



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD GENOTÓXICA  
DEL COMPUESTO TIOMORFOLÍNICO LQM 319 MEDIANTE EL  
ENSAYO DE ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL IN VIVO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**FLORENCIA CONCEPCIÓN ROJAS OLIVARES**

ASESORAS:

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO  
M. en C. MA. DEL PILAR MÁRQUEZ BECERRA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES  
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto Tiomorfólnico  
IQM-319 mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel -  
in vivo.

que presenta la pasante: Rojas Olivares Florencia Concepción  
con número de cuenta: 09927995-0 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Octubre de 2008

PRESIDENTE	Dr. Ricardo V. Santiago Díaz	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriqa Arceo	
SECRETARIO	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
PRIMER SUPLENTE	QFI. Guadalupe Koizumi Castro	
SEGUNDO SUPLENTE	MC. Maritere Domínguez Rojas	

## **HE APRENDIDO...**

- ✦ *Que la madurez tiene mucho que ver con la clase de experiencias que he tenido, con lo que he aprendido de ellas y poco con el número de cumpleaños que he celebrado*
- ✦ *Que lo que cuenta no es lo que tengo en la vida, sino a quien tengo en mi vida*
- ✦ *Que no debo compararme a mi mismo con lo mejor de los otros*
- ✦ *Que no importa cuanto me interese o preocupe por la gente, algunas personas simplemente no actúan recíprocamente*
- ✦ *Que toma años construir una confianza, y solo segundos destruirla*
- ✦ *Que la verdadera amistad continua creciendo, incluso a pesar de las distancias más grandes, lo mismo se aplica al amor verdadero*
- ✦ *Que independientemente de lo bueno que sea un amigo, habrá momentos que me hiera y deberé perdonarlo por eso*
- ✦ *Que a veces, aquellos que imagino que me darán la espalda cuando estoy pasando una mala racha, son los que me ayudan a recuperarme*
- ✦ *Que en un instante puedo hacer algo que hará doler mi corazón el resto de mi vida*
- ✦ *Que siempre debo despedirme de mis seres queridos con palabras amorosas por que puede ser la última vez que los vea*
- ✦ *Que no importa cuan roto esté mi corazón el mundo no se detendrá para consolarme*
- ✦ *Que mi mejor amigo(a) y yo podemos estar haciendo algo o haciendo nada, y sin embargo la pasamos muy bien*
- ✦ *Que no siempre bastara con ser perdonado por los demás, a veces será necesario aprender a perdonarme a mi misma*
- ✦ *Que mis antecedentes y circunstancias pueden haber influenciado en lo que soy, pero solo yo soy responsable por lo que llegue a ser.*
- ✦ ***He aprendido que siempre puedo seguir adelante, aún mucho después de que pensaba que ya no podía***
- ✦ ***He aprendido que me esta tomando mucho tiempo llegar a ser la persona que quiero ser.***

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi DIOS.** Gracias por la vida; por los días felices, pero también por los días de angustia y de tristeza, por la fortaleza, la fe y la paciencia que muchas ocasiones te pedí para terminar con este proyecto y no darme por vencida. Ahora solo te pido salud y vida para seguir adelante.

**A mi Mamita.** Gracias por darnos a mi, a mis hermanos y a mi padre el más grande regalo: Tu Vida, gracias por estar aquí siempre, por tu amor, cuidados y oraciones, por que se que aunque a veces quisieras salir corriendo no lo haces y es maravilloso saber que alguien me espera en casa todas las tardes.

**A mi Papá.** Se que fue y es difícil, pero gracias por tus palabras, tu confianza, amor, apoyo y todo el esfuerzo que haces por nosotros. Sin ti no hubiera sido posible alcanzar este sueño.

**A mis hermanos:** Por compartir su tiempo y su espacio. Eduardo y Nancy: Aún faltan mucho camino, no permitan que nada los detenga. Victor: la vida nos pone trabas, pero tu y Bere no pueden errar, sean para ese pequeño su ejemplo y su más grande orgullo.

**A mis tíos y primos,** que nunca nos han dejado solos, **A mis abuelitos** que aún están conmigo, pero también a los que se encuentran más cerca de DIOS y que aún extraño como el día en que se fueron.

**Antonio.** Gracias por tu amor, por escucharme, por tus consejos, por tu compañía, por todas las tardes de espera y por tu apoyo incondicional. Gracias mi amor por todo el tiempo compartido. TE AMO.

**A:** Nicté, Lupe, Bere, Miguel, Liz, Alfonso, Francisco, Hermes, Juan, Uriel Itzel, Marco, Juli, Luna, Rosario y Marlen, por que hicieron de la estancia en la UNAM algo inolvidable. Orquidea, Aureola, y Yuriana por que aunque trabajamos fuerte en el Lab de Cito también nos divertimos mucho. Y por supuesto a Yeni por ser mi mejor amiga. Al profesor Cris (C-4) por su tiempo. A mi amiga Nancy Molina y a Miriam Vázquez por su apoyo.

### **A mis asesoras:**

**Dra. Sandra Díaz.** Gracias por su gran apoyo y confianza, por darme la oportunidad de alcanzar mi sueño, por permitirme aprender de usted que es un gran ejemplo de sencillez, dedicación y fuerza como Profesora, pero también como Mujer.

**cDra. Pilar Márquez.** Por los días interminables de trabajo, por tu confianza y consejos. Por que a pesar de todo en ti encontré no solo una compañera de trabajo, también una amiga.

**Al Dr. Ricardo Santiago, Q.F.B. Rosalba Bonilla, Q.F.I. Guadalupe Koizumi y M en C. Maritere Domínguez** por su tiempo y consejos para mejorar este trabajo.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo del proyecto PAPIIT IN213606-3

La Investigación teórica y experimental de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética L-521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo I a cargo de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.

Las laminillas se realizó en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Ciencias de la Salud de la UAEH, a cargo de la Dra. Alejandra Hernández Ceruelos.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS	ii
ABREVIATURAS	iii
<b>I RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II MARCO TEÓRICO</b>	<b>2</b>
<b>1 HIPERTENSIÓN ARTERIAL</b>	<b>2</b>
1.1 Definición	2
1.2 Clasificación y Etiología	2
<b>2 FARMACOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN</b>	<b>4</b>
2.1 Diuréticos	4
2.2 Adrenérgicos	5
2.3 Bloqueadores de los canales de Calcio	5
2.4 Inhibidores de la actividad angiotensínica	6
2.5 Vasodilatadores directos	6
2.6 Resumen de los efectos de genotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis y/o teratogenesis para los fármacos antihipertensivos	7
<b>3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL</b>	<b>8</b>
<b>4 CAPTOPRIL</b>	<b>9</b>
<b>5 DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS</b>	<b>11</b>
5.1 Etapas	11
5.2 Compuesto tiomorfolínico LQM-319	12
<b>6 EVALUACIÓN GENOTÓXICA</b>	<b>14</b>
6.1 Pruebas para la detección de genotoxicidad	14
6.2 Electroforesis unicelular en gel	16
6.3 Metilmetano-sulfonato como control positivo en pruebas de genotoxicidad	19
<b>III JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>IV OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>V MATERIAL</b>	<b>23</b>
<b>VI METODOLOGÍA</b>	<b>24</b>
<b>VII RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>VIII DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>IX CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>X BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>43</b>
ANEXO	46

<b>INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICAS</b>		<b>pag.</b>
<b>Figura 1.</b>	Sitios anatómicos de control de la presión arterial	4
<b>Figura 2.</b>	Estructura del Captopril	9
<b>Figura 3.</b>	Etapas en el desarrollo de un fármaco	11
<b>Figura 4.</b>	Estructura de la molécula de Changrolina en sus tres regiones	12
<b>Figura 5.</b>	Estructura del compuesto LQM 319	13
<b>Figura 6.</b>	El daño al DNA puede ser detectado en diferente manera según la prueba utilizada	15
<b>Figura 7.</b>	Los núcleos de células dañadas se observan semejantes a cometas después de la electroforesis	16
<b>Figura 8.</b>	Clasificación en categorías de los cometas	18
<b>Figura 9.</b>	a) Microscopio de fluorescencia con analizador de imagen, b) imagen obtenida con el analizador Comet Imager 1.2 Metasistem 2007	19
<b>Figura 10.</b>	Estructura del metilmetano-sulfonato	19
<b>Figura 11.</b>	Mecanismo de acción del Metilmetano-sulfonato	20
<b>Figura 12.</b>	Diagrama de flujo: Ensayo de Electroforesis Unicelular en Gel	28
<b>Figura 13.</b>	El Momentum de la cauda obtenido para cada cometa puede no ser proporcional al largo de la cauda: Ambos cometas parecen tener caudas de tamaño similar pero el momentum de la cauda de 1) es más pequeño que el de 2)	30
<b>Figura 14.</b>	Nucleoides según su órgano de procedencia. A) Corazón: nucleoide pequeño, B) Hígado: por lo menos tres tamaños diferentes, C) Riñón: varios nucleoides por campo, mismo tamaño	30
<b>Tabla 1.</b>	Nivel de gravedad en hipertensión según las cifras tensionales	2
<b>Tabla 2.</b>	Etiología de la hipertensión secundaria	3
<b>Tabla 3.</b>	Resultado de las pruebas reportadas para detección de los efectos de genotoxicidad carcinogénesis, mutagénesis y sobre la fertilidad	7
<b>Tabla 4.</b>	Porcentaje de viabilidad mediante la prueba de Azul de Tripán	29
<b>Tabla 5.</b>	Resultados de los promedios de Tail moment obtenidos, así como su correspondiente desviación estándar	31
<b>Tabla 6.</b>	Comparación entre LQM-319 y Captopril para Corazón en las dosis efectivas y 80% de la dosis letal 50	33
<b>Tabla 7.</b>	Comparación entre el LQM-319 y Captopril para Hígado en las dosis efectivas y 80% de la dosis letal 50	34
<b>Tabla 8.</b>	Comparación entre LQM-319 y Captopril para Riñón en las dosis efectivas y 80% de la dosis letal 50	35
<b>Gráfica 1.</b>	Resultados grupales: distribución de la frecuencia del efecto sobre el DNA en corazón, hígado y riñón, expresado como Tail moment	32
<b>Gráfica 2.</b>	Comparación del efecto genotóxico producido sobre corazón por el compuesto LQM-319 contra Captopril	33
<b>Gráfica 3.</b>	Comparación del efecto genotóxico sobre hígado producido por el compuesto LQM-319 contra Captopril	34
<b>Gráfica 4.</b>	Comparación por dosis del efecto genotóxico sobre riñón producido por el compuesto LQM-319 contra captopril	35

## ABREVIATURAS

<b>ALS</b>	Sitios Álcali Lábilés
<b>AT1</b>	Receptor tipo I de Angiotensina II
<b>CDETH</b>	Comité para la Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión arterial
<b>CMPc</b>	Monofosfato de Citidina cíclica
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal Cincuenta
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DSB</b>	Rupturas de Cadena Doble
<b>ECA</b>	Enzima Convertidora de Angiotensina
<b>ENSA</b>	Encuesta Nacional de Salud
<b>ENSANUT</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<b>ICH</b>	Intercambio de Cromátides Hermanas
<b>ICH</b>	Intercambio de Cromátides Hermanas
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
<b>LMP</b>	Agarosa de bajo punto de fusión
<b>mA</b>	mili Ampers
<b>mg/ Kg</b>	miligramos por Kilogramo
<b>mm Hg</b>	milímetros de mercurio
<b>MMS</b>	Metilmetano-sulfonato
<b>MN</b>	Micronúcleos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAD</b>	Presión Arterial Diastólica
<b>PAM</b>	Presión Arterial Media
<b>PAS</b>	Presión Arterial Sistólica
<b>PBS</b>	Solución Buffer de Fosfatos
<b>SCGE</b>	Ensayo de Electroforesis unicelular en gel
<b>SSB</b>	Rupturas de Cadena Sencilla

## I. RESUMEN

La hipertensión arterial es el principal factor de riesgo de enfermedad coronaria, que a su vez constituye la primera causa de muerte a escala mundial, en México es causa del 16.43% de mortalidad, es por ello que en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-1 el grupo de Química Medicinal a cargo del Dr. Enrique Ángeles obtuvo una serie de 17 compuestos de exploración, derivados de la Changrolina, algunos de los cuales poseen actividad hipotensora de acuerdo al modelo de presión arterial invasiva en rata normotensa que ha sido demostrada por la Dra. Luisa Martínez y colaboradores, entre dichos compuestos el tiomorfolínico LQM 319 mostró tener mejor actividad en la reducción de la Presión Arterial Media, Sistólica y Diastólica. Toda vez que se ha identificado al LQM 319 como cabeza de serie es posible iniciar con las etapas de investigación preclínicas entre las que se encuentra el estudio de su toxicidad.

La presente investigación tuvo como objetivo principal evaluar la capacidad genotóxica del LQM 319 y compararlo contra Captopril, por medio del ensayo de electroforesis unicelular en gel (SCGE) *in vivo* (en ratones macho cepa CD-1), este método determina el grado de daño al DNA en células individuales y además permite el seguimiento de reparación del DNA por lo que es posible cuantificar la genotoxicidad de diversos compuestos como inductores de daño oxidativo, agentes alquilantes, etc.

Inicialmente se determinó la  $DL_{50}$  para el LQM 319 y Captopril por el método de Lorke y por el de Probit, en el primer caso la dosis fue igual para ambos; 471.17mg/Kg, mientras que con el método de Probit la  $DL_{50}$  para el LQM 319 fue de 352.27mg/Kg y para Captopril de 371.32mg/Kg.

Posteriormente se distribuyeron 19 lotes de 5 ratones cada uno, los cuales fueron tratados de la siguiente manera: se administraron intraperitonealmente las dosis de 3, 30 y 290 mg/Kg del compuesto LQM 319, las dosis de 0.00062 y 306 mg/Kg de Captopril (la primera dosis corresponde a la dosis efectiva y la última al 80% de la  $DL_{50}$ ), un lote control negativo y la dosis de 80 mg/Kg de Metilmetano-sulfonato como control positivo, transcurridas 3, 8 o 18 horas se extrajeron hígado, corazón y riñón; la técnica del SCGE consistió en realizar una suspensión celular que fue mezclada con agarosa de bajo punto de fusión para colocarse como capa sobre un portaobjetos con agarosa de punto normal de fusión, después se sumergieron en solución de lisis fría (1hr), posteriormente el DNA celular se sometió a desenrollamiento (pH 13, 30 min) y se realizó la electroforesis (25 volts, 300mA, 20 min), las laminillas se neutralizaron y fijaron en metanol absoluto, y se tiñeron con bromuro de etidio para su análisis. La evaluación de daño se realizó en el microscopio de fluorescencia Imager AI Axiomat 10 de Zeiss con analizador de imágenes del programa Comet Imager versión 2.1 determinando el momentum de la cauda en 50 células para cada ratón de todos los tratamientos, los datos fueron analizados con el programa estadístico INSTAT2 Versión 2.03.

Los resultados obtenidos indican que el MMS fue un buen control positivo debido a que el mayor daño al DNA se encontró a las 3 horas siendo el promedio del momentum de la cauda de 135.32 para hígado, 121.92 en corazón y 67.85 en riñón. En relación al compuesto LQM 319 la dosis efectiva no mostró efecto significativo bajo ningún tratamiento, con la dosis intermedia el órgano más afectado fue corazón a las 3 y 8 horas, mientras el mayor momentum de la cauda se produjo a las 18 hrs en: hígado 28.95, corazón 34.31, riñón 19.60 todos con el 80% de la  $DL_{50}$ . En cambio para Captopril el mayor efecto genotóxico se produjo con la dosis efectiva en corazón 40.26, hígado 29.37 y riñón 41.12 disminuyendo conforme aumenta el tiempo, la misma tendencia se produjo con el 80% de la  $DL_{50}$  pero el efecto genotóxico es menor que con la dosis efectiva.

