



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN  
DE LA FLUORESCENCIA EN TÉCNICAS  
CITOGENÉTICAS DE LOS COMPUESTOS  
LQM 103, 107, 112, 115 Y 123**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN FARMACIA**

**P R E S E N T A:**

**MIGUEL ÁNGEL ORTÍZ FLORES**

**ASESORES:**

**DR. ENRIQUE R. ÁNGELES ANGUIANO  
DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Síntesis, Caracterización y Evaluación de la Fluorescencia en técnicas citogenéticas de compuestos LQM  
103, 107, 112, 115 y 123

Que presenta el pasante: Miguel Ángel Ortiz Flores

Con número de cuenta: 306096044 para obtener el Título de: Licenciado en Farmacia

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 ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de mayo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Enrique R. Ángeles Anguiano	
VOCAL	M. en F. Ma. Eugenia R. Posada Galarza	
SECRETARIO	QFB. Brígida del Carmen Camacho Enríquez	
1er. SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/pm

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por todo el conocimiento que me han dado para ser un gran profesional y por albergar todas esas horas de estudio; en fin por ser mi segundo hogar.*

*Al Laboratorio de Química Medicinal y el Laboratorio de Genética, por ser sede de los estudios e investigaciones que sustentan este trabajo. Asimismo, a los tutores de esta tesis y responsables de estos laboratorios, quienes sin su apoyo, conocimiento, esfuerzo, carisma y tiempo, este trabajo no hubiese podido realizar: Dr. Enrique Ángeles Anguiano y Dra. Sandra Díaz Barriga.*

*A cada uno de los Maestros que integran el Jurado para la evaluación de este trabajo: por su tiempo, dedicación y consejos para la mejora de este trabajo.*

*A la vida misma y a Dios por todo lo que me ha dado y me ha permitido conservarlo y también por todo lo que se ha llevado; y sin duda alguna a los pequeños detalles que han engrandecido mi vida. Gracias vida por todo.*

*A mis dos grandes y fuertes pilares que han sustentado lo que soy y no soy, quienes son mi fuente de inspiración y han sido guía durante este lapso de mi vida; quienes han sido, son y serán mi esencia...mi todo: Mis papás.*

*A ese pequeño pero gran pilar que ha compartido conmigo la sabiduría y el calor de nuestros grandiosos padres; por su apoyo incondicional y algunas veces involuntario: Mi hermanita.*

*A mi gran familia que ha brindado siempre su apoyo incondicional estando cerca o lejos, que siempre han estado presentes en esos momentos precisos y que han dado un toque de confianza y ejemplo a estos años. Incluyendo a esos grandes hermanos que viven en el norte, en el centro o a unos pasos.*

*A esas adorables galletitas que han compartido tanto y enseñado tanto en los años más cercanos de los cuales siempre habrá un grato recuerdo que traer a la memoria.*

*A los Cuatengers por darle un toque de aventura a la Farmacia.*

*A mis amigos del LQM que me han enseñado tanto e hicieron de mi travesía por el laboratorio algo más ameno y singular: Pablo, Moni, Gaby, Lalo, Vic II y III, Lenin, Óscar I y II, y por supuesto a Christian.*

*A esa personita tan especial quien ha compartido algún tiempo de su vida conmigo y que ha hecho de ese tiempo algo agradable, feliz, lleno de grandes cosas, de grandes lecciones, de interminables misiones, de gratos consejos, en fin, de mucho afecto, cariño y amor.*

*A los profesores que a lo largo de este vasto camino compartieron su conocimiento, abrieron un sendero diferente en mi vida y dejaron huella. Más aún con aquellos que compartí un poco de mi amistad.*

## DEDICATORIA

*A mis grandiosos y excepcionales padres, quienes durante todo el tiempo que llevo en este mundo me han llevado por el buen camino; quienes no han dejado ni dejarán de apoyarme... a quienes debo más que la vida misma y que gracias a ellos este proyecto y los que están por venir son posibles. Por ser como son y por ser quienes son, este trabajo es totalmente suyo; por que recuerden: mis logros son sus logros y así será siempre.*

