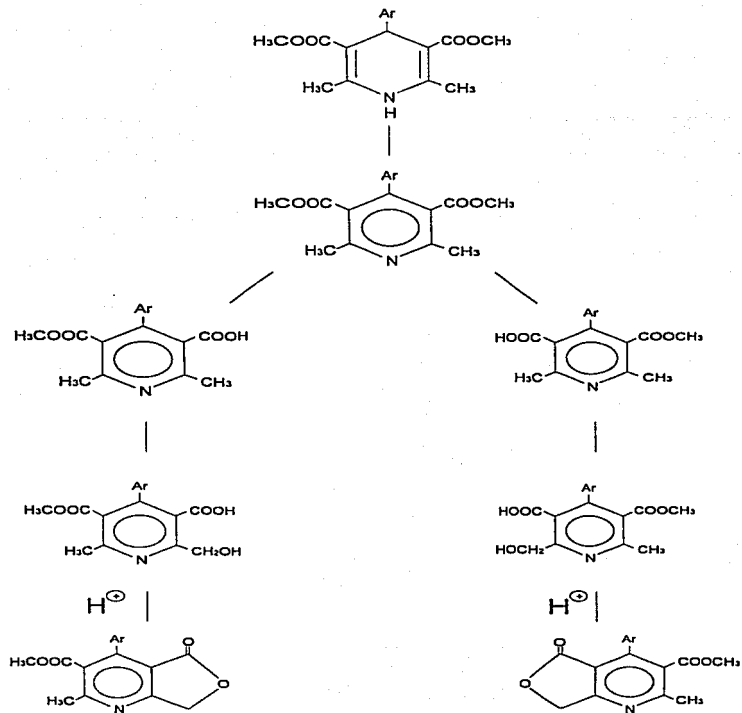


Fig. 4. Metabolismo de la nifedipina.

La oxidación de un derivado de piridina virtualmente sin actividad vasodilatadora es considerada como el primer paso, seguido por una saponificación alternativa de uno de los dos grupos ésteres que da un ácido monocarboxílico de piridina. La fuerte hidrofiliidad metabólica da productos terminales como el ácido carboxílico de hidroximetilpiridina resultando de la hidroxilación oxidativa del metilo adyacente al grupo carboxílico, estos productos terminales han sido caracterizados después de la acidificación como las correspondientes gamalactonas. (Meyer,1984)

1.4.1 Efectos metabólicos.

Como grupo, los antagonistas del calcio presentan pocos efectos metabólicos deletéreos. No presentan afinidad por los β -bloqueadores y diuréticos, no afectan la secreción de insulina, ni los niveles sanguíneos de glucosa o de lipoproteínas. Tampoco afectan el equilibrio del potasio o magnesio.(Cummings, 1991)

La nifedipina vía oral puede producir un incremento transitorio en los niveles plasmáticos de renina, aumenta la excreción urinaria de sodio y agua. (Cummings,1991)

1.5 Genotoxicología

La necesidad de conocer las características físicas y químicas de las sustancias químicas a las que el ser humano se expone constantemente como es a los medicamentos, nos orienta a considerar lo siguiente: 1. La demostración de que los agentes químicos pueden interactuar con el ADN en diferentes formas y en consecuencia ocasionar mutaciones génicas o cromosómicas. 2. La de que generalmente, una o más de las mutaciones se presentan durante el desarrollo del cáncer y 3. El conocimiento de que los compuestos químicos pueden ocasionar trastornos en la fertilidad y malformaciones congénitas en la descendencia (Butterwoth,1990).

La genotoxicología es una subespecialidad de la toxicología que identifica y analiza la acción de los agentes con toxicidad dirigida hacia los elementos hereditarios de los sistemas vivos. Algunas sustancias producen toxicidad generalizada, inespecífica y la muerte, en tanto que otras sólo dañan el material hereditario; y este es el objeto de la genética toxicológica o genotoxicología, también llamada por algunos toxicología molecular; que tiene por objetivo entender y detectar las propiedades del compuesto que son altamente específicos de los ácidos nucleicos y producen efectos deletéreos en los elementos genéticos a concentraciones subtóxicas. La exposición de los compuestos para estudios de la genética toxicológica va de aguda a crónica, este tipo de pruebas cae dentro de las tres subdivisiones de las pruebas toxicológicas. (Brusick,1980)

Los agentes que específicamente producen alteraciones genéticas a niveles subtóxicos de exposición son llamados genotóxicos. Las sustancias genotóxicas usualmente tienen propiedades químicas y/o físicas que facilitan su interacción con los ácidos nucleicos, es decir, con el material genético. (Kilbey,1978).

El material genético es la entidad que contiene la información a partir de la cual, todos y cada uno de los seres vivos del planeta desarrollan sus características de acuerdo a su especie (Ayala,1984)

El material genético está formado por nucleótidos, los cuales están conformados por bases nitrogenadas de tipo purínico y pirimídico unidas a una desoxirribosa que a su vez se encuentra asociada a un grupo fosfato. Los nucleótidos del ADN se unen por enlaces fosfodiéster por la reacción del grupo OH del carbono 3 de la desoxirribosa con el fosfato enlazado al carbono 5 del siguiente nucleótido, por lo que da un patrón de crecimiento en la dirección 5' a 3' ya que el extremo libre inicial es el fosfato del carbono 5' (Thomson,1991).

El ADN posee dos cadenas de polidesoxirribonucleótidos antiparalelas que tienen sentidos opuestos, es decir, una va de 5' a 3' mientras que la complementaria va de 3' a 5', esto se debe a la posición del enlace fosfodiéster en la segunda cadena aunque ella sigue aumentando en la posición 5' a 3' (Thomson,1991).