En conclusión la toxicidad aguda del compuesto LQM 319 es ligeramente mayor que la de Captopril, sin embargo el LQM 319 produce menor daño al DNA que Captopril, por lo que se perfila como un buen prospecto para continuar con sus estudios preclínicos y clínicos que encaminen a su posible comercialización.

## II. MARCO TEÓRICO

### 1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

#### 1.1. Definición

La Hipertensión arterial se define como una elevación de la presión sistólica superior o igual a 140 mm Hg y/o diastólica superior o igual a 90 mm Hg.

Según la OMS y la CDETH el nivel de gravedad se correlaciona con cifras tensionales diastólicas y sistólicas progresivamente elevadas como se muestra en la siguiente tabla: (Cruz, 2001)

**Tabla 1. Nivel de gravedad en hipertensión según las cifras tensionales**

Categoría	CDETH		OMS	
	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Estadio I (leve)	140-159	90-99	140-180	90-105
Estadio II (moderada)	160-179	100-109	>180	>105
Estadio III (grave)	180-209	110-119		>160
Estadio IV (muy grave)	>210	>120		140-159

#### 1.2. Clasificación y Etiología

Hipertensión primaria, esencial o idiopática: Se considera como una enfermedad heterogénea y de origen multifactorial en donde parecen intervenir factores genéticos o hereditarios y factores ambientales (Ruiz, 2003). Constituye el más del 90% de los casos. No está vinculada a una etiología pero existen factores de riesgo, como: hipercolesterolemia, diabetes mellitus, tabaquismo, consumo excesivo de sal, obesidad, antecedentes familiares de enfermedad vascular, factores ambientales como el estilo de vida con estrés y otros. Es cuatro veces más frecuente entre la población negra que entre la blanca y más frecuente entre los adultos de sexo masculino respecto de las mujeres de la misma edad. (Mycek y cols., 2004).

Hipertensión secundaria: Se define así, cuando puede asignársele una causa específica (tabla 2).

**Tabla 2. Etiología de la hipertensión secundaria**

ENFERMEDADES CAUSANTES DE HIPERTENSIÓN SECUNDARIA	
Enfermedades Renales	
Glomerulonefritis aguda y crónica	Pielonefritis
Glomerulosclerosis diabética	Estenosis de arteria renal
Obstrucción uretral	Obstrucción de arterias renales
Cálculos renales	Síndrome de Liddle
Tumores renales	Enfermedad poliquística
Enfermedades Endócrinas o/y Trastornos de la glándula suprarrenal	
Hiperaldosteronismo	Feocromocitoma
Síndrome de Cushing	Síndrome de Conn
Malformaciones congénitas	
Coartación aórtica	Anormalidades en el sistema renina-angiotensina
Fármacos	
Anticonceptivos orales	Corticoesteroides
Ciclosporina	Eritropoyetina
Cocaína	Regaliz
Otras causas	
Embarazo complicado por preeclampsia	Porfiria intermitente aguda
Abuso de alcohol	Intoxicación aguda por plomo

## 2. FARMACOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN

El objetivo inicial del tratamiento antihipertensivo es lograr y mantener una presión diastólica por debajo de 90 mmHg, y la sistólica por debajo de 140 mmHg, sin comprometer la función renal, cerebral, miocárdica ó producir síntomas adversos (Collazo y cols., 2006).

Todos los antihipertensivos actúan en uno o más de los 4 puntos de control anatómico señalados en la figura 1, produciendo sus efectos al interferir en los mecanismos normales de regulación de la presión arterial (Katzung, 2005).

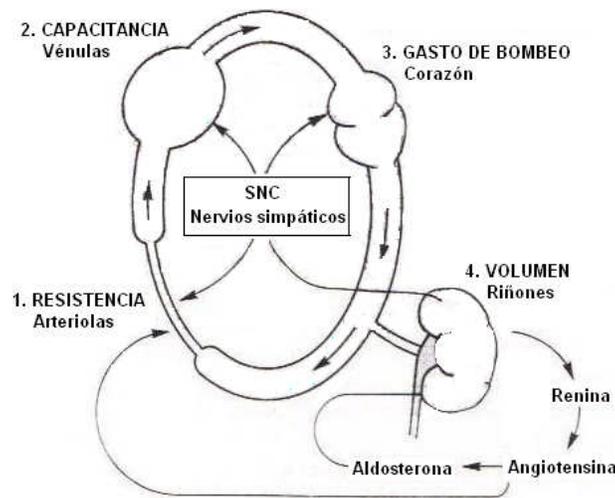


Figura 1. Sitios anatómicos de control de la presión arterial (Katzung, 2005)

Así se pueden distinguir 5 grupos de fármacos antihipertensivos conforme a su principal mecanismo de acción: diuréticos, adrenérgicos, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la actividad angiotensínica y vasodilatadores directos.

### 2.1. Diuréticos

Los más utilizados son las tiacidas y los diuréticos de asa.

**Tiacidas:** Aumentan la excreción de sodio, cloro, potasio, magnesio, fosfato, bromuro, yodo y bicarbonato de manera moderada y sostenida. Actúan inhibiendo su reabsorción en la porción ascendente del asa de Henle y al principio de los túbulos distales. Además disminuyen la excreción de calcio y la retención de ácido úrico. La acción antihipertensiva se atribuye a la dilatación arteriolar y consiguiente disminución de la resistencia periférica, por disminución del

contenido celular en sodio y disminución de la excitabilidad. Las tiazidas más utilizadas son: clortalidona, hidroclorotiacida, indapamida y metolazona (Katzung, 2005)

Diuréticos de asa: La furosemida y el ácido etacrínico inhiben la reabsorción de sodio y cloruros en los túbulos proximal, distal y en el asa de Henle, la bumetanida no actúa en el túbulo distal. Algunos ejemplos de estos son: bumetanida, ácido etacrínico, furosemida, piretanida, y torasemida (Rodríguez y cols., 2005).

## **2.2. Adrenérgicos**

Agonistas de acción central: Inhiben la respuesta adrenérgica, central y periférica estimulando los receptores alfa, por lo tanto se reduce el gasto cardíaco y disminuye la resistencia vascular periférica. Tienen efecto sinérgico con los diuréticos, esta combinación puede minimizar las reacciones no deseadas más comunes en las dosis necesarias al administrar el antiadrenérgico solo. Clonidina y metildopa son los fármacos característicos de este grupo (Rodríguez y cols., 2005).

Inhibidores adrenérgicos  $\alpha$ -1: Bloquean selectivamente los receptores postsinápticos adrenérgicos  $\alpha$ -1 de arteriolas y venas, la acción periférica dilata la resistencia (arteriolas) y la capacitancia (venas), disminuyendo más la presión diastólica. Ejemplos de este grupo son: doxazosín, prazosín y terazosín (Kalant y cols., 2002).

Bloqueadores  $\beta$ : Disminuyen la fuerza contráctil del miocardio, así como la frecuencia cardíaca, por lo que inicialmente reducen el gasto cardíaco, lo que activa un reflejo barorreceptor que incrementa las resistencias vasculares periféricas, a pesar de lo cual disminuye la tensión arterial. Cuando la administración es constante por períodos prolongados persiste la acción hipotensora. Fármacos con este mecanismo de acción son: acebutolol, atenolol, esmolol, metoprolol, pindolol y propranolol (Florez y cols., 2003).

## **2.3. Bloqueadores de los canales de Calcio**

Inhiben la entrada de calcio a través de la membrana produciendo la relajación del músculo liso, lo que dilata las arterias coronarias y periféricas, así como las arteriolas, y hace lenta la conducción cardíaca; provoca la disminución de la resistencia periférica y se reduce la presión arterial. Los fármacos más comunes de este grupo son: amlodipina, diltiazem, felodipina, isradipina, lacidipina, nifedipina, nisoldipina y nitrendipina (Rodríguez y cols., 2005).

#### **2.4. Inhibidores de la actividad angiotensínica**

La angiotensina II es un potente vasoconstrictor y produce estimulación cardíaca, aumenta la secreción de aldosterona y la reabsorción de sodio a nivel renal, por lo tanto desempeña una función importante en las características fisiopatológicas de la hipertensión. (Rodríguez y cols., 2005).

Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina: Inhiben la peptidil dipeptidasa que hidroliza la angiotensina I a angiotensina II, produciendo vasodilatación arterial, venosa y la natriuresis. Además aumentan los niveles de bradisininas vasodilatadoras. Ejemplos de este grupo son: benacepril, cilazapril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, perindopril, quinapril, ramipril, trandolapril (Katzung, 2005).

Antagonistas de los receptores de angiotensina II: Bloquean la unión de la angiotensina II a su receptor AT1 de varios tejidos del organismo, incluidos el músculo liso vascular y la glándula suprarrenal, lo que resulta en vasodilatación, disminución de la secreción de aldosterona y aumento de la actividad de la renina plasmática y de la angiotensina II aunque esta no es suficiente para dominar sobre el efecto hipotensor. Los fármacos más comunes en este grupo son: candersartán, irbesartán, losartán, telmisartán, valsartán (Rodríguez y cols., 2005).

#### **2.5. Vasodilatadores directos**

Dilatan los vasos sanguíneos mediante la acción directa sobre las células del músculo liso a través de mecanismos no autonómicos. La hidralacina y el minoxidilo presentan efecto mayor en las arteriolas que en las venas, este último es un profármaco; su metabolito es el sulfato de minoxidilo y actúa abriendo los conductos de potasio lo que hiperpolariza y relaja el músculo liso vascular. El nitroprusiato y diasóxido son vasodilatadores parenterales que solo se usan en urgencias hipertensivas, el primero parece tener acción similar a los nitritos que consiste en la liberación de óxido nítrico el cual estimula la guanilciclase y eleva la concentración de CMPc en el músculo liso, mientras que el diasóxido tiene acción similar al metabolito del minoxidilo (Rodríguez y cols., 2005).

## 2.6. Resumen de los efectos de genotoxicidad, mutagénesis, carcinógenesis y/o teratogénesis para los fármacos antihipertensivos.

Tabla 3. Resultado de las pruebas reportadas para detección de los efectos de genotoxicidad, carcinógenesis, mutagénesis y sobre la fertilidad. (PLM, 2006. Rodríguez y cols., 2005.)

GRUPO	EFECTOS Y PRUEBAS REPORTADAS			
	GENOTÓXICIDAD	MUTAGÉNESIS	CARCINOGENESIS	TERATOGENESIS: CATEGORIA*
<b>Diuréticos</b>				
Diuréticos de asa	No reportado	Furasemida positiva en Ames a dosis citotóxicas	No reportada	B: torasemida y ácido etacrínico. C furasemida y bumetanida
Derivados tiacídicos	Positivo: Clastogenicidad e inducción de aberraciones cromosómicas <i>in vitro</i> . No genotóxico con MN	Negativo: Ames, Positivo en células de linfoma de ratón	No evidencia	C
<b>Adrenérgicos</b>				
Agonistas centrales	Negativo en ICH's aberraciones cromosómicas	Negativo: Ames	No reportada	C: clonidina. B: metildopa vía oral C por vía intravenosa
Inhibidores adrenérgicos $\alpha$ -1	Negativo en aberraciones cromosómicas	Negativo: Ames, y letal dominante	Terazosín a dosis altas incrementa tumores en médula adrenal	B: doxazosin, C: prazosin y terazosin
Bloqueadores $\beta$	Negativo en pruebas citogenéticas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Negativo: Ames y letal dominante	Negativo	C: propanolol, acebutolol. D: atenolol. C: metoprolol B: pindolol D: metoprolol y pindolol en 2o y 3er trimestre.
<b>Boqueadores de los canales de calcio</b>	No reportado	Negativo para cuatro pruebas	No reportado	C
<b>Inhibidores de la actividad angiotensínica</b>				
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	Negativo en MN, ICH's aberraciones cromosómicas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , Negativo para elución alcalina en hepatocitos de rata	Negativo: Ames	Negativo	C: 1er trimestre. D: en 2o y 3er trimestre
Antagonistas de los receptores de la angiotensina II	Negativo en aberraciones cromosómicas y MN <i>in vitro</i> , Negativo para elución alcalina <i>in vitro</i>	Negativo: Ames	Negativo	C: 1er trimestre. D: en 2o y 3er trimestre
<b>Vasodilatadores</b>	No reportado	No reportado	No reportado	No reportado

\* Los fármacos se clasifican por su grado de riesgo para el feto en 5 categorías

- A. Estudios adecuados y bien controlados en mujeres embarazadas no muestran riesgo para el feto.
- B. No hay estudios realizados en el ser humano, pero los efectuados en animales son negativos.
- C. No realizados en humanos; en animales son positivos para riesgo fetal, sin embargo, el posible beneficio puede justificar el riesgo.
- D. Evidencia positiva de riesgo fetal en investigaciones o informes posmercado pero el posible beneficio puede justificar el riesgo.
- X. Contraindicado en el embarazo: riesgo fetal excediendo que excede cualquier beneficio. (Rodríguez y cols., 2005)

### 3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La hipertensión arterial es uno de los problemas de salud más importantes actualmente por ser el principal factor de enfermedades del corazón, que a su vez constituye la primera causa de muerte a escala mundial, en México de 494,471 defunciones registradas para el año 2006 81,252 fueron causadas por este tipo de enfermedades, lo que corresponde a un 16.43% de la mortalidad total. (INEGI)

En la Encuesta Nacional de Salud 2000 (INSP) se encontró una prevalencia total de hipertensión arterial de 30.7% (15 millones de adultos); De éstos el 12.5% tenía diagnóstico previo, mientras el 18.2% fueron diagnosticados durante la encuesta. La prevalencia fue mayor en los hombres que en las mujeres (32.6% y 29.0%, respectivamente), sin embargo, de los que previamente conocían el diagnóstico fue más alta entre las mujeres que entre los hombres (15.7% *vs* 8.9%). El porcentaje de hipertensos tiene una tendencia creciente conforme avanza la edad ya que es mayor (53.6%) en individuos entre los 70 y los 79 años y menor (17.0%) en los de 20 a 29 años. Antes de los 50 años de edad la prevalencia de hipertensión arterial es mayor en los hombres, llegando en el grupo de 40 a 49 años al 40.7% y, a partir de esta edad, el porcentaje es mayor en las mujeres, en las cuales observamos porcentajes desde 54.6 para el grupo de 50 a 59 años y hasta de 60.3% para el grupo de 80 y más años de edad. Fue más frecuente en los estados de Tamaulipas (38.7%), Zacatecas (36.3%) y Coahuila (35.9%), mientras que un menor número de hipertensos se encontraron en los estados de Puebla (24.1%), Oaxaca (23.3%) y Chiapas (23.0%). Cabe destacar que de la población con diagnóstico médico previo de hipertensión arterial 74.9% tenían algún tipo de tratamiento para controlar la hipertensión, de ellos, 39.8% presentaron niveles de tensión arterial elevada, dicho de otra manera el tratamiento no era el adecuado (INSP). Durante el 2006 se realizó la ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición) en donde se concluyó que la prevalencia de hipertensión arterial en la población adulta es de 30.8%. En diagnóstico previo en las mujeres el porcentaje obtenido fue de 18.7%, mientras que para los hombres fue de 11.4%.

Según la OMS las perspectivas para los años 2010, 2020 y 2030 indican que el porcentaje de muertes totales por enfermedades cardiovasculares serán respectivamente; 30.8%, 31.5% y 32.5% (Olaiz y cols., 2008).

#### 4. CAPTOPRIL

El Captopril se utiliza en el tratamiento de la hipertensión, insuficiencia cardiaca, para prevenir la neuropatía diabética y mejora la supervivencia después del infarto al miocardio.