*A esas tres estrellas que siguen brillando en lo alto y que a pesar de no estar presentes en este momento, siempre mostraron interés en lo que yo hacía y en lo que yo planeaba; quienes me heredaron más que carácter y fenotipos, en pocas palabras: lecciones de vida. Para ustedes, mi abuelito "Lupe" gran amigo puma y gran colega de Harvard; mi dulce, tierna y constante abuelita "Ene" y mi siempre aventurero y cuentacuentos abuelito "Pipi".*

*A mis grandes galletitas a quienes he tenido la dicha y fortuna de conocer y que afortunadamente y sabiamente he de mantener a mi lado. Quienes, cuando el otoño hubo de alcanzarme y comenzaba a tirar mis hojas, siempre fueron constantes; por compartir algunos rayos de sol y un poco de agua, cuando la sequía amenazaba; por compartir día a día un poco de los nutrientes que inyectan vida y hacen feliz a pesar de la ardua vereda que pasábamos.*

*- Das Wort "unmöglich" gibt es nur im Wörterbuch von Narren. – Napoleón*

*El presente trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIME PE202912 “Implementación de actividades para la obtención de competencias en genómica de las carreras de BQD y Farmacia” y el proyecto PACIVE DOC-21.*

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN .....	5
INTRODUCCIÓN .....	7
OBJETIVOS.....	9
MARCO TEÓRICO .....	10
<b>1. Citogenética</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Técnicas citogenéticas</b> .....	<b>10</b>
2.1. Micronúcleos .....	10
2.2. Preparaciones cromosómicas .....	11
2.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	13
<b>3. Microscopia de Fluorescencia</b> .....	<b>13</b>
3.1. Fluorescencia.....	13
3.2. Microscopio de Fluorescencia y Fluorocromos .....	16
<b>4. Isoxazoles</b> .....	<b>22</b>
<b>5. Determinación estructural de compuestos orgánicos mediante técnicas espectroscópicas y espectrometría de masas</b> .....	<b>23</b>
5.1. Espectrometría de Masas (MS) .....	23
5.2. Espectroscopía de Infrarrojo (IR).....	24
5.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) .....	26
HIPÓTESIS.....	29
MÉTODOS.....	30

<b>A) Síntesis química.....</b>	<b>30</b>
I- 3,5 dimetilisoxazol (LQM 101) .....	30
II- 3,5 dimetil 4-nitroisoxazol (LQM 102).....	30
III- Compuestos LQM 103, 107, 112, 115 y 123 .....	30
<b>B) Caracterización.....</b>	<b>31</b>
<b>C) Evaluación de la fluorescencia.....</b>	<b>31</b>
I- Técnica de Micronúcleos .....	31
II- Preparaciones cromosómicas de médula de ratón.....	32
III- Electroforesis de DNA sobre geles de agarosa .....	32
IV- Tinciones fluorescentes .....	32
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>PROSPECTIVAS.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>59</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Estructura, características físicas, rendimiento y peso molecular de los 5 compuestos evaluados.</i> .....	33
<i>Tabla 2. Punto de fusión y Solubilidad de los 5 compuestos evaluados.</i> .....	35
<i>Tabla 3. Bandas características en el espectro IR de los compuestos obtenidos</i> .....	36
<i>Tabla 4. Señales características de RMN-<sup>13</sup>C de los compuestos obtenidos</i> .....	36
<i>Tabla 5. Señales características de RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos obtenidos</i> .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Métodos empleados en el estudio de los diferentes niveles de organización de un cromosoma.</i> .....	12
<b>Figura 2.</b> <i>Representación esquemática del Principio de la Fluorescencia</i> .....	14
<b>Figura 3.</b> <i>Diagrama de Jablonski</i> .....	15
<b>Figura 4.</b> <i>Espectro típico de absorción/excitación y emisión</i> .....	16
<b>Figura 5.</b> <i>Anatomía de un microscopio de epi-fluorescencia</i> .....	17
<b>Figura 6.</b> <i>Espectros de emisión de los colorantes orgánicos y las proteínas fluorescentes más usadas.</i> .....	21
<b>Figura 7.</b> <i>Distintos tipos de vibraciones detectadas por un espectrofotómetro de IR.</i> .....	24
<b>Figura 8.</b> <i>Las cuatro regiones del espectro infrarrojo</i> .....	25
<b>Figura 9.</b> <i>Orientación de los espines magnéticos por influencia de <math>B_0</math></i> .....	26
<b>Figura 10.</b> <i>Espectro de Masas del compuesto LQM 103</i> .....	38
<b>Figura 11.</b> <i>Geles de agarosa (1%) para electroforesis de DNA</i> .....	39
<b>Figura 12.</b> <i>Laminillas de frotis sanguíneo con micronúcleos</i> .....	40
<b>Figura 13.</b> <i>Laminillas de médula ósea con cromosomas</i> .....	41
<b>Figura 14.</b> <i>Reacción de Henry</i> .....	42
<b>Figura 15.</b> <i>Diagrama Polar <math>L_0, \tau_0</math></i> .....	46
<b>Figura 16.</b> <i>Plantilla con posibles grupos capaces de interaccionar con el DNA</i> .....	47
<b>Figura 17.</b> <i>Dibujo computacional de la posible unión del compuesto POPOP en el surco menor del DNA.</i> .....	48