Estas dos cadenas se encuentran apareadas por complementariedad de bases de manera que una base púrica se enlaza con una pirimídica. Las cuatro bases presentes generalmente en el material genético son la adenina y guanina (púricas) y la citosina y timina (pirimídicas). La adenina se complementa siempre con timina por la formación de 2 puentes de hidrógeno, mientras que la guanina se asocia con citosina por la formación de 3 enlaces del mismo tipo. Ambas cadenas se enrollan alrededor de un eje hipotético dando una estructura helicoidal, algo similar a una escalera de caracol en donde los peldaños están formados por las uniones entre las 4 bases nitrogenadas, los fosfatos y la ribosa quedan hacia afuera. (Schmid,1987)

Una función de la genética toxicológica es la implantación de las pruebas y métodos de estimación de riesgos para definir el impacto de los agentes genotóxicos que son encontrados en el medio ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad del material genético

humano. Otra función es el descubrimiento de las relaciones entre la genotoxicidad y la iniciación de neoplasias (Sasaki, 1982).

Si bien las pruebas de elección para evaluar compuestos presumiblemente genotóxicos son muchas y muy variadas, existen dos etapas primordiales en cualquier ensayo de esta naturaleza que debe tomarse en cuenta:

1. La detección del poder genotóxico del compuesto y
2. La estimación del riesgo genotóxico.

La primera etapa puede ser evidente como daño primario al ADN, mutación de punto, o efectos cromosómicos. La selección de pruebas para esta etapa con estos puntos no puede ser cubierta únicamente por sistemas microbianos, debido a la incapacidad de detectar efectos cromosómicos de éstos. Por lo tanto deben realizarse a través de varios niveles filogenéticos. Los ensayos se realizan en especies inferiores y en pruebas *in vitro* con células de mamíferos.

La estimación del riesgo genotóxico es un análisis cuantitativo de la expresión de la actividad genotóxica inherente a un compuesto, bajo condiciones de pruebas definidas en un modelo apropiado, seguido de la extrapolación de resultados a condiciones de exposición humana. (Kilber, 1978)

1.5.1 Interacción del ADN con diferentes tipos de mutágenos

Todos los organismos sufren un cierto número de mutaciones, como resultado de las operaciones normales celulares o de interacciones al azar con el ambiente. Tales mutaciones se denominan espontáneas. La frecuencia de mutaciones puede aumentar por tratamientos con ciertos compuestos. A estos compuestos se les denomina mutágenos y los cambios que inducen se denominan mutaciones inducidas. (Lewis,)

Muchos agentes físicos y químicos naturales o de uso frecuente dañan la estructura del ADN causando una gran variedad de lesiones, las cuales son en su mayoría letales y en menor frecuencia mutagénicas. La luz ultravioleta, los agentes alquilantes y los agentes oxidantes son algunos ejemplos típicos de agentes que causan estos efectos.

La lesión primaria del ADN, cuando es premutagénica, se convierte en mutación por medio de mecanismos celulares. Estas lesiones conforme al tipo de comportamiento que siguen pueden transformarse en mutaciones y se pueden agrupar en:

- Lesiones que modifican las propiedades de apareamiento de las bases del ADN.

Estas se distinguen porque modifican las propiedades de apareamiento de la base afectada. Una lesión con este comportamiento es la metilación de la guanina en el oxígeno de la posición 6 (O⁶MeG), ésta se produce por los agentes alquilantes. La O⁶MeG se aparea también con timina y cuando esto sucede se producen mutaciones del tipo G:C → A:T.

- Lesiones que destruyen las propiedades de apareamiento de las bases del ADN.

Otros agentes físicos o químicos transforman las bases del ADN a derivados que pierden sus propiedades de apareamiento, en muchos casos estas bases modificadas se eliminan por enzimas específicas denominadas glicosilasas produciendo sitios abálicos. Cuando la polimerasa replica al ADN molde sin la señal que indica la base a incorporar se incorpora preferencialmente a adenina, causando transiciones o transversiones de bases, dependiendo del tipo de base eliminada. Entre los agentes que producen este tipo de lesiones se incluye la luz ultravioleta y a al benzo(a)pireno.

- Mutaciones provocadas por incorporación de análogos de bases.

El 5-bromouracilo (5-BU) y la 2-aminopurina (2-AP) son sustancias sintéticas que se pueden incorporar durante la síntesis del ADN y que tienen propiedades de apareamiento dual. Es

decir, que el 5-BU que es un análogo de la adenina se puede aparear tanto con adenina como con guanina, y la 2-AP que es un análogo de la adenina se puede aparear tanto con timina como con citosina. Se ha sugerido que la sustitución del grupo metilo de la timina por el átomo de bromo incrementa la formación del tautómero enólico, el cual sería el intermediario responsable de la producción de las mutaciones.

- Mutaciones provocadas por agentes intercalantes.

Algunas sustancias como la acridina y la proflavina son agentes mutagénicos muy potentes, estos compuestos se intercalan entre las bases del ADN y causan la eliminación o inserción de una base durante su replicación. Se ha sugerido que la eliminación o la inserción dependen de si el agente intercalante se introduce en la cadena molde o en la cadena en crecimiento.

1.5.2 Intercambios de Cromátides Hermanas

Entre las pruebas genotóxicas de escrutinio, se recomienda la detección del incremento de la frecuencia de intercambios de cromátides hermanas (ICH), que sumada al estudio de aberraciones cromosómicas ofrecen un panorama fidedigno de la capacidad genotóxica de diversas sustancias ya que ambas pruebas detectan daño al material hereditario producido por mecanismos diferentes. (Latt, 1979)

Se puede establecer de manera sencilla que los intercambios de cromátides hermanas (Fig. 5) son como su nombre lo indica, intercambios de segmentos homólogos o casi homólogos, simétricos y equivalentes entre las cromátides de un mismo cromosoma (Morales, 1987).