Es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, y en este grupo se considera como el primer fármaco eficaz por vía oral que se ha comercializado. (Rodríguez y cols., 2005)

##### *Mecanismo de acción*

Inhibe la enzima convertidora peptidil dipeptidasa, uniéndose a su grupo activo a través de su grupo sulfhídrico, cuya función es hidrolizar la angiotensina I en angiotensina II (Katzung, 2005), por lo tanto causa una reducción en la resistencia arterial periférica con la consecuente disminución en la presión arterial. Además aumenta los niveles de bradicininas vasodilatadoras, debido a que la ECA desdobra a la bradicinina, los efectos vasodepresores de sus niveles elevados contribuyen a la vasodilatación periférica producida por los inhibidores de la ECA. Esto contribuye en la dilatación arteriolar con disminución de las resistencias vasculares sistémicas, la tensión arterial y la retención de agua y sodio (Rodríguez y cols., 2005. Kalant y cols., 2002).

##### *Farmacocinética*

Se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, el porcentaje de absorción se halla entre el 60 y 75%, pero la presencia de alimentos reduce su absorción hasta en 40%. Inicia su efecto hipotensor en 15 minutos, los niveles plasmáticos pico ocurren en una hora y el efecto máximo terapéutico requiere varias semanas de tratamiento para aparecer. Aproximadamente del 25 al 30% circula adherido a proteínas plasmáticas, se distribuye por todo el organismo, excepto el SNC. Su metabolismo se efectúa en el hígado, se elimina hasta el 50% como medicamento intacto y el resto como metabolitos inactivos (dímero disulfuro de captopril y disulfuro de cisteína-captopril). La vida media de eliminación es de 3 horas y mas del 95% se elimina por la orina, y una porción mínima en las heces. La duración de su efecto es de dos a seis horas y aumenta con dosis mayores. La insuficiencia renal hace que aumente la duración de la actividad del fármaco por acumulación. El tratamiento con captopril se puede combinar con diuréticos y bloqueadores adrenérgicos $\beta$ . (PLM, 2007. Rodríguez y cols., 2005).

Dosis efectiva en humanos: 70-150 mg diarios; máximo de 450mg diarios divididos en varias dosis. (Rodríguez y cols., 2005)

Dosis efectiva en rata: 0.0062mg/Kg (Herrera, 2005)

*Efectos adversos*

Mareos, desmayos, cefalea, malestar, fatiga, taquicardia, hipotensión, anorexia, vómitos, dolor abdominal, estreñimiento, boca seca, leucopenia, agranulocitosis, pancitopenia, trombocitopenia, anemia, hiperpotasemia, exantema urticarial, prurito, alopecia, fiebre, angioedema. (PLM, 2007).

*Precauciones en relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre la fertilidad*

En el PLM 2007 solo se reporta que en dos años de estudios con dosis de 50 a 1350 mg/Kg/día en ratones y ratas no se encontró ninguna evidencia de potencial carcinogénico. Los estudios en ratas no revelaron alteraciones en la fertilidad (PLM, 2007).

*Propiedades físicas y químicas*

Formula molecular:  $C_9H_{15}NO_3S$

Peso molecular: 217.3

Soluble en agua, metanol, etanol, isopropanol, y cloroformo.

Descripción: Cristales blancos con punto de fusión de 88°C.

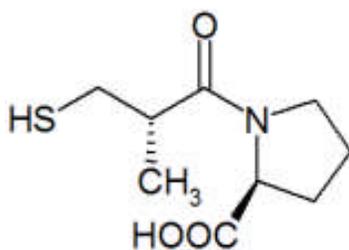


Figura 2. Estructura del Captopril

## 5. DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS

### 5.1. Etapas

Los fármacos pueden ser considerados como el descubrimiento más importante ya que la vida del hombre se encuentra, en mayor o menor medida, relacionada con ellos desde su nacimiento y hasta su muerte. Muchos de estos fármacos se han desarrollado a partir de un pequeño número de prototipos, que son denominados “cabezas de serie”, además a partir de la modificación de éstos es posible llegar al diseño de nuevos compuestos más eficaces y con menos efectos secundarios. (Avendaño, 2001)

Una vez demostrada la actividad útil de un nuevo compuesto es necesaria la optimización de esta cabeza de serie y posteriormente su desarrollo que tiene varias etapas entre las que se encuentra el estudio de su toxicología (figura 3).

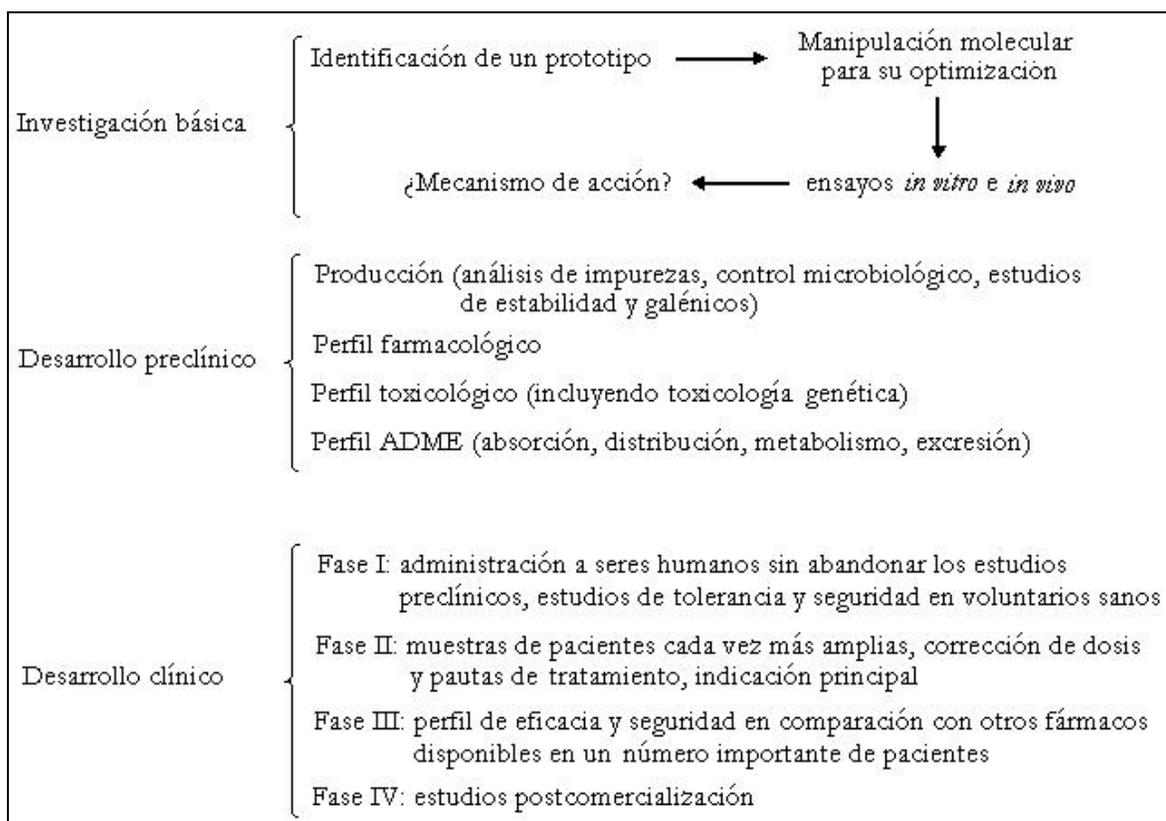


Figura 3. Etapas en el desarrollo de un fármaco (Avendaño, 2001)

## 5.2. Compuesto Tiomorfolínico LQM-319

En 1983 Stout y su grupo de investigación llevaron a cabo el estudio de la Changrolina como un antiarrítmico efectivo, determinando que esta molécula presentaba una diferencia estructural con los antiarrítmicos conocidos hasta esa fecha (Ángeles, 2007), para el análisis de su actividad biológica dividieron la molécula en tres regiones como se muestra en la figura 4. Su investigación consistió en modificar sistemáticamente cada una de ellas para determinar que parte de la molécula era necesaria para la actividad antiarrítmica. (Velázquez, 2007)

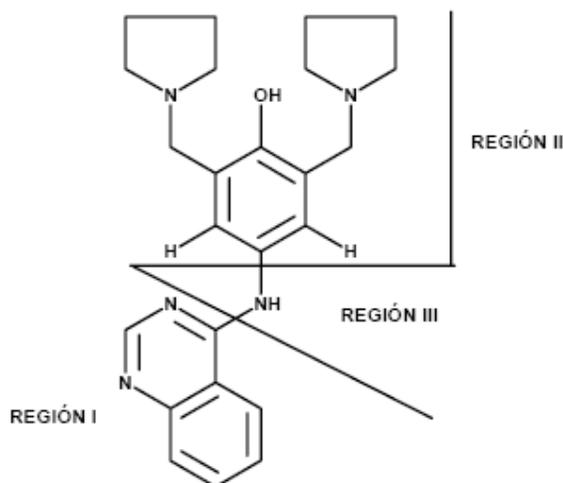


Figura 4. Estructura de la molécula de Changrolina en sus tres regiones (Velázquez, 2007)

Sus conclusiones fueron:

Región I; quinazolina. Puede remplazarse por una gran variedad de heterociclos sin perder la actividad antiarrítmica.

Región II; esqueleto de 2,6-bis(pirrolidín-1-il-metil)fenol. Presenta la mejor actividad y sin éste la actividad es nula.

Región III, unión entre ambas regiones. Si se incluyen grupos carbonilos la actividad aumenta y la toxicidad disminuye. (Ángeles, 2007).

Actualmente, dichas investigaciones fueron retomadas por el grupo de Química Medicinal a cargo del Dr. Enrique Ángeles de la unidad de posgrado en la FESC-1 UNAM, quienes propusieron el estudio de compuestos, análogos a la changrolina, en los cuales los grupos pirrolidínicos se sustituyen por morfolina, tiomorfolina o piperidina. (Velázquez, 2007).

Así se obtuvieron una serie de 17 compuestos de exploración a los cuales se les realizó el estudio de la actividad biológica dentro del Laboratorio de Farmacología del Miocardio, a cargo de la Dra. Luisa Martínez Aguilar, de la misma instancia académica, donde se demostró que dichos compuestos tienen actividad hipotensora en el modelo de presión arterial invasiva en rata normotensa. A partir de esto se han realizado diversos estudios en donde se encontró que el compuesto LQM-319 (figura 5) tiene mejor actividad en la reducción de la Presión Arterial Media (PAM), Presión Arterial Sistólica (PAS) y Presión Arterial Diastólica (PAD) a dosis de 3mg/Kg, tomando como referencia al Captopril (100% de eficacia) y en comparación con los otros compuestos, con omapatrilat y losartan (Tapia, 2006)

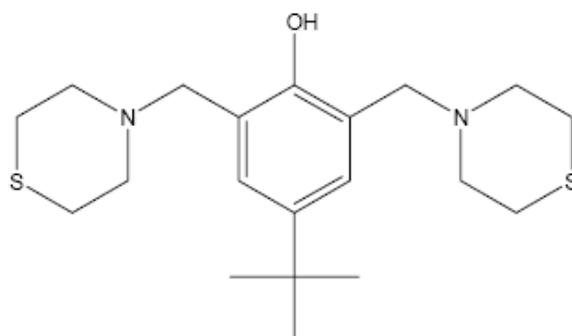


Figura 5. Estructura del compuesto LQM 319 (Velázquez, 2007)

## 6. EVALUACIÓN GENOTÓXICA

La evaluación toxicológica de una sustancia química incluye las pruebas de toxicología genética, que tienen dos propósitos principales: 1) reconocer los agentes mutágenos y 2) caracterizar la relación dosis-respuesta y los mecanismos mutagénicos (Bello, 2001).

Toda mutación producida en una célula germinal puede ser transmitida a la descendencia, pero sí se produce en una célula somática puede ser origen de diversos trastornos, entre los que se encuentran la teratogénesis y las neoplasias, la gran mayoría de compuestos químicos carcinogénicos son genotóxicos, es decir tienen la capacidad de provocar daño sobre el DNA (Bello, 2001).

Las alteraciones del DNA van desde las rupturas mono o bicatenarias, pasando por los entrecruzamientos entre bases del DNA y entre bases y proteínas del DNA hasta la adición de compuestos químicos a las bases del DNA (Klassen y Watkins, 2005)

### 6.1. Pruebas para la detección de genotoxicidad.

Generalmente se exige un "panel mutagénico" consistente en diferentes determinaciones que pueden ser (Ames Test):

- *In vitro*: se utilizan células bacterianas, o de mamífero que se incuban con el producto en presencia o ausencia de la fracción microsomal.
- *In vivo*: en donde se observan posibles efectos en el organismo vivo, principalmente en ratón.

La toxicología genética dispone de una amplia gama de análisis para identificar el potencial genotóxico de una sustancia, de las cuales las más usuales son las siguientes:

*Aberraciones cromosómicas*: En citogenética se utiliza el análisis de la metafase para detectar anomalías cromosómicas. Las células se exponen durante un período sensible del ciclo celular (fase S), y las aberraciones se generan en la primera división mitótica después del tratamiento. Es fundamental que el número de células analizadas sea suficiente, además hay que registrar los resultados por clases específicas de aberraciones. En el momento de interpretar los resultados en cultivos celulares se han observado resultados positivos dudosos con dosis citotóxicas, es por eso que las pruebas deben llevarse a cabo con dosis intermedias y ampliarse hasta una dosis con la que se observe cierto grado de citotoxicidad. Las pruebas *in vivo* consisten en

exponer a los animales íntegros y posteriormente disponer de un tejido, a partir de cual se prepara un gran número de células para su análisis (Klassen y Watkins, 2005).

*Intercambio de Cromátidas Hermanas:* Se observan intercambios de segmentos aparentemente recíprocos entre las dos cromátidas de un cromosoma, secundarios a errores en la replicación, mediante la tinción diferencial que es característica de esta prueba. Requiere de al menos dos procesos de síntesis y división celular después del tratamiento. Sirve como indicador general de las exposiciones a mutágenos y detecta agentes clastógenos y citotóxicos (Hernández, 1999).

*Micronúcleos:* Son cuerpos de cromatina y representan fragmentos acéntricos de cromosomas, o cromosomas enteros, que no se incorporaron al núcleo en la mitosis. Se emplean como indicadores de agentes clastógenos y citotoxicidad, aunque estos también requieren al menos una fase de división celular después de la exposición al agente en estudio. (Márquez, 1997).

*Ames:* Prueba *in vitro* para mutagenicidad que usa cepas de mutantes de la bacteria *Salmonella typhimurium*, que no puede crecer en un medio con deficiencia de histidina: los agentes positivos causan mutaciones que facilitan el crecimiento de la bacteria en el medio. La prueba se puede realizar en presencia de una fracción microsómica (S-9) de hígado de ratas para permitir la transformación metabólica de precursores mutágenos a derivados activos (Ames Test).