## ABREVIATURAS

$\Delta E$	Diferencia de energía
$^{\circ}C$	Grados centígrados
$\mu L, mL$	Microlitro, mililitro
Ác.	Ácido
AT	Adenina-Timina
$B_0$	Campo magnético
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
CG	Citosina-Guanina
DAPI	4'-6 diamidino 2-fenilindol
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dsDNA	Ácido Desoxirribonucleico de doble cadena
et al.	et alii (y otros)
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
FT-IR	Infrarrojo acoplado a Transformadas de Fourier
HCl	Ácido Clorhídrico
IRS	Espectroscopia de Infrarrojo
KCl	Cloruro de Potasio
LQM	Laboratorio de Química Medicinal
m/z	Relación masa/carga
$M^+$	Ión molecular
min, h	Minutos, horas
MS	Espectrometría de Masas
ng, $\mu g$ , mg, g, kg	Nanogramo, microgramo, miligramo, gramo, kilogramo
nt	Número de acumulaciones
OH, SH, $NH_2$	Hidroxilo, tiol, amino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
POPOP	Fenil-Oxazol-Fenil-Oxazol-Fenil
RMN- $^{13}C$	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN- $^1H$	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
ssDNA	Ácido Desoxirribonucleico de cadena sencilla
ua	Unidades de Absorbancia
UV	Ultra-Violeta
V	Volts
YOYO	Amarillo-Oxazol-Amarillo-Oxazol

## RESUMEN

**Introducción:** Hoy en día la microscopía de fluorescencia es uno de los métodos de elección para el estudio de las células y sus componentes debido a su selectividad, al realce de su contraste y a ser una técnica menos destructiva; sin embargo, los fluorocromos más comunes empleados para esta técnica, tienen como desventaja principal el ser agentes genotóxicos y mutagénicos potenciales, como el bromuro de etidio, el naranja de acridina y la quinacrina. Por ello se ha hecho un esfuerzo en años recientes para poder obtener fluorocromos menos tóxicos y de menor costo, algunos de los cuales se desarrollan en el Laboratorio de Química Medicinal (LQM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC).

**Objetivo:** Realizar la síntesis y caracterización fisicoquímica de los compuestos LQM 103, 107, 112, 115 y 123, derivados de la familia de los isoxazoles 5-sustituídos, y evaluar su posible uso como colorantes fluorescentes en técnicas citogenéticas.

**Método:** Síntesis de los compuestos a evaluar: mediante una reacción de ciclización-adición y la reacción de Henry. Caracterización de los compuestos: cálculo de rendimiento, solubilidad, punto de fusión y propiedades organolépticas. Determinación estructural de los compuestos: mediante espectrometría de masas (MS), resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) y de carbono (RMN-<sup>13</sup>C) y espectroscopia de infrarrojo (IR). Evaluación del potencial uso como fluorocromo: tinciones de frotis sanguíneos con micronúcleos, laminillas con cromosomas de ratón y en muestras de ácido desoxirribonucleico (DNA) corrido en electroforesis en gel de agarosa; para su posterior observación al microscopio.