Fue McClintock en el año de 1938 quien al percatarse de que los cromosomas en anillo podían, eventualmente, originar anillos dicéntricos, sugirió el fenómeno de los ICH. En 1958 J. Herbert Taylor y col. demostraron y publicaron la existencia de los ICH detectados citológicamente en las células de la raíz de *Crepis capolaris* (Tice, 1984). Mediante el análisis

autorradiográfico de dichas células, cultivadas en presencia de timidina tritiada durante el primero de dos ciclos de división sucesivos, ellos observaron intercambios de segmentos entre una cromátide marcada y otra no marcada (Taylor, 1958).



Figura 5. Representación esquemática de los ICH en los cromosomas de ratón

Años más tarde los intentos para detectar la síntesis de ADN, y junto con ella a los ICH, se basaron en la incorporación en el ADN de un átomo pesado y polarizable como el bromo en forma de un análogo de base, la bromodesoxiuridina (BrdU), que pudiera ser detectado por la perturbación a estados excitados de dicho sustituyente y que, por tanto, mostrara las propiedades luminiscentes de él o los colorantes apropiados, unidos al ADN (Fig. 6). Los primeros experimentos de este tipo se realizaron a mediados de 1972 por investigadores como Latt y Sugiyama (Goto, 1975), centrándose en el uso de la quinacrina y sus derivados, principalmente debido a la capacidad de estos compuestos de producir patrones de bandeo de cromosomas en metafase. Sin embargo, debido a que no había un marcado efecto entre la sustitución de la BrdU y la fluorescencia de la quinacrina sólo se pudo continuar con este procedimiento hasta que Grapp y Hilwig encontraron nuevos tipos de colorantes como los bisbencimidazoles. Más tarde se comprendió que dichos bisbencimidazoles al unirse al ADN podían ser reducidos por la sustitución de BrdU y que dicho efecto podría servir para la detección citológica de la incorporación y por tanto de la síntesis de ADN. Poco después se observó que la emisión de fluorescencia del Hoechst 33258 al unirse a poliu (dAdc-BrdU) era

inestable a la iluminación repetida y que las células sustituidas con BrdU y expuestas al colorante eran claramente sensibles a la luz.

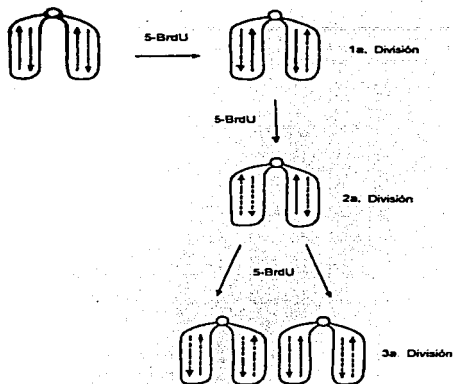


Figura 6. Incorporación de la 5-BrdU al ADN

Debido a que el método original de Latt requería entonces un microscopio de fluorescencia y que además esta fluorescencia se extingue rápidamente durante la observación (Latt, 1973, 1974), Perry y Wolf en 1974 propusieron un nuevo método utilizando además de la BrdU, el colorante de Giemsa y la exposición de las preparaciones a un buffer caliente (2xssc a 60 °C), la observación de dicha técnica puede ser explicada en términos de una fotólisis y una elución por el buffer caliente (Goto, 1975), aunque esta no ha sido la única explicación dada al respecto a través de los años (Burkhaider, 1979). Así esta técnica de tinción con Giemsa

facilitó el análisis de los ICH y por tanto su utilización en un laboratorio sin necesidad de un microscopio de fluorescencia.

Actualmente se continúa ampliando el interés en la naturaleza, el significado y la utilidad de este fenómeno observado citogenéticamente (Tice, 1984).

1.5.3 Importancia del estudio de los intercambios de cromátides hermanas.

El estudio de los ICH primeramente concierne al mecanismo por medio del cual las técnicas con BrdU detectan los ICH. En segundo término se centra en la utilización de los ICH como una prueba a corto plazo para estudiar tanto a los agentes mutagénicos como a los carcinogénicos y en tercer lugar se refiere al mecanismo de formación de los ICH y su relación a ciertas enfermedades hereditarias en el humano como el síndrome de Bloom, que se caracteriza a su vez, por una predisposición a diferentes tipos de neoplasias (Perry, 1974; Díaz G., 1996).

Aunque todavía no se establece el significado biológico de los ICH, desde un punto de vista molecular, éstos consisten en el intercambio de doble cadena entre las moléculas de ADN de las cromátides hermanas; esto ha dado pie para que propongan modelos que explican como ocurre el fenómeno, basados fundamentalmente en los modelos de recombinación bacteriana. Un aspecto interesante en relación con los ICH es que se han observado en las células de todos los organismos estudiados, lo que sugiere que los ICH son un fenómeno o la expresión de un fenómeno, fundamental para la célula. Otro aspecto de interés es de que la mayor parte de los mutágenos conocidos son capaces de inducir ICH en mayor o menor grado. (Morales, 1988)

En una revisión que realizaron Tice y Hollander en 1984, se encuentran varios modelos de la formación de los ICH, algunos de ellos son:

- El modelo del Desvío de la Replicación (replication bypass model) (D.A. Shafer, gen. clin)
- El modelo de la Ruta de la probabilidad (path-probability model) de MK Conner.
- El modelo tricorte cruzamiento-unión de ADN(DNA cross-link 3-cuts model) propuesto por Fujiwara del Japón.