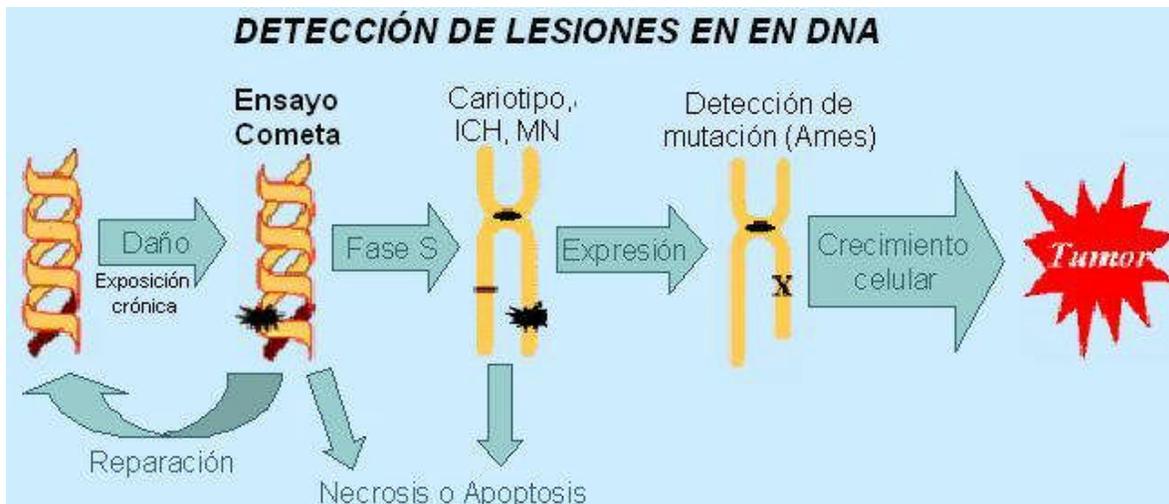


Figura 6. El daño al DNA puede ser detectado de diferente manera según la prueba utilizada (modificado de The Comet Assay Interest Group)

*Ensayo Cometa* (o Electroforesis Celular en Gel): Como se puede observar en la figura 6 esta prueba nos permite la detección de daño directo al DNA, sin necesidad de la fase de replicación ni expresión del DNA. Siendo el medio de análisis en la presente investigación se analizará con más detalle en el siguiente apartado.

## 6.2. *Electroforesis unicelular en gel*

Klassen y Watkins en su libro fundamentos de Toxicología (2005) clasifica este ensayo dentro de las pruebas de daño y reparación del DNA como una prueba de detección directa del daño al DNA.

El ensayo de electroforesis unicelular en gel es una técnica en la que se determina el grado de daño al DNA en células individuales, además permite el seguimiento de reparación del DNA o el monitoreo de poblaciones expuestas a agentes mutágenos, por tanto se utiliza para cuantificar la genotoxicidad de diversos compuestos con un mecanismo clastogénico tales como inductores de daño oxidativo, radiaciones, y agentes alquilantes entre otros (Hartmann y cols., 1999. Tice y cols., 2000. The Comet Assay Interest Group)

### *Antecedentes*

El ensayo de electroforesis unicelular en gel fue introducido por Ostling y Johanson en 1984, en su técnica trabajaron con células embebidas en agarosa, estas células eran lisadas por acción de detergentes y concentraciones elevadas de sal, posteriormente corrían la electroforesis en condiciones neutras (Tice, 2000). Después de la tinción con naranja de acridina la imagen obtenida al microscopio de fluorescencia se asemejaba a un cometa con una cabeza y cauda bien definidas cuando se trataban previamente con radiaciones gamma, por lo que se le denominó Ensayo Cometa (figura 7) En 1976 P. Cook y cols. adicionaron detergentes no iónicos a la solución de lisis. Bajo estas condiciones se detectaban rupturas de cadena doble en el DNA (Comet Assay Forum).

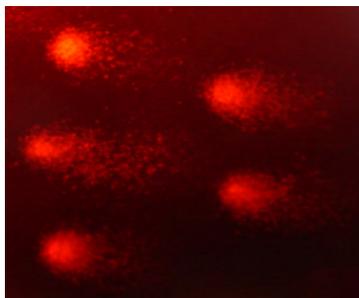


Figura 7. Los núcleos de células dañadas se observan semejantes a cometas después de la electroforesis

En 1988 Singh y cols introdujeron a la técnica la electroforesis alcalina ( $\text{pH}>13$ ), en estas condiciones se incrementó la migración permitiendo la detección de rupturas de cadena sencilla (SSB), y sitios álcali lábiles (ALS) con alta sensibilidad en células individuales. Desde entonces el número de aplicaciones y de investigadores que usan esta técnica ha crecido exponencialmente. (Tice 2000, Comet Assay Forum)

### **Tipo de daño detectado**

El ensayo de electroforesis unicelular en gel es altamente sensible para detectar rupturas de cadena doble (DSB), de cadena sencilla (SSB), Sitios álcali lábiles (ALS) y sitios incompletos de reparación por escisión, sin embargo la migración se ve reducida por agentes que provocan entrecruzamientos o aductos de DNA. (Tice 2000 Comet Assay Forum)

### **Mecanismo de formación del cometa**

Las células embebidas en el gel de agarosa y colocadas en portaobjetos, son lisadas para remover las proteínas y restos celulares, subsecuentemente se colocan en solución alcalina cuya función es desenrollar la doble hélice del DNA lo que contribuye a la expresión de sitios álcali lábiles y rupturas en la cadena del DNA. Posteriormente se realiza la electroforesis durante la cual la cromatina relajada y los fragmentos rotos de DNA debido a la carga negativa que presentan migran hacia el ánodo de manera más rápida que el núcleo (The Comet Assay Interest Group). Así se pueden distinguir dos principios básicos de la formación del cometa:

1. La migración del DNA está en función del número y tamaño de los fragmentos libres de DNA.
2. El incremento en el largo de la cauda depende de las condiciones de electroforesis, y no del tamaño de los fragmentos (Tice 2000, Moller 2005)

### **Ventajas**

- Técnica cuantitativa, muy sensible en la detección de daño al DNA
- Permite el seguimiento de daño y reparación del DNA
- Aplicable a la mayoría de células eucariotas o procariotas, en estudios *in vivo* o *in vitro*
- No requiere células en proliferación celular como las técnicas de MN o ICH
- No requiere una gran cantidad de células (muestras de 5-10 $\mu\text{l}$ )
- Solo se realizan determinaciones en 50-100 células por individuo.
- Se pueden obtener resultados en pocas horas comparado con otras técnicas.
- Es una técnica no invasiva si se utiliza en estudios de biomonitorio en seres humanos
- Detecta SSB's, DSB's y ALS en nucleoides individuales.

### Aplicaciones

En los últimos años, las aplicaciones del ensayo cometa han ido en aumento en diferentes áreas, solo se mencionan algunas (Tice, 2000. Comet Assay Forum):

- ✿ Toxicología genética: evaluación de xenobióticos *in vivo* o *in vitro*
- ✿ Detección de daño y reparación de DNA
- ✿ Eco-Toxicología
- ✿ Nutrición
- ✿ Biomonitorio de genotoxicidad en seres humanos expuestos
- ✿ Epidemiología humana; banco de sangre, banco de esperma.
- ✿ Monitoreo en radio y quimio-terapia en pacientes con cáncer

### Evaluación de daño y parámetros.

La evaluación se realiza con ayuda de un microscopio de fluorescencia. Existen dos principales formas de evaluación de daño para esta técnica.

1. La primera consiste en realizar evaluaciones visuales; tales como la determinación de la longitud de la cauda y el ancho del nucleoide utilizando un micrómetro adaptado al ocular del microscopio, y/o la clasificación en 5 categorías de daño que dependen de la migración observada (figura 8) (Tice, 2000. Comet Assay Forum).

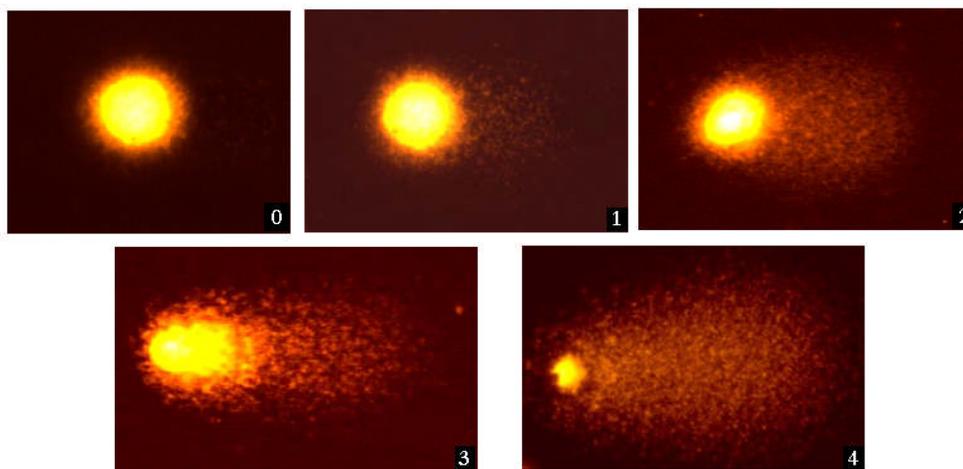


Figura 8. Clasificación en categorías de los cometas.

2. Si se cuenta con analizador de imágenes es posible la determinación de diversos parámetros como intensidad y área total; largo de la cauda, largo del cometa, y tamaño de la cabeza, así como porcentaje de DNA en la cauda, Momentum de la cauda y Momentum de la

cauda de Olive (Miyamae 1998, Tice 2000, etc.). Los cometas son detectados automáticamente, para cada uno se determina la intensidad de la fluorescencia en la cabeza y la cauda; con esto calcula los diferentes parámetros antes mencionados. Por lo tanto se puede realizar el análisis de los cometas y de los datos de una manera más rápida y confiable. (Comet Imager 1.2 Metasistem 2007<sup>®</sup>)

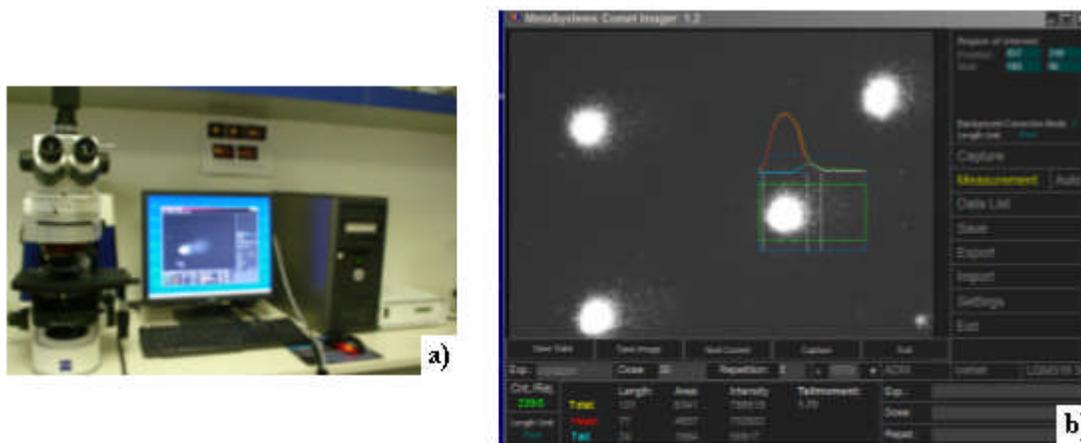


Figura 9. a) Microscopio de fluorescencia con analizador de imagen, b) imagen obtenida con el analizador Comet Imager 1.2 Metasistem 2007

### 6.3. *Metilmetano-sulfonato como control positivo en pruebas de genotoxicidad.*

El metilmetano-sulfonato (metil éster del ácido metilsulfónico) es un líquido incoloro con un peso molecular de 110.3 y una densidad de 1.3 (The Merck Index, 1989).

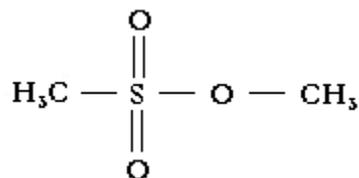


Figura 10. Estructura del metilmetano-sulfonato

El MMS es un agente alquilante monofuncional, que actúa, como todos los agentes alquilantes, por sustitución de un grupo alquilo por iones hidrógeno. Su blanco principal son los ácidos nucleicos, la alquilación interfiere con la síntesis normal de DNA y su función creando sitiosapurínicos, lo que lleva a la escisión y entrecruzamiento en la cadena de DNA mismo que puede resultar en mutagénesis y carcinogénesis. (Márquez, 1997)

El MMS actúa donando un grupo metilo en la posición O<sup>6</sup> de la Guanina y la posición O<sup>4</sup> de la timina, alterando el patrón de apareamiento provocando transiciones(figura 11).

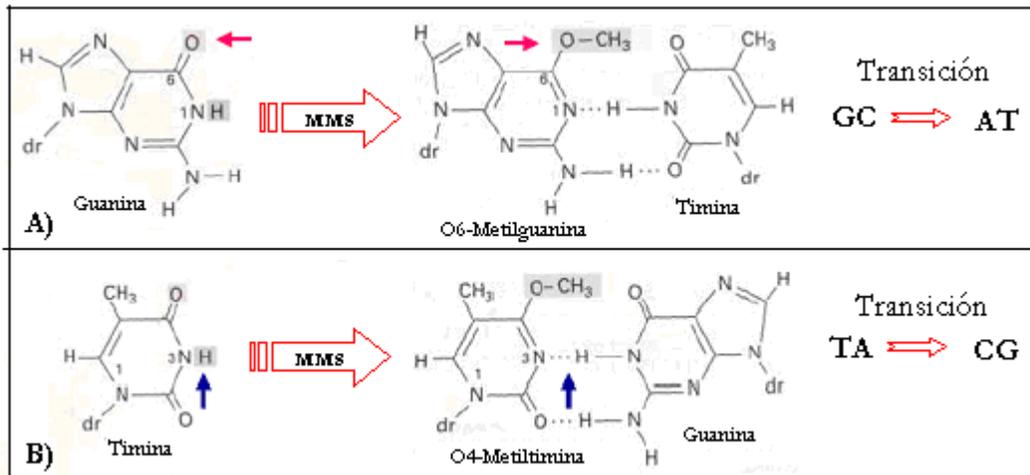


Figura 11. Mecanismo de acción del Metilmetanosulfonato; A) introduce un metilo en la guanina que ya no se apareja con la citosina provocando la transición GC - AT. B) introduce metilo en la timina que ya no se apareja con la adenina provocando la transición TA - CG.

Como no requiere activación metabólica se considera como mutágeno y carcinógeno de acción directa. Se usa únicamente en investigación como control positivo para pruebas de genotoxicidad como micronúcleos, e intercambio de cromátides hermanas (Márquez 1997). Sekihashi y cols. (2001), Tsuda y cols. (2000) han reportado que con el ensayo de electroforesis unicelular en gel *in vivo* administrando Metilmetanosulfonato por vía intraperitoneal y oral a dosis de 80mg/Kg se produce daño en la mayoría de los órganos examinados, excepto estómago, y que el pico máximo de daño cuando se administra por vía intraperitoneal es a las tres horas, mientras que por la vía oral el pico máximo de daño es hasta las 8 horas.

### III. JUSTIFICACIÓN

Siendo la hipertensión arterial una de las principales causas de muerte en México es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos de producción mexicana con mejor actividad y menores efectos adversos que los ya existentes. En base a esto, en el laboratorio de Química Medicinal de la FES-C se sintetizó un grupo de compuestos morfólinicos y tiomorfólinicos, entre los que destaca el LQM-319 que presenta actividad antihipertensiva *in vivo*; para que este compuesto siga su camino a la comercialización o a su mejoramiento es necesario realizar estudios preclínicos dentro de los que se cuentan: los ensayos de genotoxicidad que permiten la detección del daño al material genético como factor de riesgo de mutagénesis, carcinogénesis y/o teratogénesis.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la capacidad genotóxica de un nuevo tiomorfolínico (LQM-319) con actividad antihipertensiva con el ensayo de electroforesis unicelular *in vivo*, como parte de los estudios preclínicos que permitan llegar a la mejora o comercialización de dicho compuesto.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la dosis letal 50 del LQM-319 y del Captopril por vía intraperitoneal con el método de Lorke y Probit en ratones macho cepa CD1.
- Evaluar la capacidad genotóxica del LQM319 (compuesto de interés), el captopril (reconocido fármaco antihipertensivo) y el MMS (reconocido compuesto genotóxico) mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel en células de corazón, hígado y riñón de ratones macho cepa CD1 a las 3, 8, y 18 horas después de administrarse por vía intraperitoneal.
- Comparar el efecto genotóxico entre el LQM-319 y el Captopril

## V. MATERIAL

### Material biológico:

Ratones macho cepa CD1 de  $25 \pm 2$  g. donados por el bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

### Compuestos a prueba

*Control positivo*; Metilmetanosulfonato (Sigma)

*Comparativo*; Captopril (donado por la Dra. Gabriela Vargas del Lab. de Métodos Analíticos de la FESC)

*Compuesto de interés*; Tiomorfolínico LQM-319 proporcionado y sintetizado por el Dr. Enrique Ángeles y colaboradores.