**Resultados y Discusión:** La ruta de síntesis empleada para obtener los compuestos evaluados, dio en promedio un rendimiento mayor al 85% utilizando las condiciones aquí descritas, además de ser compuestos insolubles en agua y con alta solubilidad en Dimetilsulfóxido (DMSO) y ácido acético. Los compuestos obtenidos mediante la ruta de síntesis utilizada son efectivamente los propuestos teóricamente, ya que sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarrojo (IR) y Espectrometría de Masas (MS) muestran señales características de los grupos y los átomos de carbono e hidrógeno que

*componen a dichos compuestos. En lo que respecta a la evaluación de su uso como fluorocromos, no se encontró que alguno de ellos tuviera afinidad por el DNA presente en forma de cromosomas, micronúcleos y DNA "desnudo" en las técnicas citogenéticas evaluadas. Esto ocurrió debido a que se deben cumplir ciertas características estructurales en las moléculas que fungen como colorantes fluorescentes, siendo las principales: (a) poseer grupos amino u otro grupo que contenga hidrógenos para lograr una interacción por puentes de hidrógeno, (b) que pueda ser ionizado, preferentemente en su forma catiónica o en su defecto, si es un colorante que tiene un mecanismo intercalante, (c) que sea una sal de sodio y (d) que posea una molécula rígida.*

**Conclusión:** *Se sintetizaron compuestos 5-sustituidos derivados del 3,5-dimetil 4-nitro isoxazol mediante una ciclización-conjugación de una dicetona e hidroxilamina; los cuáles debido a la fluorescencia que presentan cuando se observan bajo luz ultravioleta (UV) y otras propiedades estructurales, se probaron como posibles fluorocromos en técnicas citogenéticas. El resultado de las pruebas de micronúcleos, cromosomas y DNA "desnudo" no mostraron el efecto que se esperaba, es decir, la interacción o el intercalamiento de estos compuestos con el DNA con el fin de observar el efecto fluorescente tras esta interacción.*

## INTRODUCCIÓN

*Debido a su selectividad, al realce de su contraste y a ser una técnica menos destructiva, hoy en día la microscopía de fluorescencia es uno de los métodos de elección para el estudio de las células y sus componentes, a través de imágenes de alta calidad, y es un procedimiento estándar para estudiar los procesos biológicos de células normales y patológicas, compartimentos subcelulares o moléculas específicas dentro de la célula, a través de un proceso relativamente sencillo: introduciendo fluorocromos específicamente dirigidos a las biomoléculas de interés (Ishikawa, H. et al. 2012).*

*En años recientes, se ha dado mucha más atención al desarrollo y la aplicación microscópica de métodos fluorescentes DNA-selectivos para estudios celulares y de biología molecular, citoquímica del DNA, y bandeo cromosómico, técnicas mediante las cuales la Citogenética cumple su objetivo principal: estudiar la estructura y el comportamiento cromosómico. Estos estudios se realizan a través de cultivos celulares que permiten obtener células en división activa para su posterior análisis y observación al microscopio. (Herrera, J. 2007).*

*De esta forma, una gran variedad de fluorocromos que abarcan prácticamente toda la gama del espectro luminoso (desde el infrarrojo hasta el ultravioleta) se han desarrollado y colocado en el mercado; cada uno con el fin de diferenciar cierto tipo de bandas en los cromosomas (bandeo cromosómico), marcar específicamente el DNA en sus diferentes estructuras (cromosomas, cadenas sencillas de DNA (ssDNA), la doble cadena de DNA (dsDNA), etc.); así como ser menos tóxicos, que se requiera una menor concentración para observar la fluorescencia, entre otras características. (Herrera, J. 2007).*