Cada modelo está basado en evidencia experimental específica aunque a veces limitada y ningún modelo o mecanismo de la formación de ICH en general ha sido hasta el momento confirmado (Tice y col, 1984). En un principio, se pensó que los ICH podrían ser el resultado de un proceso de reparación de lesiones en el ADN (Bender y cols. 1974; y Latt 1974); sin embargo la observación de que algunos agentes pueden inducir un incremento en la frecuencia de ICH, que se prolonga mucho tiempo después de su administración (Ishii y Bender 1978), sugiere que las lesiones no son reparadas.

Más tarde, Robert B Painter en el año de 1980 propuso lo que llamó el modelo de Replicación de ICH basado en la idea que los rompimientos de doble cadena son generados en la conjunción entre un replicón completamente duplicado y otro parcialmente duplicado. Este modelo constituye la hipótesis más aceptada de la inducción de ICH actualmente.

Se denominan replicones a las unidades discretas de replicación del ADN separadas unas de otras por ARN y proteínas. Painter sugirió que el ADN en estas conjunciones o sitios de separación son susceptibles de rompimientos de doble cadena durante la replicación, lo cual es factible por la presencia de la enzima Topoisomerasa II descubierta en células de *Drosophila*; dicha enzima es capaz de inducir rompimientos de doble cadena del ADN. De esta manera, el daño que involucra la detención en la progresión de los orígenes de replicación provoca una sincronía en la replicación de dichas unidades lo que incrementa la posibilidad de dobles rupturas después de que una unidad haya terminado su replicación. (Painter 1980)

Por otro lado, es posible que el fenómeno de los ICH sea la consecuencia de un proceso que permite a la célula dividirse, aun en presencia de lesiones en su ADN; de ser así, pudiera haber una correlación entre el fenómeno y la mutación (Carrano, 1982), dado que las lesiones persistentes aumentarían la probabilidad de esta última en el ADN. Lo anterior tiene importancia en relación con la formación de células cancerosas, debido a que existen pruebas que asocian la persistencia de lesiones en el ADN con las células malignas (Margison, 1975).

A pesar de que los experimentos en autorradiografía de Kato indicaban que los mutágenos inducen ICH (Kato 1974), no fue sino hasta la introducción de la técnica dependiente de 5-BrdU de Latt (Latt, 1973) cuando los ICH fueron considerados como un indicador de potencialidad mutagénica y carcinogénica. De hecho, los ICH son un método de mayor sensibilidad para la detección de muchos mutágenos químicos en comparación con las aberraciones cromosómicas, de acuerdo con Latt (1974), la sensibilidad de ICH es aproximadamente 100 veces mayor que la prueba estándar de aberraciones cromosómicas.

1.5.4 Sistemas de estudio para ICH

El interés en los ICH como una alternativa genotóxica fue iniciada por el estudio extensivo a cargo de Perry y Evans en 1975. Actualmente hay evidencia de que para muchos agentes químicos, el estudio de los ICH proporciona el índice más sensible para detectar el daño genético porque se ha encontrado que existe una correlación entre la frecuencia de ICH y la dosis del mutágeno (Perry y Evans, 1975; y Takehisa, 1982). Por esto el comité de Genética Toxicológica de los EEUU lo ha incluido como sistema de prueba (Latt y cols, 1981).

Se han realizado varios estudios con el objeto de establecer si los ICH suceden normalmente en condiciones naturales y, si así es, con qué frecuencia. El principal problema para resolver esta cuestión es que para el análisis de los ICH se requiere de la incorporación previa de 5-

BrdU al ADN; se ha demostrado que tanto la presencia de la BrdU en el medio como su incorporación en el ADN provocan ICH. Además de que los estudios realizados *in vitro* se ha observado que los medios de cultivo y el suero usado en ellos también ocasiona ICH. Una dificultad adicional es que mediante el protocolo usual del análisis no es factible determinar la frecuencia espontánea de los ICH en cada ciclo de división, si no en cada dos. (Morales, 1988)

También se ha encontrado que mientras mucho mutágenos y carcinógenos son activos *in vitro*, otros, como la ciclofosfamida requieren la adición de microsomas hepáticos para su activación metabólica (Stetka, 1976). Es factible realizar cultivos celulares a partir de un gran número de tejidos que van desde la sangre periférica, aspirados de médula ósea, piel, líquido amniótico y vellosidades coriónicas (Salamanca, 1992).

El fundamento de los cultivos celulares es estimular la división celular adicionando a los cultivos un agente mitógeno, por ejemplo en los cultivos de linfocitos se adiciona fitohemaglutinina, la cual estimula la clonación de linfocitos T, posteriormente las células se detienen en la metafase de la mitosis al adicionan un agente que impida la migración de los cromosomas como son la colchicina, pudiendo de esta manera visualizar los cromosomas, así se puede evaluar en ellos por ejemplo las aberraciones que puedan presentar.(Anderson, 1993).

Una de las ventajas de los sistemas *in vivo*, es debida a que como los agentes químicos al ser metabolizados pueden ser activados o inactivados como mutágenos, resulta indispensable el manejo de sistemas con actividad metabólica propia o suplementados con ésta. Técnicamente es más simple que posean esta actividad, a tener que suplementarlos con fracción microsomal activada. Por otro lado, los sistemas *in vivo* permiten una dosificación por peso, lo que puede resultar más apropiado que la dosificación por concentración que se usa en los sistemas *in vitro*; esto es de especial interés sobre todo pensando en una futura extrapolación a posibles

vitro; esto es de especial interés sobre todo pensando en una futura extrapolación a posibles efectos en el hombre. (Morales, 1980)