### Soluciones y reactivos:

Agarosa de bajo punto de fusión (Sigma)

Agarosa de normal punto de fusión (Sigma)

Agua desionizada (Hycl)

Bromuro de etidio (Sigma)

Cloruro de Sodio

Dimetilsulfóxido (Sigma)

EDTA sal disódica (Sigma)

Hidróxido de Sodio

Solución Buffer de Fosfatos (Sigma)

Solución de sales balanceada de Hank's (Sigma)

Triton X-100 (Sigma)

Trizma Base (Sigma)

### Equipos y materiales:

Cámara de electroforesis

Cámara de Neubauer

Microscopio de fluorescencia Imager AI-

Axiomat 10 de Zeiss con el analizador de

imagen Comet Imager 1.2 Metasistem 2007<sup>®</sup>

Microscopio de luz

Potenciómetro

Placas de hielo

Portaobjetos con pantalla

Cubreobjetos largos

Jeringas de 3 ml desechables

Tubos Eppendorf

Micropipetas de 50 y 200 $\mu$ l

Tijeras y pinzas para disección

## VI. METODOLOGIA

### DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50

#### ► MÉTODO DE LORKE

El procedimiento se basa en dos etapas:

A) Primera etapa. Organizar 3 lotes de 3 ratones cada uno.

- ↺ Lote 1. Administrar por vía intraperitoneal la dosis de 10mg/Kg
- ↺ Lote 2. Administrar por vía intraperitoneal la dosis de 100mg/Kg
- ↺ Lote 3. Administrar por vía intraperitoneal la dosis de 1000mg/Kg

Observar el comportamiento de cada lote constantemente durante 6 horas. A las 24 horas registrar la mortalidad; de acuerdo a ésta se prosigue con la siguiente etapa.

B) Segunda etapa. Administrar 4 ratones conforme al siguiente cuadro

DOSIS mg/Kg	1a ETAPA			DOSIS mg/Kg 2ª ETAPA			
	10	100	1000				
Mortalidad en la primera etapa	0/3	0/3	0/3		1600	2900	5000
	0/3	0/3	1/3	600	1000	1600	2900
	0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600
	0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
	0/3	1/3	3/3	50	100	200	400
	0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
	0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
	1/3	3/3	3/3	5	10	20	40
	2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
	3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

Calcular la  $DL_{50}$  mediante una media geométrica sobre las dosis para las cuales se encuentran los resultados de sobrevivencia y mortalidad (0/1 y 1/1).

► **MÉTODO DE PROBIT**

Proponer cuatro dosis en base a las dosis que se obtengan para la segunda etapa del método de Lorke.

Realizar lotes de 10 ratones cepa CD1 para cada dosis, administrar cada compuesto por vía intraperitoneal y registrar la mortalidad en cada grupo, observar por 7 días a los animales. Analizar los datos de mortalidad con el programa Summary Method (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN).

**ENSAYO DE GENOTÓXICIDAD**

► **TRATAMIENTO DE RATONES**

Mantener a los animales con libre acceso de alimento y agua, antes y durante el experimento. Distribuir en 21 lotes de 5 ratones cada uno administrando por vía intraperitoneal cada tratamiento como se muestra en la siguiente tabla:

TRATAMIENTO	DOSIS	TIEMPO
A) Control positivo Metilmetanosulfonato	80mg/Kg.	3hrs
		8hrs
		18hrs
B) Problema LQM 319	3mg/kg	3hrs
		8hrs
		18hrs
	30mg/kg	3hrs
		8hrs
		18hrs
	290mg/kg	3hrs
		8hrs
		18hrs
C) Comparativo Captopril	0.0062mg/kg	3hrs
		8hrs
		18hrs
	305mg/kg	3hrs
		8hrs
		18hrs
D) Control negativo: Cada lote incluir un ratón sin administrar.		

▶ **OBTENCIÓN DE SUSPENSIÓN CELULAR**

A) Transcurrido el tiempo correspondiente para cada lote, sacrificar a los ratones por dislocación cervical.

B) Extraer hígado, corazón y riñón recibiendo los órganos por separado en cajas Petri conteniendo 2 ml de sal de Hank's libre de calcio y magnesio fría.

C) Utilizando tijeras cortar en pedazos muy pequeños cada órgano, aspirar con jeringa el tejido cortado y expulsar usando aguja para disgregar fácilmente y formar una suspensión celular

▶ **VIALBILIDAD CELULAR**

Mezclar 10µl de la suspensión celular con 10µl de azul de Tripán 0.4%, montar en la cámara de Neubauer.

▶ **ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL**

**Preparación de laminillas**

1) Preparar agarosa regular al 1% en vasos de precipitados de 50ml, cuando esté completamente disuelta sumergir el portaobjetos dentro de la agarosa. Sacar el portaobjetos, limpiar el exceso de agarosa en la parte inferior del portaobjetos y colocar sobre placas de hielo hasta su solidificación. Colocar todos los portaobjetos en charolas y meter en la estufa a 37°C durante toda la noche.

NOTA: Los portaobjetos deben prepararse un día antes del sacrificio de los ratones y la obtención de las células. Los siguientes pasos deben llevarse a cabo bajo luz amarilla débil.

2) Fundir agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% y mantener a 37°C.

3) En tubos eppendorff mezclar 75µl de agarosa y 10µl de la suspensión celular.

4) Adicionar la mezcla agarosa-células en un cubreobjetos limpio e inmediatamente colocar el portaobjetos preparado anteriormente de manera que la mezcla se extienda y entre en contacto con la capa de agarosa regular deshidratada. Colocar los portaobjetos sobre una placa de hielo hasta que solidifiquen.

5) Retirar con precaución el cubreobjetos y colocar los portaobjetos dentro de vasos copplin que contienen solución de lisis fría y recientemente preparada. Proteger de la luz y colocar en el refrigerador a 4°C por una hora.

### **Electroforesis**

- 1) Retirar con cuidado los portaobjetos de la solución de lisis y colocar en la cámara de electroforesis.
- 2) Llenar la cámara con el buffer recientemente preparado hasta cubrir los portaobjetos sin formar burbujas, dejar en estas condiciones por 30 minutos (unwinding)
- 3) Realizar el corrimiento electroforético a 25 volts y 300 mA durante 20 minutos.
- 4) Transcurrido el tiempo, retirar lentamente los portaobjetos de la cámara y gotear hasta cubrir con buffer de neutralización, dejarlos por 5 minutos, decantar y repetir al menos dos veces.
- 5) Escurrir perfectamente los portaobjetos y sumergir en metanol por 5 minutos, pasado este tiempo retirar del metanol y secar al aire. Bajo este procedimiento no es necesario guardar en cámara húmeda.

### **Tinción de preparaciones**

Adicionar 50  $\mu$ l de colorante bromuro de etidio 1X a la laminilla y montar con un cubreobjetos. Secar el exceso antes de examinar al microscopio de fluorescencia

### **Evaluación del daño al DNA**

Con ayuda del microscopio de fluorescencia Imager AI Axiomat 10 de Zeiss con analizador de imágenes del programa Comet Imager versión 2.1 determinar el momentum de la cauda en 50 células para cada ratón de todos los tratamientos, recopilar los datos en archivos de Excel, determinar el promedio de cada uno de los cinco ratones por tratamiento y realizar el análisis estadístico con el programa INSTAT2 Versión 2.03

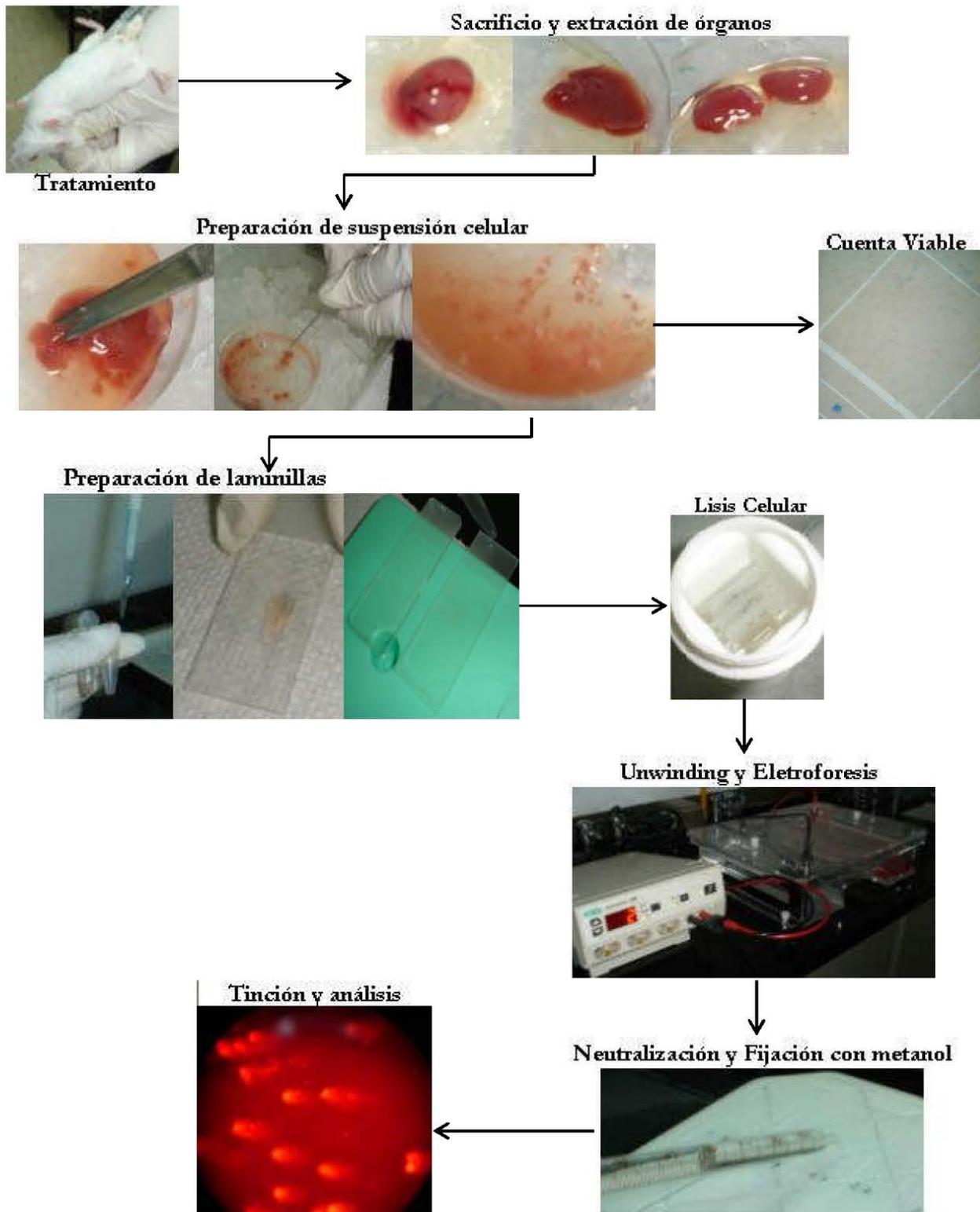


Figura 12. Diagrama de Flujo: Ensayo de Electroforesis Unicelular en Gel.

## VII. RESULTADOS

### DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50

Los resultados obtenidos en la determinación de la  $DL_{50}$  por vía intraperitoneal mediante el método de Lorke para el LQM 319 y Captopril fueron de 471.17mg/Kg para ambos. Dado que este método solo proporciona una aproximación de la  $DL_{50}$  se hizo necesaria la prueba de Probit donde se obtuvieron los siguientes resultados:

	Dosis mg/Kg	Límite Superior	Límite Inferior
LQM 319	352.27	282.85	427.91
Captopril	371.32	313.3	424.45

A partir de estos resultados se determinaron las dosis más altas utilizadas en este estudio.

### VIABILIDAD CELULAR

La evaluación de la citotoxicidad se llevó a cabo por medio de la tinción de azul de tripán para asegurar que el efecto al DNA solo fue producido por su correspondiente tratamiento.

Tabla 4. Porcentaje de viabilidad mediante la prueba de Azul de Tripán

Tratamiento	HÍGADO			CORAZÓN			RIÑÓN		
	3 hrs	8 hrs	18hrs	3 hrs	8 hrs	18hrs	3 hrs	8 hrs	18hrs
Negativo	99.6	99.6	99.6	99.8	99.8	99.8	99.0	99.0	99.0
MMS 80mg/Kg	99.6	98.3	99.8	99.8	98.8	99.1	99	95.9	98.7
LQM 319 3mg/Kg	99.8	99.4	98.5	99.6	99.6	98.5	98.1	98.1	98.6
LQM 319 30mg/Kg	97.9	100	99.8	96.0	99.5	99.3	94.4	99.3	98.6
LQM 319 290mg/Kg	100	98.2	100	100	99.8	99.5	99.0	99.4	99.0
Captopril 0.00062mg/Kg	99.2	99.8	99.5	98.9	98.9	99.2	97.9	99.2	98.9
Captopril 305mg/Kg	99.1	99.7	99.5	99.1	99.6	99.2	99.4	99.2	98.9

## ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL

A continuación se presentan las figuras 12 y 13 que muestran el tipo de nucleoides encontrados en los diferentes órganos evaluados para la genotoxicidad del LQM319

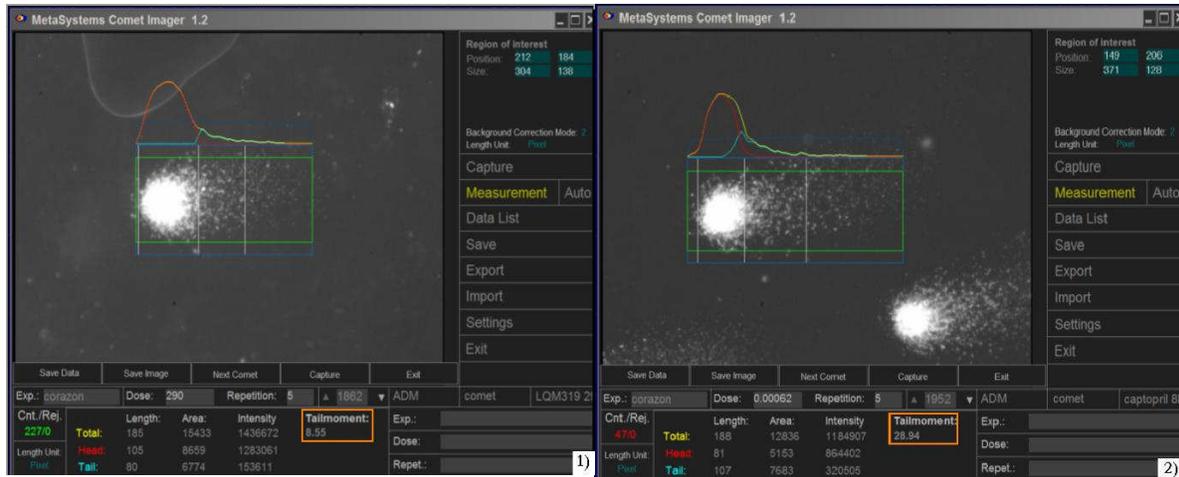


Figura 13. Momentum de la cauda obtenido para cada cometa puede no ser proporcional al largo de la cauda: Ambos cometas parecen tener caudas de tamaño similar pero el momentum de la cauda de 1) es más pequeño que el de 2)

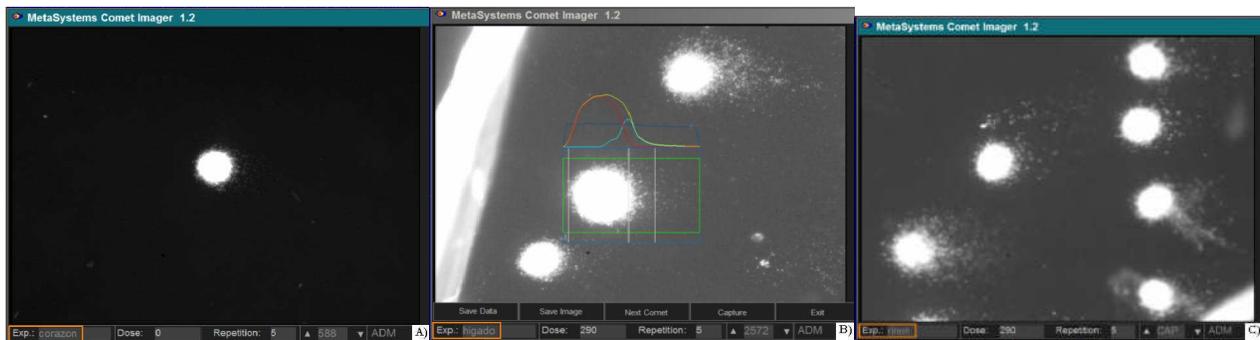


Figura 14. Nucleoides según su órgano de procedencia. A) corazón: nucleoide pequeño, B) hígado: por lo menos tres tamaños diferentes, C) riñón: varios nucleoides por campo, mismo tamaño.