*Sin embargo, algunos de los fluorocromos disponibles en el mercado, continúan teniendo como desventaja principal el ser agentes genotóxicos y mutagénicos potenciales, como es el caso de los colorantes más comúnmente utilizados: bromuro de etidio, naranja de acridina y quinacrina (fluorocromos intercalantes), solo por mencionar algunos. De forma general, cuando estos colorantes se intercalan con la molécula de DNA, provoca un ligero desenrollamiento de ésta; dicha modificación provoca cambios a nivel de pares de bases o estructura, tales como un desplazamiento del marco de lectura, trascendiendo a nivel del proceso de transcripción, replicación y reparación del DNA (Martin, R. et al. 2005), (Resch U. et al. 2008), (Matselyukh, B. et al. 2005).*

*Debido a la gran desventaja que representa la toxicidad de estos compuestos, se han desarrollado diversas estrategias para sintetizar nuevos compuestos que presenten las mismas características fluorescentes, pero con menor actividad tóxica; así como obtener compuestos que permitan distinguir partes específicas dentro de los cromosomas. (Stockert, J. et al. 2005).*

*Persiguiendo el objetivo anterior, en el Laboratorio de Química Medicinal se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de compuestos etiquetados como familia LQM 100, los cuales son derivados del isoxazol, se ha elegido este compuesto heterocíclico debido a que en el mercado existen compuestos que contienen dentro de su estructura este anillo y que poseen un sistema conjugado, como es el caso de las familias fenil oxazol (POPOP) y amarillo oxazol (YOYO), y que debido a sus propiedades fluorescentes se decidió investigar su potencial uso como colorantes fluorescentes que puedan aplicarse a las técnicas citogenéticas de rutina. De esta forma, se pretende obtener nuevos compuestos que tengan mejores ventajas como colorantes fluorescentes, así como bajo costo de fabricación y bajo nivel tóxico.*

## OBJETIVOS

### **- Objetivo General**

- ✓ *Realizar la síntesis y caracterización fisicoquímica de los compuestos LQM 103, 107, 112, 115 y 123, derivados de la familia de los isoxazoles 5-sustituidos, y evaluar su posible uso como colorantes fluorescentes en técnicas citogenéticas.*

### **- Objetivos Particulares**

- ✓ *Sintetizar, purificar y caracterizar mediante las técnicas espectroscópicas: IR, RMN<sup>13</sup>C, RMN<sup>1</sup>H y espectrometría de masas los isoxazoles LQM 103, 107, 112, 115 y 123.*
- ✓ *Evaluar la capacidad de tinción fluorescente de estos compuestos sobre DNA, núcleos celulares y cromosomas, mediante espectroscopia de fluorescencia para determinar si hay interacción entre los compuestos y el DNA.*

### 1. Citogenética

---

*Actualmente es posible la detección del Síndrome de Down o el Síndrome de Turner en los fetos (solo con una muestra sanguínea), o la detección de algunos tipos de cánceres de alta incidencia en la actualidad: mama y pulmón, gracias a la implementación de la fluorescencia en el área de la citogenética. Por ello, la gran importancia de estudiar e implementar nuevas herramientas a la citogenética. (Gray, J. et al. 1992)*

*La citogenética es la rama de la genética que tiene por objeto el estudio de la estructura y el comportamiento cromosómico. Estos estudios se realizan a través de cultivos celulares que permiten obtener células en división activa para su posterior análisis y observación al microscopio. (Herrera, J. 2007).*

*Con el fin de poder diferenciar a los cromosomas de otros componentes celulares, se crearon colorantes que mediante distintos mecanismos, son afines y específicos al DNA. Posterior a ello, se logró un mayor avance en el área, cuando se aprovecharon por vez primera las características y cualidades fluorescentes de algunos compuestos, que fueron utilizados como marcadores (sondas) específicos del DNA e inclusive para diferenciar cierto tipo de bandas en los cromosomas (bandeo diferencial). Además, las nuevas innovaciones técnicas de la microscopía confocal y de epifluorescencia, así como el desarrollo de componentes ópticos de excelentes características, mejoraron de manera decisiva el desempeño de los antiguos microscopios. (Herrera, J. 2007).*

### 2. Técnicas citogenéticas

---

#### 2.1. Micronúcleos

*La prueba de micronúcleos es una prueba de evaluación genotóxica que permite evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos en breve tiempo. Este tipo de ensayo resulta de gran utilidad porque permiten detectar mutaciones génicas, aberraciones*