El problema fundamental para el desarrollo de sistemas *in vivo* que permitan el análisis de ICH es la dificultad de suministrar BrdU a los animales de prueba por períodos prolongados. Sin embargo, esto se ha resuelto de diversas formas, como la infusión continua por vía intraperitoneal o venosa de una solución de BrdU; la implantación de tabletas de BrdU simples o cubiertas con parafina o agar, así como la administración por vía intraperitoneal de una suspensión de BrdU previamente adsorbida en carbón activado, una sola inyección de BrdU en agar fundido o una inyección de una suspensión de aceite de cacahuete y BrdU. (Rivas, 1989)

Igualmente se han descrito muchas variedades de sistemas *in vivo* para los ICH: embriones de pollo, espermatogonias de ratón, médula ósea de hámster chino, médula ósea de ratón, glándula salival de ratón, entre otros. (Morales, 1980). Sin embargo, desde un punto de vista práctico el sistema de médula ósea es el más simple y rápido debido a que la preparación de figuras metafásicas es menos elaborada y el ciclo celular de este sistema es más corto en relación a otros. Por ejemplo, mientras que el ciclo celular del sistema de glándula salival dura 35 h, el de médula ósea dura tan solo 9 h. (Morales, 1980).

II. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis.

Si la FESCDIPINA aumenta la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas, entonces se considerará un agente genotóxico.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Evaluar si la FESCDIPINA es un compuesto genotóxico.

2.2.2 Objetivos particulares

2.2.2.1 Determinar si la FESCDIPINA a diferentes dosis, es capaz de elevar la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en las células de la médula ósea de ratones.

2.2.2.2 Evaluar si la FESCDIPINA produce alguna modificación sobre los parámetros de citotoxicidad.

III. Método

3.1 Material Biológico

Se utilizaron 30 ratones macho de 25 ± 2 g de peso, de la cepa NIH, procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud.

3.1 Material y Equipo

Agujas de insulina

Bomba de vacío

Cubreobjetos

Estuche de disección

Grapas quirúrgicas

Horno

Jeringas

Lámpara de luz negra

Microscopio

Pipetas

Pizeta

Portaobjetos

Prensa con manómetro

Tubos de ensayo con punta en V

3.3 Reactivos

5-Bromodesoxiuridina

Ácido acético

Bis-bencimida

Buffer de fosfatos-citratos pH=7

Cloruro de potasio

Colchicina

Colorante de Giemsa

Dimetilsulfóxido

FESCDIPINA

Metanol

Nifedipina

Parafina

Solución salina de citratos

3.4 Procedimiento

Se experimentó con 6 lotes de 5 ratones cada uno, a los que se les implantó subcutáneamente una tableta de 5-Bromodesoxiuridina de 40 mg (con un espesor de 1.7 mm y de 4.8 mm de diámetro), comprimidas en un punzón de acero de dichas dimensiones, a una presión de 23 Kg/cm² durante 3 segundos en una prensa con manómetro.

A los 30 min. se les administró intraperitonealmente (IP) a cada lote: 10, 30 y 60 mg/Kg de FESCDIPINA, 30 mg/Kg de nifedipina y una mezcla de dimetilsulfóxido:agua (1:1) como control. Después de 21 hrs se les administró colchicina (100 µg/Kg) vía IP. A las 24 h se

sacrificaron los ratones por dislocación cervical, se extrajeron sus fémures para obtener las células de su médula ósea; a las que se les sometió a un tratamiento hipotónico con KCl 0.75M y posteriormente se fijó al paquete celular con una solución de metanol:ácido acético (3:1).

Con esta suspensión celular se realizaron las preparaciones cromosómicas correspondientes a cada ratón y se procedió a teñirlas diferencialmente con la técnica de Goto y col. modificada, que se describe a continuación:

1. Se introdujeron las laminillas en una solución de bis-bencimida 0.01 % (Hoechst 33258) durante 40 min.
2. Se enjuagaron con agua destilada y se secaron en el horno.
3. Se colocaron en cada laminilla 3 gotas de buffer de fosfatos-citratos pH = 7, cubriéndolas con un cubreobjetos.
4. Inmediatamente después, se expusieron a la luz negra durante 40 min.
5. Se enjuagaron con agua destilada y se secaron en el horno.
6. Se sumergieron las laminillas en una solución salina de citratos durante 20 min. a 60°C.
7. Se enjuagaron con agua destilada y se secaron en el horno.
8. Se tñieron con colorante de Giemsa durante 7 min.

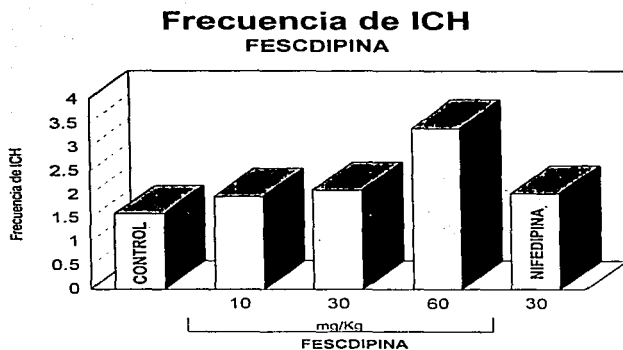
Se procedió a realizar el análisis citogenético, cuantificando por cada ratón:

- 100 metafases, clasificando cuántas de ellas eran de 1ª, 2ª y 3ª división.
- Los ICH presentes en 25 metafases de 2ª división.

IV. Resultados

En la tabla 1 se muestran los valores promedio de 25 metafases de 2ª división por ratón de la frecuencia de ICH en cada lote formado por cinco animales. Estos datos fueron sometidos a la prueba ANOVA y prueba t de Student ($\alpha = 0.05$), lo que demostró que existen diferencias estadísticamente significativas, respecto al lote control en la dosis de 60 mg/Kg de FESCDIPINA, lo que no ocurrió con los lotes tratados con dosis menores (10 y 30 mg/Kg), ni con nifedipina (30 mg/Kg).