La tabla 5 muestra en su totalidad el resultado del momentum de la cauda, promedio de 5 ratones, por cada tratamiento en los 3 horarios y los 3 órganos estudiados.

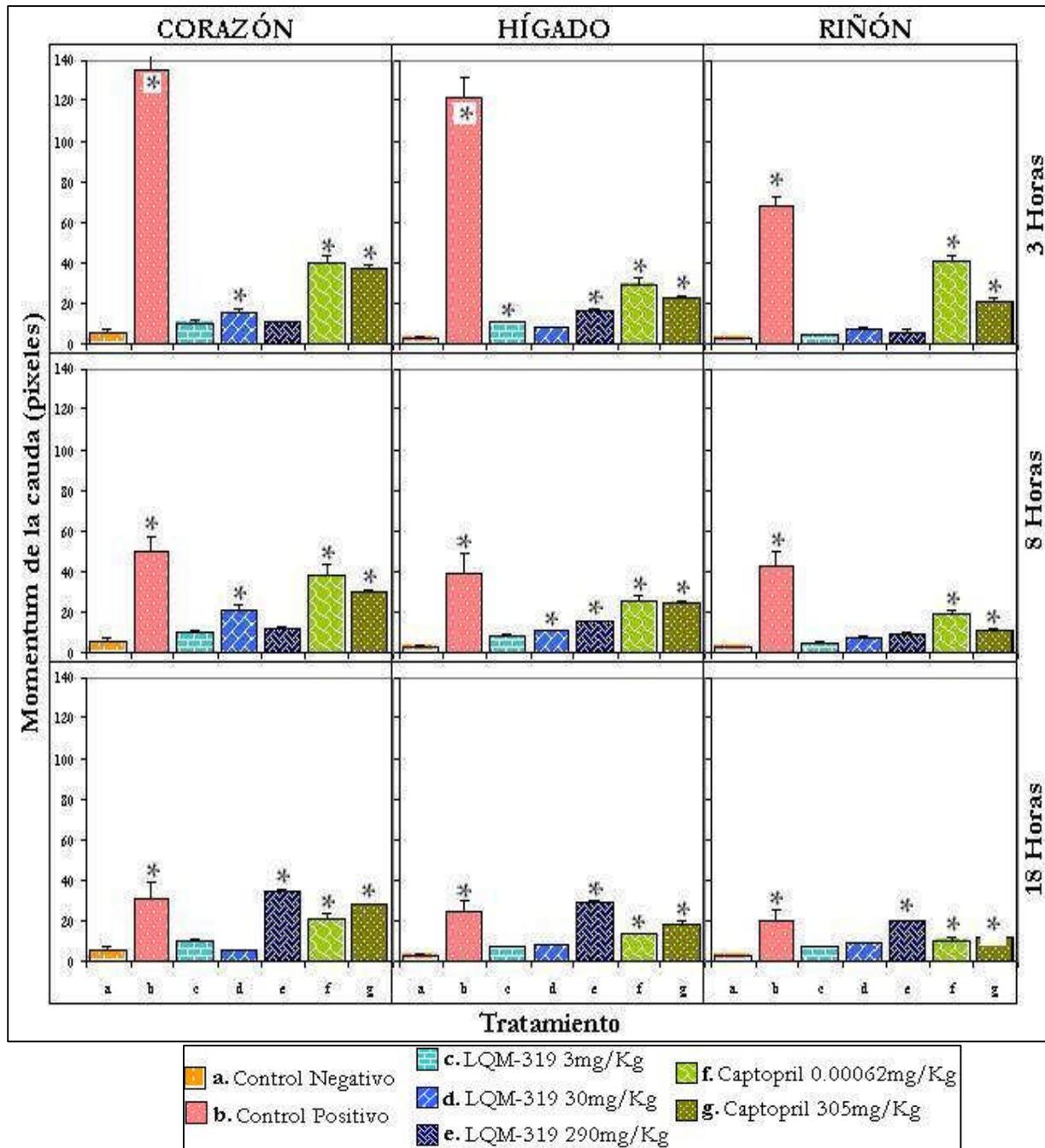
Tabla 5. Resultados de los promedios del momentum de la cauda obtenidos, así como su correspondiente desviación estándar

Tratamiento	Dosis mg/Kg	CORAZÓN		HÍGADO		RIÑÓN	
		Promedio	DesvEst	Promedio	DesvEst	Promedio	DesvEst
<b>3 HORAS</b>							
Negativo	0	5.5787	2.2113	2.7827	1.0188	2.9215	0.3477
Positivo MMS	80	135.3282	10.7635	121.9264	9.7446	67.8598	4.924
LQM 319	3	10.8232	1.1253	11.6058	0.1634	4.494	0.0372
LQM 319	30	16.1918	1.0273	8.4736	0.1629	7.4319	0.6164
LQM 319	290	11.1577	0.6329	16.7846	0.8826	6.3075	0.9295
Captopril	6.2x10 <sup>-4</sup>	40.2677	3.3857	29.3769	3.5093	41.1211	3.2644
Captopril	305	36.9122	2.8814	22.5708	0.8242	21.5913	1.1878
<b>8 HORAS</b>							
Negativo	0	5.5787	2.2113	2.7827	1.0188	2.9215	0.3477
Positivo MMS	80	50.4727	6.6149	39.7168	9.0956	42.2753	8.2462
LQM 319	3	10.2391	0.6699	8.2636	0.5212	4.5053	0.9766
LQM 319	30	21.3823	2.1614	11.1257	0.6382	7.9339	0.6705
LQM 319	290	11.9466	1.1494	15.6355	0.1235	9.2138	0.3618
Captopril	6.2x10 <sup>-4</sup>	38.2623	5.6473	26.2126	1.8521	19.1086	2.0161
Captopril	305	30.5698	0.7735	25.1344	1.0238	11.6396	0.8751
<b>18 HORAS</b>							
Negativo	0	5.5787	2.2113	2.7827	1.0188	2.9215	0.3477
Positivo MMS	80	31.5426	7.4204	24.8406	5.311	20.2825	5.7991
LQM 319	3	10.1487	0.3688	7.4321	0.1536	7.5041	0.1176
LQM 319	30	5.6628	0.4626	8.2053	0.0693	8.9737	0.1222
LQM 319	290	34.3198	1.2991	28.9512	1.8405	19.6073	1.0545
Captopril	6.2x10 <sup>-4</sup>	21.4951	2.2822	13.5667	0.485	10.6597	1.8615
Captopril	305	27.8626	0.0919	18.2587	1.6156	12.1134	0.781

Además se han graficado los datos (gráfica 1) de lo que ha continuación se describe:

El lote de metilmetano-sulfonato presentó diferencias estadísticamente significativas en comparación con el negativo en todos los órganos y tiempos.

El LQM 319 en la dosis de 3mg/Kg tanto en corazón como en riñón no incrementó de manera estadísticamente significativa el momentum de la cauda en ninguno de los tres horarios evaluados con respecto al control negativo. Sin embargo en hígado se manifestó un daño significativo solo a las tres horas.



**Gráfica 1.** Resultados grupales: distribución de la frecuencia del efecto sobre el DNA en corazón, hígado y riñón, expresado como Momentum de la cauda. \* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo (ANOVA, Tuckey-Kramer 0.05)

Para la dosis de 30mg/Kg en riñón no hay diferencias estadísticas con el control negativo, para corazón el daño es significativo a las 3 horas, aumenta a las 8 horas pero a las 18 horas ya no hay diferencia significativa. Bajo la misma dosis en hígado solo hay diferencia significativa a las 8 horas.

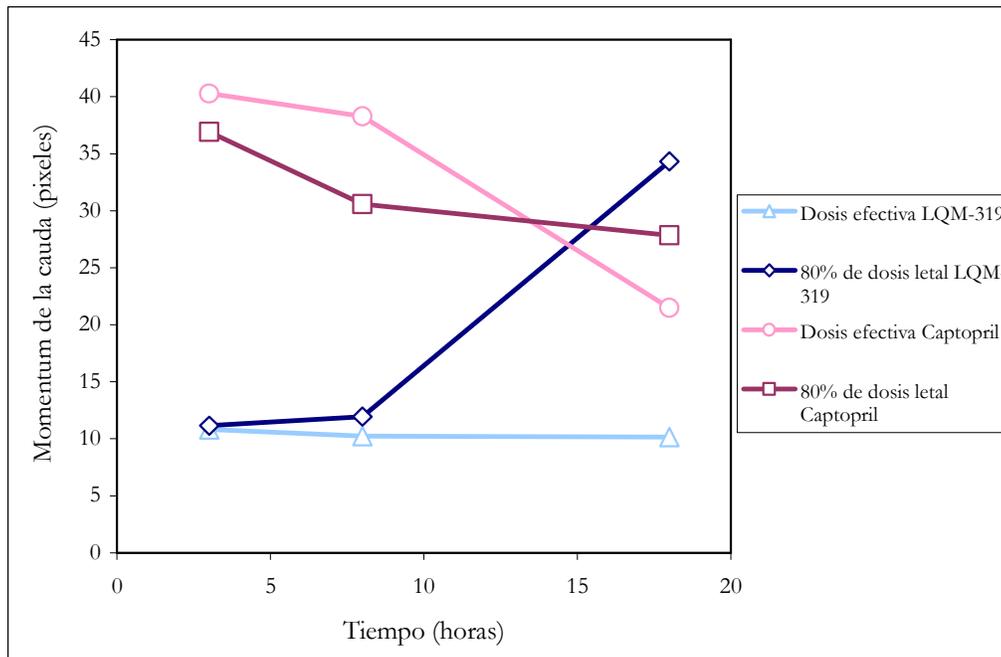
Con la dosis de 290mg/Kg en corazón y riñón solo hay diferencias significativas a las 18 horas, mientras que para hígado hay diferencias significativas contra el negativo en todos los horarios.

En el caso de Captopril existen diferencias significativas en todos los órganos, con ambas dosis y en los tres horarios, presentando tendencia a disminuir el Momentum de la cauda a mayor tiempo de muestreo.

Se realizaron también tablas (6, 7 y 8) y gráficas (2, 3 y 4) que permiten apreciar las diferencias que existieron entre la genotoxicidad (en función del Momentum de la cauda) del captopril y el compuesto LQM319 en relación a sus dosis efectiva y  $DI_{50}$ .

**Tabla 6. Comparación entre LQM 319 y Captopril para corazón en las dosis efectiva y 80% de la dosis letal 50.**

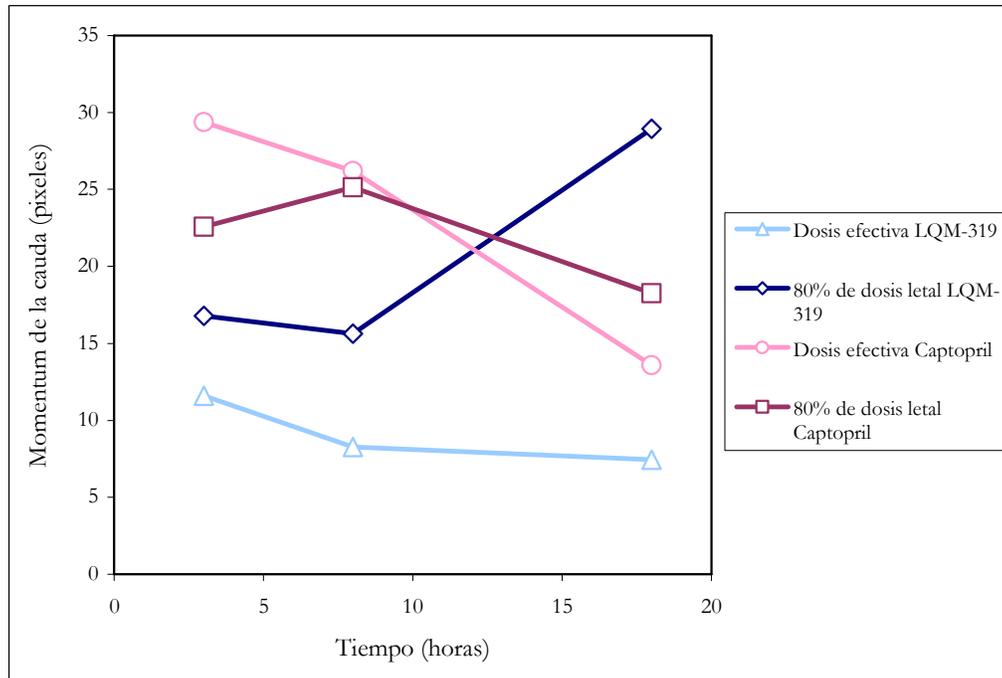
Tratamiento	Momentum de la cauda		
	Tiempo (horas)		
	3	8	18
Dosis efectiva LQM 319	10.8232	10.2391	10.1487
80% de dosis letal LQM 319	11.1577	11.9466	34.3198
Dosis efectiva Captopril	40.2677	38.2623	21.4951
80% de dosis letal Captopril	36.9122	30.5698	27.8626



**Gráfica 2. Comparación del efecto genotóxico producido sobre corazón por el compuesto LQM 319 contra Captopril**

Tabla 7. Comparación entre el LQM 319 y Captopril para hígado en la dosis efectiva y 80% de la dosis letal 50

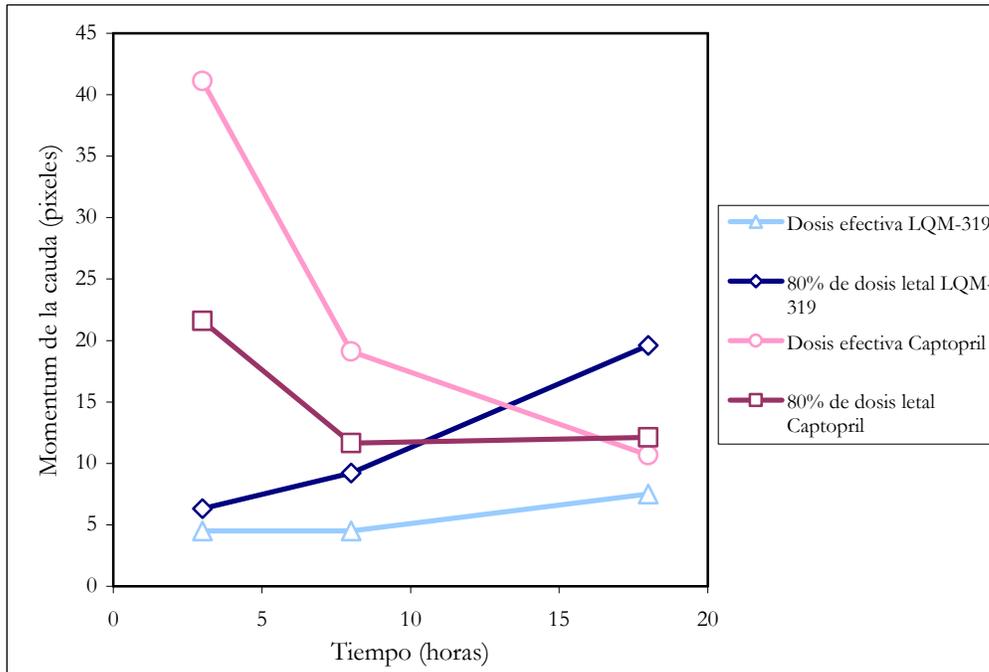
Tratamiento	Momentum de la cauda		
	Tiempo (horas)		
	3	8	18
Dosis efectiva LQM 319	11.6058	8.2636	7.4321
80% de dosis letal LQM 319	16.7846	15.6355	28.9512
Dosis efectiva Captopril	29.3769	26.2126	13.5667
80% de dosis letal Captopril	22.5708	25.1344	18.2587



Gráfica 3. Comparación del efecto genotóxico sobre hígado producido por el compuesto LQM 319 contra Captopril

Tabla 8. Comparación entre LQM 319 y Captopril para riñón en la dosis efectiva y 80% de la dosis letal 50.