*cromosómicas, daño primario a la estructura del DNA, transformaciones celulares u otras afectaciones, los cuales son inducidos por compuestos químicos o físicos que abundan en el ambiente. Además, esta prueba es de carácter obligatorio para compuestos de nueva síntesis. (Arencibia, D. et al. 2003).*

*El ensayo de micronúcleos puede llevarse a cabo “in vivo” o “in vitro”. En este trabajo, la prueba que se llevó a cabo fue de forma in vitro. La presencia de los micronúcleos, que son fragmentos de cromosomas retardados que asumen gradualmente la morfología de un núcleo en interfase con la excepción de que son más pequeños que el núcleo principal formados por la pérdida de los centrómeros y/o pérdida de cromosomas completos que son incapaces de viajar con el resto de los cromosomas a través del huso mitótico, a los polos del núcleo celular durante la anafase de la división celular (Arencibia, D. et al. 2003), se puede evaluar en sangre periférica evaluando eritrocitos o en médula ósea, evaluando a los reticulocitos.*

*La técnica “in vivo” evaluando eritrocitos es fácilmente reproducible y es más fácil detectar la presencia de los micronúcleos, debido a que los eritrocitos son células anucleadas. (Arencibia, D. et al. 2011).*

*Por lo general en los estudios de genotoxicidad “in vivo” se utilizan sustancias mutagénicas conocidas, dentro de las más utilizadas se encuentra la ciclofosfamida, para inducir la formación de los micronúcleos (Arencibia, D. et al. 2011), como se realizó en este trabajo. La ciclofosfamida al ser activada por el sistema de enzimas microsomales hepáticas se convierte en acroleína y fosforamida, dos potentes sustancias alquilantes del DNA. Al reaccionar con el DNA, los agentes alquilantes forman unos puentes que impiden la duplicación del mismo, o provocan errores en este proceso, y, en su defecto, provocan la muerte de la célula. (Lieberman, A. et al. 2008)*