Lo anterior se puede observar en la gráfica 1.



Gráfica 1. Frecuencia de ICH

| Compuesto | Dosis (mg/Kg) | Frecuencia de ICH | ± Desviación Estándar |
|------------|---------------|-------------------|-----------------------|
| DMSO Agua | -- | 1159 | 0.2713 |
| Fesedipina | 10 | 196 | 0.4345 |
| Fesedipina | 30 | 209 | 0.2707 |
| Fesedipina | 60 | 340 | 0.2059 |
| Nifedipina | 30 | 202 | 0.5363 |

*Diferencia estadísticamente significativa. Prueba ANOVA y Prueba t de Student, con $\alpha = 0.05$

Tabla 1. Frecuencia de ICH.

La media de los resultados de la cinética de proliferación celular obtenidos de la clasificación de 100 metafases de 1ª, 2ª y 3ª división se observan en la gráfica 2; con estos datos se calculó el tiempo promedio de generación (TPG) (Gráfica 3, tabla 2) utilizando la siguiente fórmula:

$$TPG = \frac{N^{\circ} \text{ de horas de BrdU} \times 100}{M1(1) + M2(2) + M3(3)}$$

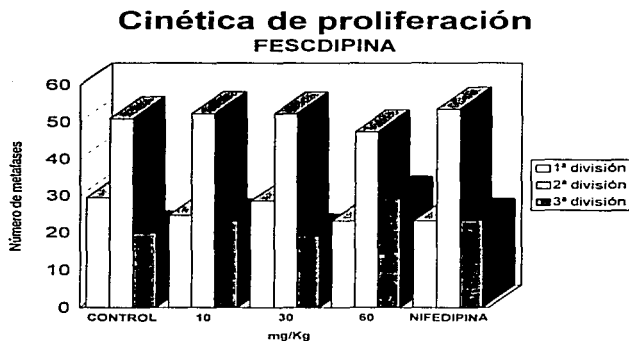
$$M1(1) + M2(2) + M3(3)$$

Los datos que se obtuvieron con el cálculo anterior fueron tratados con la prueba ANOVA y la prueba t de Student $\alpha = 0.05$, lo que demostró que existen diferencias estadísticamente significativas, respecto al lote control en la dosis de 60 mg/Kg de FESCDIPINA y en el lote administrado con nifedipina (30 mg/Kg), lo que no ocurrió con los lotes tratados con dosis menores (10 y 30 mg/Kg).

| Compuesto | Dosis (mg/Kg) | M1 | M2 | M3 | TPG | Desviación estándar |
|------------|---------------|------|------|------|--------|---------------------|
| BMSO/Aguar | 1:1 | 29.4 | 50.8 | 49.6 | 11.27 | 0.1079 |
| Fescdipina | 10 | 23.6 | 52.2 | 23.2 | 11.13 | 0.2463 |
| Fescdipina | 30 | 25.6 | 52.2 | 19.2 | 11.18 | 0.1194 |
| Fescdipina | 60 | 25.2 | 47.4 | 29.4 | 10.18* | 0.0794 |
| Nifedipina | 30 | 23.2 | 53.4 | 23.4 | 10.57* | 0.2579 |

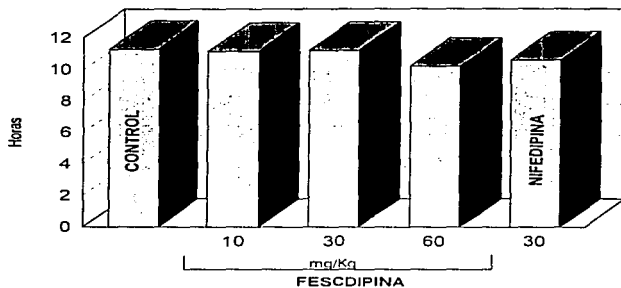
*Diferencia estadísticamente significativa. Prueba ANOVA y Prueba t de Student, con $\alpha = 0.05$

Tabla 2. Cinética de proliferación celular y tiempo promedio de generación



Gráfica 2. Cinética de proliferación celular

Tiempo promedio de generación FESCDIPINA



Gráfica 3. Tiempo promedio de generación

V. Discusión

Hasta el momento, no tenemos conocimiento de estudios de genotoxicidad que se le hayan realizado a la nifedipina, a pesar de que es un medicamento que tiene varios años en el mercado, sin embargo, se le han practicado las pruebas de ICH y de micronúcleos en mamíferos a la nícárdipina (que también pertenece a la familia de las 1,4-DHP) y no se encontró que ésta y sus metabolitos fueran genotóxicos.

Los estudios de teratogenicidad sugieren que ocurre teratogenicidad especie específica con algunos antagonistas del calcio pero no hay datos disponibles para humanos. (PLM, 1995).

Por otra parte, todos los antagonistas del calcio son clasificados en la categoría C para su uso en el embarazo. En esta categoría se agrupan drogas que debido a sus efectos farmacológicos han causado, o pueden causar, efectos dañinos en fetos humanos o bien causar malformaciones en neonatos.

Al exponer conejos del 6° al 18° día de gestación a la nifedipina se encontraron anomalías dependientes de la dosis (estructuras reducidas, ausentes o anormales) de las falangeas distales de las extremidades (Danielsson, 1992). Hallazgos similares se encontraron en animales que recibieron una sola dosis en el 16° día de gestación.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que los lotes tratados con FESCDIPINA presentan en relación a la dosis, una tendencia al incremento de ICH, sin embargo sólo el lote de 60 mg/Kg presentó una diferencia estadísticamente significativa, respecto al lote control.