Tratamiento	Momentum de la cauda		
	Tiempo (horas)		
	3	8	18
Dosis efectiva LQM 319	4.494	4.5053	7.5041
80% de dosis letal LQM 319	6.3075	9.2138	19.6073
Dosis efectiva Captopril	41.1211	19.1086	10.6597
80% de dosis letal Captopril	21.5913	11.6396	12.1134



Gráfica 4 Comparación por dosis del efecto genotóxico sobre riñón producido por el compuesto LQM 319 contra Captopril

## VIII. DISCUSIÓN

Desde que Martínez y colaboradores en 2007 comprobaron en un modelo animal que el compuesto LQM 319 tenía capacidad antiarrítmica y antihipertensiva, se ha procedido a realizar los estudios de toxicidad aguda y genotoxicidad que forman parte de los estudios preclínicos que todo nuevo compuesto debe cumplir para su conversión a un fármaco efectivo y seguro.

En un primer paso, fue necesario determinar la  $DL_{50}$  del LQM 319 ya que este parámetro nos permite establecer que tan tóxico es un compuesto para el organismo de prueba, (Bondani, 1982) que en el caso de esta investigación fue un roedor como lo indican los protocolos de investigación preclínica. Al obtener la  $DL_{50}$  se cuenta con un valor de comparación que puede someterse a consideración contra otros compuestos estructuralmente relacionados o no, entre ellos. Se quizó comparar la toxicidad de nuestro nuevo compuesto contra el Captopril ya que es un fármaco mundialmente empleado para la farmacoterapia antihipertensiva, aunque estructuralmente es diferente al LQM 319. No obstante nos enfrentamos a que en la literatura sobre Captopril solamente se encuentra la cita de Imai, Kiyoshi y colaboradores de 1981 que reporta la  $DL_{50}$  en ratones cepa ICR de 3154mg/Kg en machos y 3225mg/Kg en hembras, como solo se encuentra el resumen disponible, y no el artículo completo, además de carecer del debido sustento y al no encontrar datos más recientes se procedió a la determinación de la misma en la especie animal y bajo las condiciones utilizadas en este estudio. Para sorpresa nuestra la  $DL_{50}$  por el método de Lorke fue similar a la que nosotros determinamos para nuestro compuesto, esto es de 471.17mg/Kg, por lo que quisimos mejorar la precisión de la determinación realizándola a los 2 compuestos por el método de Probit, el cual, por utilizar un mayor número de animales y un método estadístico más estricto, nos proporcionó para Captopril una  $DL_{50}$  de 371.32mg/Kg que es ligeramente más alta a la correspondiente del LQM 319 que es 352.27mg/Kg. Estos valores fueron muy importantes para nuestro siguiente paso que fue el estudio de genotoxicidad, ya que sirvieron para establecer las dosis que fueron utilizadas en esta evaluación. No hemos encontrado una explicación para la discrepancia en los valores de  $DL_{50}$  de Captopril, ya que nuestro producto es puro y no lleva excipientes (suponemos que el utilizado por Imai y cols. también), no contiene impurezas (lo que fue verificado por personal del laboratorio de Química Medicinal), la vía de administración fue intraperitoneal y los sujetos de experimentación fueron igualmente ratones, que aunque de otra cepa, no se esperaba que existiera una diferencia tan grande en la  $DL_{50}$

Los resultados de la  $DL_{50}$  que nosotros obtuvimos para ambos compuestos caen dentro del rango de moderadamente tóxicos en la clasificación de la OMS (Beraud, 1990), por lo que hasta aquí no podemos indicar ninguna ventaja por parte de LQM 319.

Hay que tener en cuenta que las medidas de letalidad aguda tal como la  $DL_{50}$  pueden no reflejar con exactitud el espectro completo de la toxicidad o riesgo asociado a la exposición de un producto químico. Así algunas sustancias cuya toxicidad aguda es baja o moderada pueden, a dosis que no provocan signo alguno de toxicidad aguda, actuar como carcinógenos o teratógenos. Rocha recientemente determinó el efecto genotóxico del LQM 319 con la prueba de micronúcleos *in vivo*, los resultados muestran que no tiene actividad clastogénica, ni citotóxica en relación con el comportamiento del control negativo utilizado en su investigación (Rocha, 2008). Sin embargo en 1997 Morita y colaboradores reportaron que la prueba de MN es relativa para la especificidad de órganos blanco para carcinogénesis, y que en caso de no presentar daño en sistema hematopoyético se desconoce la capacidad de genotoxicidad en otros órganos.

Desde hace algunos años el ensayo de electroforesis unicelular en gel (SCGE) se ha considerado como uno de los más sensibles para detectar daño directo al DNA, sin necesidad de una nueva síntesis de éste, además el estudio no se limita a un solo órgano o tejido, por el contrario puede aplicarse en prácticamente todos los órganos. Ahora bien, se prefieren los ensayos *in vivo*, ya que usando un organismo completo se reproducen los procesos de farmacodinamia y farmacocinética evaluando la toxicidad de la sustancia química así como de sus posibles metabolitos.

Utilizamos los siguientes criterios para decidir que los órganos a evaluar serían hígado, corazón y riñón:

Corazón: Para que la sangre llegue a las células de diferentes tejidos y distribuya “materiales” como nutrientes, oxígeno, o compuestos como fármacos o tóxicos, debe ser impulsada constantemente por acción del corazón (Tortora y Grabowski, 2006). Así cualquier xenobiótico que llega a circulación sanguínea pasa por el corazón.

Hígado: Debido a su capacidad metabólica y su posición anatómica, desempeña tales funciones que le hace ocupar un lugar importante en el ámbito de los procesos toxicológicos que pueden afectar a un organismo (Bello, 2001), bien por activación de metabolitos, desactivación del agente tóxico o por procesos de hepatotoxicidad.

Riñón: Sus características anatómicas y fisiológicas le proporcionan especial susceptibilidad frente a los efectos tóxicos de un agente, recibe el 20-25% del gasto cardíaco por lo que cualquier agente presente en la circulación sistémica puede llegar al riñón en cantidades importantes (Bello,

2001) y es la principal vía de excreción de compuestos solubles. Además junto con corazón forman parte del sitio de acción para diversos antihipertensivos.

Las dosis elegidas para el ensayo comprendieron para ambos compuestos sus dosis efectivas y el 80% de la  $DL_{50}$ , además para LQM 319 se ensayó una dosis más que comprendió 10 veces la dosis efectiva. Estos valores están de acuerdo a los protocolos que se siguen por grupos toxicológicos como el International Programme on Chemical Safety (IPCS).

En el ensayo de SCGE (Cometa) debe tenerse cuidado de no sobreexponer al órgano a daño tóxico ya sea por los compuestos de prueba o por el manipuleo al momento de obtener el tejido y convertirlo en una suspensión celular, ya que por estas acciones podríamos dañar al DNA de las células y obtener falsos positivos, Tice y colaboradores en el 2000 reportan que aunque no se han realizado estudios de validación para determinar los niveles aceptables para la citotoxicidad *in vivo* se considera que viabilidades por debajo del 70-80% son indicativas de un tratamiento excesivo del órgano. Otros autores (Brendler-Schwaab y cols., 2005) sugieren realizar estudios histológicos para descartar completamente citotoxicidad o necrosis del órgano a prueba. Para vigilar que éste no sea el caso, en nuestro ensayo se determinó la viabilidad celular y como se puede observar en la tabla 4 no se tienen viabilidades por debajo del 94%, lo cual es indicativo del poco o nulo daño causado por la técnica.

Los resultados obtenidos del daño al DNA en la presente investigación con el ensayo de SCGE mostraron que este efecto dependió de la sustancia a prueba, el tiempo de exposición, el órgano analizado y la dosis empleada, por lo que se irá discutiendo cada uno de los hallazgos. Para determinar el grado de daño al DNA se utilizó un analizador de imagen con el programa Comet Imager 1.2; como puede observarse en la figura 13, es común encontrar cometas con caudas cortas pero muy densas y cometas con caudas largas pero con fragmentos de ADN muy dispersos (Lee y cols., 2004. Olive y Banath, 2006), por lo que se determinó en 50 núcleos por órgano y por animal el momentum de la cauda (tail moment) que es un parámetro definido como el producto del porcentaje de DNA en la cauda multiplicado por el largo de ésta (Olive y cols., 1991) y que en función del programa se determina en píxeles.

El tipo de nucleoides evaluado dependió del tipo de órgano, por ejemplo; para hígado se midieron solo los núcleos más grandes (>95 píxeles) debido a que los núcleos de los hepatocitos son de gran tamaño. En el caso de corazón y riñón se midieron todos indiferentemente, ya que al tratarse de núcleos sin diferencia de tamaño era imposible detectar alguno no perteneciente al tipo requerido,

sin embargo como se muestra en la figura 14 cada órgano presenta una conformación y morfología de núcleos característica.

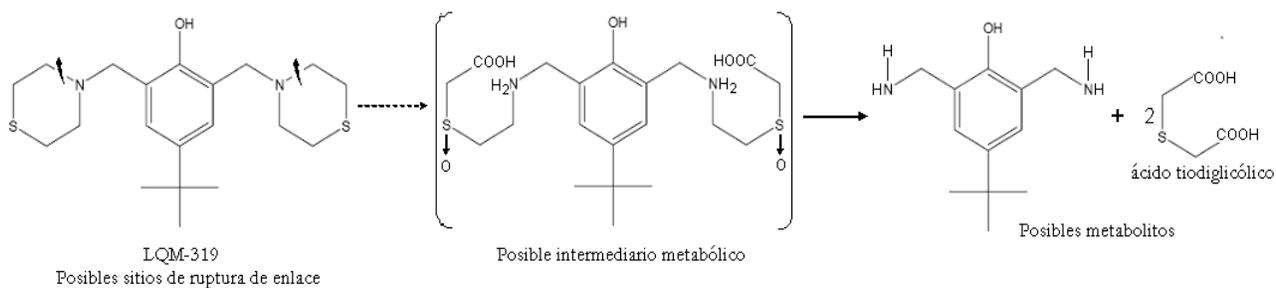
El MMS se uso como control positivo debido a que en varios estudios se ha demostrado que produce migración del DNA en células de distintos órganos, además como se trata de un agente alquilante actúa directamente sobre el DNA. En 1998 se reportó una evaluación de la técnica de SCGE sobre diversos órganos que fue realizada por cinco laboratorios, en donde se utilizaba al MMS; se encontró que en hígado y riñón, entre otros tejidos, el mayor efecto genotóxico se presentaba a las tres horas (Miyamae y cols., 1998). Independientemente Tsuda en el año 2000 y Sekihashi en el 2001, llegaron a conclusiones similares sobre el MMS. Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron que el pico máximo del efecto genotóxico también se encontró a las tres horas en los diferentes órganos, como se puede observar en la gráfica 1, estos resultados junto con los del control negativo, indican la reproducibilidad y confiabilidad de los obtenidos en la presente investigación. Los datos que muestran incremento en el momento de la cauda manifiestan la inducción de genotoxicidad en el tejido blanco *in vivo*, mientras que valores pequeños de este parámetro son negativos, es decir que la sustancia a prueba no es genotóxica. En este ensayo los resultados para el control negativo son pequeños de tal forma que solo reflejan el daño producido por la manipulación de los órganos debido al procedimiento.

Para el compuesto LQM 319 los resultados obtenidos muestran que a dosis de 3mg/Kg tanto en corazón como en riñón no se produjo efecto genotóxico en ninguno de los tres horarios y en hígado se presentó un incremento pequeño solo a las 8 horas. Cabe destacar que el comportamiento del compuesto no muestra una tendencia específica con las tres dosis.

Para la dosis de 30mg/Kg se presenta daño al DNA en corazón a las 3 y 8 horas, en hígado solo a las 8 horas y en riñón no hay efecto.

La dosis de 290mg/Kg produce genotoxicidad en riñón y corazón solo a las 18 horas, pero en el caso de hígado es genotóxica en los tres horarios, incluso a las 18 horas el daño al DNA se incrementa casi al doble en comparación con los horarios anteriores, además como se puede observar en la gráfica 1 el efecto presentado por esta dosis a las 18 horas en los tres órganos es estadísticamente igual al efecto genotóxico del control positivo en el mismo horario y correspondientemente para cada órgano, sin embargo el órgano que presenta mayor genotoxicidad es corazón, aunque es importante destacar que solo la dosis de 290mg/Kg que corresponde al 82% de la  $DL_{50}$  produce genotoxicidad comparable con el control positivo y es poco probable que se utilice con fines terapéuticos.

El comportamiento característico de dicho compuesto podría explicarse tal vez basándose en la investigación de Combourieu y cols. realizada en el año 2000, quienes propusieron los posibles metabolitos de la tiomorfolina (morfolina y piperidina) producidos por acción del citocromo P-450 de *Mycobacterium aurum* MO1 al incubarla en presencia de tiomorfolina, ellos sugieren que el primer paso de la degradación de la tiomorfolina es la ruptura del enlace C-N, produciendo un aminoácido intermediario en donde el átomo de azufre se oxida a sulfóxido, lo que lleva a una desaminación con la consecuente apertura del anillo y la formación del ácido tiodiglicólico. El posible mecanismo de biotransformación para el compuesto ditiomorfolínico LQM 319 sería el siguiente: (Rocha, 2008)



Visarius y cols. en 1997 demostraron que el ácido tiodiglicólico inhibe la función mitocondrial al interferir en la oxidación de ácidos grasos de cadena larga *in vivo* e *in vitro*, y que se elimina por vías urinarias. De ser cierto que el metabolismo del LQM 319 conduce a la formación de ácido tiodiglicólico se provocaría estrés oxidativo en las células de los órganos evaluados; en mayor proporción para hígado y corazón mientras que para riñón sería menor, lo que coincide con la tendencia de los resultados obtenidos, esta propuesta trata de explicar el posible mecanismo de daño producido por el compuesto LQM 319 pero solo podría comprobarse o refutarse realizando los estudios sobre la farmacocinética y farmacodinamia de dicho compuesto.