La nifedipina y la FESCDIPINA a dosis homólogas (30 mg/Kg), presentan un valor semejante en el incremento de la frecuencia de ICH, (2.09 y 2.02 respectivamente), lo cual nos indica que en esta dosis el potencial genotóxico de la nifedipina y de la FESCDIPINA es similar. El

aumento de la frecuencia de ICH en estos lotes, respecto al control (1.59), aunque no presentó diferencia estadísticamente significativa fue de +0.5 ICH/metafase por lo que según Salamanca (1992), podemos considerar a ambos compuestos, en esta dosis, como mutágenos débiles; si bien esto no representa una ventaja de la FESCDIPINA contra la nifedipina, tampoco es una desventaja.

Es posible pensar que el mecanismo mediante el cual la FESCDIPINA causó la elevación de la frecuencia de ICH y por ende el daño al ADN, sea por poseer una estructura química (piridina) semejante a la de las bases pirimídicas (timina y citosina), sin embargo, consideramos que la FESCDIPINA es una molécula con sustituyentes relativamente grandes en las posiciones 3, 4 y 5, y estos grupos presentarían un efecto estérico para que la molécula pudiera interactuar con la cadena de ADN. También le sería necesario tener un nitrógeno en la posición 3, y un oxígeno en la posición 2 para poder establecer los puentes de hidrógeno con la adenina o la guanina y así aparearse con ellas. Razones similares proponemos para que sus metabolitos tampoco actúen como mutágenos análogos de bases.

Entonces, proponemos que no es la FESCDIPINA, sino sus metabolitos finales quienes dañan al ADN debido a la ciclación que sufren. Probablemente intervenga la formación de radicales libres y estos sean las moléculas genotóxicas.

El tiempo promedio de generación es un parámetro de citotoxicidad que indica si la sustancia probada modifica (retarda o acelera) el ciclo de división celular. Se observó que la nifedipina (30 mg/Kg) y no la FESCDIPINA en la misma dosis, retarda de manera estadísticamente significativa el tiempo promedio de generación celular; sin embargo, la FESCDIPINA a dosis de 60 mg/Kg presentó el mismo efecto, lo cual suponemos que probablemente se deba a su mecanismo de acción farmacológica, por la importancia que tiene el calcio en el funcionamiento celular.

En el lote tratado con 90 mg/Kg de FESCDIPINA fallecieron 2 animales aproximadamente a los 30 min. después de la administración del compuesto, y otro ratón a las 24 h, con las siguientes características: extremidades superiores, inferiores y cola rígidas, con coloración corporal amarilla. Se realizó la necropsia y no se observaron lesiones macroscópicas en los diferentes órganos y tejidos.

En los estudios de toxicidad que le han practicado a la FESCDIPINA, han utilizado dosis hasta de 600 mg/Kg, pero con la vía de administración oral; en cambio nosotros utilizamos la vía IP y suponemos que por esta diferencia se presentó la muerte de los ratones, ya que al absorberse todo el compuesto se pudo producir una marcada hipotensión, un desequilibrio electrolítico o bien una hipercontracción muscular y en consecuencia la muerte.

Se obtuvo la médula ósea de los ratones sobrevivientes y se continuó con el procedimiento mencionado, de la misma forma que con los otros lotes; sin embargo debido a la cantidad y la calidad de la metafases obtenidas no fue posible realizar las lecturas microscópicas. Suponemos que esto se debió al exceso de iones de calcio extracelular y por consecuencia probablemente afectó la permeabilidad de la membrana celular.

El tratamiento de la hipertensión tiene beneficios conocidos, pero en 1995, tres estudios publicados sugieren que ciertos medicamentos antihipertensivos pueden incrementar el riesgo de efectos cardíacos adversos o bien la mortalidad. Psaty y colaboradores reportaron que los bloqueadores de corta acción de los canales de calcio incrementan el riesgo de infarto del miocardio en pacientes hipertensivos. Furberg y colaboradores fundamentan que la nifedipina de corta acción incrementa el riesgo de mortalidad en pacientes con previo infarto del miocardio o angina estable o inestable. Hoes y colaboradores reportaron que el uso de β -bloqueadores o diuréticos incrementaron en riesgo de muerte cardíaca repentina en pacientes hipertensivos.

México es un país donde gran parte de la población adulta padece hipertensión, los medicamentos antihipertensivos que existen en el mercado se elaboran con materia prima que se importa, y como se ha mencionado anteriormente, puede ponerse en riesgo la vida de las personas hipertensas con determinados tratamientos, por lo que consideramos de gran importancia la investigación y caracterización de nuevos fármacos antihipertensivos de origen nacional, como la FESCDIPINA para coadyuvar al proceso que permita su inclusión en el mercado nacional e internacional.

VI. Conclusiones

6.1 La FESCDIPINA incrementó la frecuencia de ICH, respecto al lote control, en las dosis de 10, 30 y 60 mg/Kg.

6.2 La FESCDIPINA disminuyó el tiempo promedio de generación en las dosis de 10, 30 y 60 mg/Kg.

6.3 La FESCDIPINA provocó efectos tóxicos irreversibles en la dosis de 90 mg/Kg.

6.4 Consideramos a la FESCDIPINA como un agente genotóxico en la dosis de 60 mg/Kg.

6.5 La nifedipina disminuyó el tiempo promedio de generación en la dosis de 30 mg/Kg.

VII. Referencias

1. Adelstein, W. G., et al. (1986). Cardiovascular drugs. Jhon Wiley & Sons, Inc. U.S.A
2. Almanza, L. y col. (1995). Estudio de la Toxicidad hepática del DHP-7-REN. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. México.
3. Anderson, D. (1993). En: General & Applied Toxicology. Ballantyne, B. y col. The MacMillan Press. Vol. 2
4. Bondani, A., (1991). *La Seguridad de un Nuevo Medicamento. Estudios Toxicológicos.* Cemifar. México.
5. Brusick, D. (1980). Principles of Genetic Toxicology. Cap. 1. Plenum Press. New York.
6. Butterworth, B. E., (1990). Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. Mut. Res. 239:117-132.
7. Carrano, A. V., et. al. (1982). Sister Chromatid Exchange and Single Gen Mutation en Sister Chromatid Exchange. Jhon Wiley and Sons, New York.
8. Contreras, P. M. (1996). Análisis Histológico de la Toxicidad de la FESCDIPINA, un Nuevo compuesto derivado 1,4-dihidropiridinico. Memorias del XIX Congreso Nacional de Farmacología, México.
9. Cummings, D.M., et. al. (1991). The role of calcium channel blockers in the treatment of essential hypertension. Arch. Intern Med. 151:250-259.
10. Díaz, G. B.D., (1996). Efecto Genotóxico subagudo de la capsicina sobre la frecuencia de Intercambios de Cromátides Hermanas en Células de Médula Ósea de Ratón. Tesis. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. México.

11. Escobar, J. Y col (1996): Efecto de la FESCDIPINA en el modelo de infarto miocárdico inducido mediante la oclusión coronaria en rata conciente. Memorias del XIX Congreso Nacional de Farmacología, México.
12. Glossman, H and Striessnig, J. (1990). Molecular properties of calcium channels. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 114:1-105.
13. Goto, K. Et. al. (1975). Simple Differential Giemsa Staining of Sister Chromatids After Treatment with Photosensitive Dyes and Exposure to Light and the Mechanism of Staining. Chromosome 53:223-230.
14. Hagiwara, N., et al. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sinoatrial node cell. J. Physiol. 395:233-253.
15. Ishii, Y. Et.al. (1978). Factors Influencing the Frequency of Mytomicin C induced SCE in 5-BrdU substituted Human Lymphocytes in Culture. Mutat. Res. 51:411-422.
16. Kilbey, B.J. (1978). Mutagenicity Screening General Principles an Minimal Criteria. Mut. Res. 53:361-367.
17. Latt, S.A. (1974). Sister Chromatid Exchange Indices of Human Chromosome Damage and Repair Detection by Fluorescence and Induction by Mitomycin C. Proc. Natl. Acas. Sci. USA. 71:3162-3166
18. Latt, S.A. (1973). Microfluoremetric Detection of DNA Replication in Human Metaphase Chromosomes. Proc. Natl. Acas. Sci. USA. 70:3395-3399.
19. Latt, S.A. et. al. (1981). Sister Chromatid Exchange: A Report of the Gene Tox Program. Mutat. Res. 87:17-62.
20. Littlefield, L.G., et. al.(1979). Sister Chromatid Exchanges In Human Lymphocytes Exposed During Go to Four Classes of DNA-damaging Chemicals. Mutat. Res. 67:259-269.

21. Martínez A.L. y col. (1996). Efecto de la FESCDIPINA sobre las arritmias consecutivas a la isquemia-reperusión miocárdica en rata. Memorias del XIX Congreso Nacional de Farmacología, México.
22. Martínez, A. G., y col. (1995). Evaluación del efecto inmunotoxicológico de la FESCDIPINA. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. México.
23. Martínez, A.L. et.al., (1996). Effect of FESCDIPINE a new antihypertensive drug on the incidence of reperfusion arrhythmias in the *in vivo* anaesthetized rat. Memories of XIV International Symposium on Medicinal Chemistry, Maastricht, The Netherlands.
24. Meyer, H., (1984). Structural/activity relationships in Calcium antagonist and cardiovascular disease, in Perspectives in Cardiovascular Research. Raven Press, Vol. 9. U.S.A.
25. Morales, R. P. (1980). Analysis *in vivo* of Sister Chromatid Exchange in Mouse Bone Marrow and Salivary Gland Cells. Mutat. Res. 74:61-69.
26. Morales, R. P. (1987). El Daño a la Información Genética y los Intercambios entre Cromátides Hermanas. Ciencia y Desarrollo XIV, 81:65-72.
27. Ople. L. H., (1989). Calcium antagonist and cardiovascular disease, in Perspectives in Cardiovascular Research. Raven Press, Vol. 9. U.S.A.
28. Painter, R.B. (1980). A Replication Model for Sister Chromatid Exchange. Mutat. Res. 70:337-341.
29. Paquette, L. (1992). Fundamentos de Química Heterocíclica. Limusa. México.
30. Pelzer, D., et al. (1992). The Heart and Cardiovascular System. 2nd. Raven Press; New York. Cap. 40.

31. Perry, P. et al. (1975) Cytological Detection of Mutagen-carcinogen Exposure by SCE. *Nature* 258:121-124.
32. Plepho, R. W., (1991). Heterogeneity of calcium channel blockers. *Hosp Pharm.* 26:56-864.
33. Rivas, O. G., (1989). El efecto inhibitorio de la vitamina C sobre la frecuencia de los Intercambios de Cromátidas Hermanas Inducidos mediante Mitomicina-C *In vivo*. Tesis. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. México.
34. Sasaki, M. (1982). Role of Chromosomal Mutation in Development of Cancer. *Cytogenet. Cell. Genet.* 33:160-168.
35. Tanabe, T. et al. (1990). Cardiac-type excitation-contraction coupling in dysgenic skeletal muscle injected with cardiac dihydropyridine receptor cDNA. *Nature*, 344:451-453.
36. Tice, R.R., et al. (1989) .A Review of The International Symposium on Sister Chromatid Exchanges: Twenty Five Years of Experimental Research. *Environ. Mut.* 6:737-752.
37. Triggie, D.J. , (1991). Calcium-channel drugs: Structure-function relationships and selectivity of action. *J Card. Pharm.* 18 (Supp 10):S1-S6.