En la gráfica 1 también se observa que Captopril produce mayor genotoxicidad en corazón a las 3 y 8 horas con la dosis de 0.00062mg/Kg, y que incluso es ligeramente mayor el efecto al producido por el control positivo en este órgano a las 18 horas, además es estadísticamente igual al efecto genotóxico producido por la dosis de 305 mg/Kg en sus tres horarios. Esta tendencia del efecto genotóxico de Captopril es característica también en hígado, aunque aquí el daño al DNA es menor que en corazón. Hay que recordar que Captopril si se metaboliza en hígado por lo que permanece más tiempo en él, produciendo el efecto sostenido con ambas dosis. En el caso de riñón se observa un pico máximo de genotoxicidad a las 3 horas con la dosis de 0.00062mg/Kg, que es igual al control positivo a las 8 horas, además como se sabe la mayor proporción de Captopril y sus metabolitos se eliminan por vía renal en un tiempo promedio de tres horas, esta misma dosis pero a las 8 horas produce un efecto genotóxico igual al de Captopril en dosis de 305mg/Kg pero a las tres

horas y del control positivo a las 18 horas. Sin embargo debe tenerse en cuenta que Captopril puede producir respuestas diferentes en organismos sanos y en hipertensos (PLM, 2007).

En corazón (gráfica 2) la dosis efectiva de Captopril produce efecto genotóxico mayor que el compuesto LQM 319 a la misma dosis, este último representa el 26% aproximadamente del daño ocasionado con Captopril a las 3 y 8 horas y para las 18 horas representa el 47% debido a que para este tiempo el efecto de Captopril en su dosis efectiva disminuye mientras que el efecto del LQM 319 se mantiene constante en los tres horarios. En el caso de la dosis letal para Captopril presenta menor efecto que su dosis efectiva, pero el LQM 319 solo produce el 30 y 39% del efecto ocasionado con Captopril a las 3 y 8 horas respectivamente sin embargo para las 18 horas el efecto se invierte y parece que el LQM.319 rebasa el daño producido por Captopril aunque cabe resaltar que este efecto no tiene diferencia significativa con el producido por Captopril en su dosis efectiva a las 3 y 8 horas y con su dosis letal en sus tres horarios.

Para hígado como puede observarse en la gráfica 3 la dosis efectiva del compuesto LQM 319 solo representa un efecto genotóxico ligeramente mayor al 30% del producido por el Captopril a las 3 y 8 horas, aunque ambos tienden a disminuir su efecto a las 18 horas, además la  $DL_{50}$  de Captopril produce efecto genotóxico cercano al de su dosis efectiva e incluso un poco menor en las 3 y 8 horas y que tiende a aumentar ligeramente para las 18 horas, contrario a estos datos, la dosis letal del LQM 319 produce mayor efecto genotóxico que su correspondiente dosis efectiva, pero menor a la dosis letal de Captopril a las 3 y 8 horas, sin embargo mientras el efecto producido por Captopril disminuye a las 18 horas, el del LQM 319 aumenta considerablemente en el mismo horario

En riñón (gráfica 4) el LQM 319 no produce efecto genotóxico con la dosis efectiva ni con la dosis letal a las 3 y 8 horas además estos datos no muestran diferencias significativas por lo tanto el efecto es el mismo con ambas dosis, por el contrario Captopril en su dosis efectiva y letal si produce genotoxicidad aunque cabe destacar que con la dosis efectiva el daño es mayor que con la dosis letal, además el efecto producido a las 18 horas por la dosis letal del LQM 319 que es el mayor para este órgano es estadísticamente igual al efecto de Captopril con la dosis efectiva a las 8 horas y con su dosis letal a las 3 horas.

El compuesto LQM 319 es ligeramente más tóxico que Captopril, pero en términos generales el LQM 319 produce menor daño al DNA. Aunque aún faltan diversos estudios por realizar, como de toxicidad y genotoxicidad crónica, además de farmacodinamia y farmacocinética de los tiomorfolínicos, el compuesto LQM 319 se perfila como un buen candidato con miras a su futura comercialización como fármaco antihipertensivo.

## CONCLUSIONES

Se determinó la  $DL_{50}$  del compuesto ditiomorfolínico LQM 319 y del Captopril con el método de Lorke y de Probit, con el primero la dosis fue igual para ambos; 471.17mg/Kg, mientras que con el método de Probit el LQM 319 presentó toxicidad ligeramente mayor que Captopril: 352.27mg/Kg y 371.32mg/Kg respectivamente, este último método proporciona resultados estadísticamente más exactos. Sin embargo el método de Lorke sigue siendo el más adecuado por el menor número de animales utilizados para dicha determinación.

La actividad genotóxica del MMS mostró la tendencia esperada para el ensayo de electroforesis unicelular en gel al presentarse el pico máximo de daño al DNA a las tres horas y disminuyendo conforme avanza el tiempo para los tres órganos evaluados, sin embargo el órgano más afectado fue el corazón, después hígado y por último riñón.

En relación al compuesto LQM 319 la dosis efectiva no mostró efecto significativo en el momentum de la cauda bajo ningún tratamiento, con la dosis intermedia, el órgano más afectado fue corazón a las 3 y 8 horas; mientras que el mayor efecto genotóxico fue producido con el 80% de la  $DL_{50}$  a las 18 hrs con diferente intensidad según el tejido en el orden siguiente: Hígado > Corazón > Riñón.

Con Captopril el mayor efecto genotóxico se produce en corazón con la dosis efectiva después en hígado y riñón para la misma dosis, disminuyendo conforme aumenta el tiempo, la misma tendencia se produjo con el 80% de la  $DL_{50}$  pero el efecto genotóxico es menor que con la dosis efectiva, sin embargo el efecto producido por este fármaco comúnmente es mayor que el control negativo y que el efecto producido por el compuesto LQM 319, excepcionalmente se invierte esta tendencia solo con el 80% de la  $DL_{50}$  a las 18 horas para los 3 órganos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ames Test en el Sitio Web: [users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/AmesTest](http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/AmesTest). Marzo, 2008
- Angeles E, Velazquez A, Rosales M, Leyva M, Torres L, Martinez I, Ramos A, 2007. A Novel Antiarrhythmic Compound 4-tertbutyl-2-(thiomorpholin-4-ylmethyl) phenol, Crystal Structure, Organic Chemistry an Indian Journal Vol. 3 (2) 48-50
- Avedaño L (Coordinación) 2001, “Introducción a la química farmacéutica”, 2ª edición, España, Editorial Mc Graw Hill-Interamericana
- Bello J, López A, 2001, “Fundamentos de Ciencia Toxicológica”, Editorial Díaz de Santos, Madrid, España
- Beraud M, Bories G, Boudene C, et al. 1990. “Toxicología y Seguridad de los Alimentos”, Editorial Omega, Barcelona.
- Bondani A, 1982, “La seguridad de un nuevo medicamento: estudios toxicológicos”, Centro Mexicano de Desarrollo e Investigación Farmacéutica A. C. México.
- Brendler-schwaab S, Hartmann A, Pfuher S, Speit G, 2005. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. Mutagenesis Vol. 20 no. 4, 245-254.
- Collazo H, García B, del Pozo J, Hernández V, 2006. La Farmacoeconomía en la Atención Primaria de Salud en Cuba. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, Vol. 37, Núm. 2. 16-25.
- Combourieu B, Besse P, Sancelme M, Godin J, Monteil A, Veschambre H, Delort A, 2000, Common Degradative Pathways of Morpholine, Thiomorpholine, and Piperidine by *Mycobacterium aurum* MO1: Evidence from <sup>1</sup>H-Nuclear Magnetic Resonance and Ionspray Mass Spectrometry Performed Directly on the Incubation Medium. Applied and Environmental Microbiology Vol. 66 (8) 3187-3193.
- Comet Assay Forum en el sitio Web [www.cometassayindia.org](http://www.cometassayindia.org) junio 2008.
- Comet Imager Version 1.2 Short Introduction, 2007, Copyright MetaSystems.
- Cruz M, 2001, Panorama epidemiológico de la hipertensión arterial en México. Archivos de Cardiología de México Vol. 71 Supl. S192-S197.
- Florez J, Armijo J, Mediavilla A, 2003, “Farmacología Humana” 4ª ed., Editorial Masson, Barcelona España.
- Hernández C, 1999, Efecto genotóxico del ácido 2,4-Diclorofenoxiacético en células somáticas y germinales. Tesis de Maestría en Ciencias; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.
- Herrera S, 2005. “Evaluación de la actividad hipotensora de ocho compuestos dimorfolínicos en rata wistar”. Tesis de licenciatura UNAM FESC-1.
- Imai K, Hayashy Y, Hashimoto K, 1981, Toxicological studies of Captopril, an inhibitor of angiotensin converting enzyme. 1. Acute toxicological studies of Captopril in rats and mice. Journal of Toxicological Sciences Vol. 6 (Suppl.2).

- INEGI en sitio Web: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx). Junio, 2008.
- INSP (Instituto Nacional de Salud Pública): Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000. Página Web: [www.insp.mx/ensa\\_tomo2.pdf](http://www.insp.mx/ensa_tomo2.pdf). Junio 2008.
- Kalant H, Walter H, Roschlau E, 2002, "Principios de farmacología médica", Editorial Oxford University Press, México.
- Katzung B, 2005, "Farmacología básica y clínica", Editorial El Manual Moderno. México D. F.
- Klassen C, Watkins J, 2005, "Fundamentos de Toxicología Casarett y Doull" 5ª ed, Editorial Mc Graw Hill Interamericana, México.
- Lee E, Oh E, Lee J, Sul D, Lee J. 2004. Use of the Tail Moment of the Lymphocytes to Evaluate DNA Damage in Human Biomonitoring Studies. *Toxicological Sciences* 81, 121-132.
- Márquez M, 1997. Estudio de la capacidad antigenotóxica del ácido norhidroguayaretico Evaluada *in vivo* con las pruebas de micronúcleos y la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas. Tesis de licenciatura. UNAM FESC1.
- Merck Index (The) 1996 "An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals" 12a ed, Published by merck research laboratories division of merck y Co. Inc. Whitehouse station, NJ. USA.
- Miyamae Y, Yamamoto M, Sasaki Y, Kobayashi H, Igarashi-Soga M, Shimoi K, Hayashi M. 1998. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutation Research* Vol. 418, 131-140.
- Moller P. 2005. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in biomonitoring of DNA damage exposures. *Farmacology & Toxicology* Vol. 98. 336-345.
- Mycek M, Harvey R, Champe P, Fisher B, 2004, "Farmacología" 2ª edición, Editorial Mc Grw Hill-Interamericana. México.
- Olaiz G, Rivera J, Shamah T, Rojas R, Villalpando S, Hernández M, Sepúlveda Jaime, Instituto Nacional de Salud Pública: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006. Página Web: [www.todoendabetes.org/diabe2/pdf/ensanut2006.pdf](http://www.todoendabetes.org/diabe2/pdf/ensanut2006.pdf). Junio 2008
- Olive P, Banáth J. 2006. The comet assay: method to measure DNA damage in individual cells, *Nature Protocols*, Vol 1 N. 1, 23-29.
- Olive P, Wlodek D, Banáth J, 1991, DNA Double-Strand Breaks Measured in Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Cancer Research*, Vol. 51, 4671-4676.
- OMS. Organización Mundial de la Salud 2005: En sitio Web [http://nhlbi.nih.gov/health/dci/Diseases/Hbp/HBP\\_Links.html](http://nhlbi.nih.gov/health/dci/Diseases/Hbp/HBP_Links.html), julio 2008.
- PLM Diccionario de Especialidades Farmacéuticas 2007, Thomson, Edición 53 inter sistemas editores. México.

- Rocha Y, 2008, Estudio genotóxico mediante la prueba de micronúcleos del compuesto tiomorfolínico LQM 319, Tesis de Licenciatura UNAM FES C-1.
- Rodríguez P C, Rodríguez P A, Servín H D, 2005 “Farmacología Clínica”, Editorial Mc Graw Hill, México.
- Ruiz M, 2003, “Manual de farmacia Practica”, Editorial Universidad de Granada, España.
- Sekihashi K, Sasaki T, Yamamoto A, Kawamura K, Ikka T, Tsuda S, Sasaki Y. 2001. A comparison of intraperitoneal and oral gavage administration in comet assay in mouse eight organs. *Mutation Research*, Vol. 493, 39-54.
- Tapia L, 2006, Determinación del efecto hipotensor de la serie de compuestos diseñados por computadora dimorfolínicos y tiomorfolínicos Tesis de licenciatura UNAM FES C-1.
- The Comet Assay Interest Group en el sitio web [www.comet-assay.de](http://www.comet-assay.de). Junio 2008.
- Tice R, Aguerell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki Y, 2000, Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:206-221.
- Tortora G, Grabowski S, 2006. “Principios de anatomía y fisiología”, 9ª ed. Editorial Oxford University Press, México.
- Tsuda S, Matsusaka N, Madarame H, Miyamae Y, Ishida K, Satoh M, Sekihashi K, Sasaki Y. 2000. The Alkaline single cell electrophoresis assay with eight mouse organs; results with 22 mono-functional alkylating agents (including 9 dialkyl N-nitrosoamines) and 10 DNA crosslinkers. *Mutation Research*. Vol. 467, 83-98.
- Velázquez A, 2007, Diseño asistido por computadora, síntesis y actividad antihipertensiva de derivados morfolínicos de fenol. Tesis de Doctorado en Ciencias; Posgrado de ciencias químicas UNAM FESC.
- Visarius T, Bahler H, Kupfer A, Cerny T, Lauterburg B, 1997, Thiodiglycolic acid is excreted by humans receiving ifosfamide and inhibits mitochondrial function in rats. *Drug Metabolism and Disposition* Vol. 26, 3, 193-196.

## ANEXO

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

#### **Agarosas.**

La agarosa de normal punto de fusión se prepara al 1%, y la agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%, ambas en solución buffer de fosfatos (PBS).

Pesar la agarosa en un vaso de precipitados de 100mL y agregar PBS, mezclar un poco y calentar en placa, agitando hasta que la solución sea transparente. Guardar a 4°C (la agarosa LMP puede guardarse en tubos de 5mL)

#### **Solución de Hank's (HBSS) libre de Calcio y Magnesio**

Para 500mL: en 400 mL. de HBSS libre de calcio y magnesio disolver perfectamente 3.72g de EDTA y 50mL de Dimetil Sulfoxido, llevar a pH de 7.0-7.5 con HCl, finalmente aforar a 500mL con HBSS. Guardar a 4°C.

#### **Solución de lisis.**

*Stock de Lisis.* Para 1 litro pesar: 146.1g de NaCl 2.5M, 37.2g de EDTA 100mM, 1.2g de trizma base 10mM y 10g de NaOH. Disolver en agua destilada suficiente, ajustando el pH a 10 para solubilizar completamente.

*Solución de trabajo* Para cada vaso coplin de 30mL agregar 26.7mL del Stock de lisis, 3mL de Dimetilsulfóxido y 0.3mL de Triton X-100, mezclar y mantener frío.

#### **Buffer de electroforesis.**

*Solución A.* NaOH 10N disolver 200g de NaOH en 500mL de agua desionizada

*Solución B* EDTA 200mM pesar 14.89g de la sal disódica en 200mL de agua desionizada.

*Solución Buffer de trabajo.* Mezclar 30mL de solución A con 5mL de solución B, ajustar con NaOH a pH 13 y aforar a 1 litro con agua desionizada.

#### **Solución de neutralización.**

Disolver 48.5g de tris en agua desionizada, llevar a pH 7.5 con HCl y aforar a 1litro con agua desionizada (TRIS 0.4 M)

#### **Colorante fluorescente.**

Disolver 10mg de Bromuro de etidio en 50mL de agua desionizada (solución Stock de 20µg/mL). De la solución anterior tomar 1mL y mezclar con 9mL de agua desionizada (concentración final: 1X). Guardar protegida de la luz.