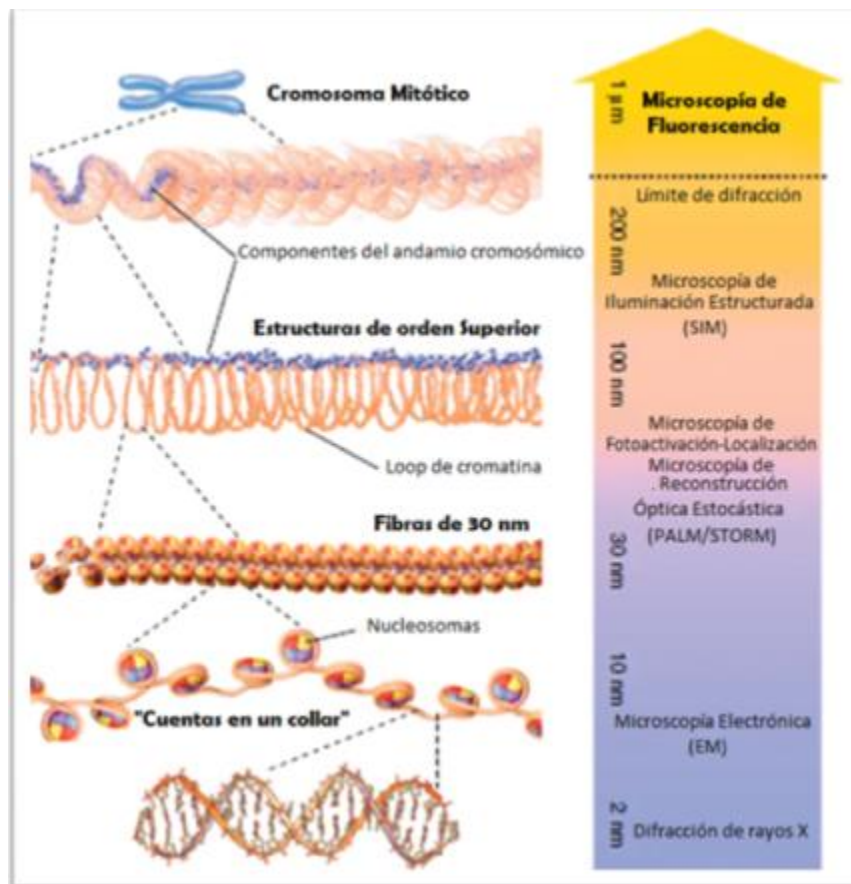
## **2.2. Preparaciones cromosómicas**

---

*Como se mencionó anteriormente, actualmente es posible detectar algunas enfermedades genéticas como el Síndrome de Down cuando las mujeres aún están embarazadas, o la detección de algunos tipos de cánceres de alta incidencia en la actualidad: mama y pulmón (Gray, J. et al. 1992). Esto se logra observando los cromosomas obtenidos de diversas muestras de los sujetos en estudio, para posterior a un tratamiento obtener laminillas con cromosomas o preparaciones cromosómicas.*

El propósito de esta técnica es observar la forma peculiar de "X" de los cromosomas, fijados en laminillas de vidrio, que después de un tratamiento con colorantes fluorescentes, pueden ser vistos al microscopio y observar regiones en particular o un realce en la estructura cromosómica, esto en función del colorante utilizado. (Mahieu, L. et al. 2010).

Es sabido que durante la transición de interfase a mitosis, los territorios cromosómicos de la interfase se reorganizan y condensan en la simbólica forma X de los cromosomas. La compactación de la cromatina ocurre en varios órdenes de magnitud, ocupando para revelar los diferentes aspectos de su organización distintos métodos, como se muestra en la Figura 1 (Flors, C. et al. 2011), donde se puede apreciar que para el estudio del DNA en su forma más compactada (cromosoma) se emplea la Microscopía de Fluorescencia, motivo que sustenta porque se utilizó este método para evaluar los compuestos de la familia LQM 100.



**Figura 1.** Métodos microscópicos empleados en el estudio de los diferentes niveles de organización de un cromosoma.

### **2.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

---

*Esta técnica es un modo efectivo para el estudio del DNA, obtenido mediante diferentes vías de extracción y amplificado o no, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante la electroforesis se puede estudiar la integridad del DNA obtenido, separar el DNA en fragmentos de distinto tamaño o comprobar simplemente la presencia de esta macromolécula en una muestra. (Lee, P. et al. 2012).*

*Para llevar a cabo esta técnica, se pueden utilizar geles de agarosa o de poliacrilamida como plataforma para el corrimiento de la electroforesis; en este caso se utilizó como plataforma geles de agarosa, donde se colocan las muestras que se desean evaluar y posteriormente, mediante la aplicación de un campo eléctrico dentro de la cámara de electroforesis, el DNA comenzará a migrar al ánodo, debido a que el DNA posee una carga negativa proveniente del grupo fosfato. (Lee, P. Y. et al 2012).*

*Después de determinado tiempo, cuando se considere que se ha llevado a cabo una excelente separación, las moléculas de DNA pueden visualizarse bajo la luz UV después de ser teñidos con un colorante apropiado, generalmente fluorescente. (Lee, P. Y. et al 2012).*

*Es aquí, donde se propone la utilización de los compuestos LQM 103, 107, 112, 115 y 123 como colorantes fluorescente.*

## **3. Microscopia de Fluorescencia**

---

### **3.1. Fluorescencia**

---

*El fenómeno de fluorescencia es un proceso luminiscente en el cual, de forma general, una sustancia susceptible absorbe luz para después re-emitir luz (fotones) desde estados electrónicos excitados después de un tiempo dado. Este proceso luminiscente puede ser generado a través de la excitación por mecanismos físicos, mecánicos o químicos. (Ishikawa, H. et al 2012), (Sugden, J. K. 2004).*

*En la Figura 2, se muestra de manera esquemática el principio de la fluorescencia, donde, utilizando un modelo clásico de Bohr, se aprecia la absorción de un cuanto de luz (azul) que causa que un electrón se mueva a un orbital de mayor energía. Después de permanecer un tiempo determinado en ese “estado excitado”, que representa el tiempo de vida de*

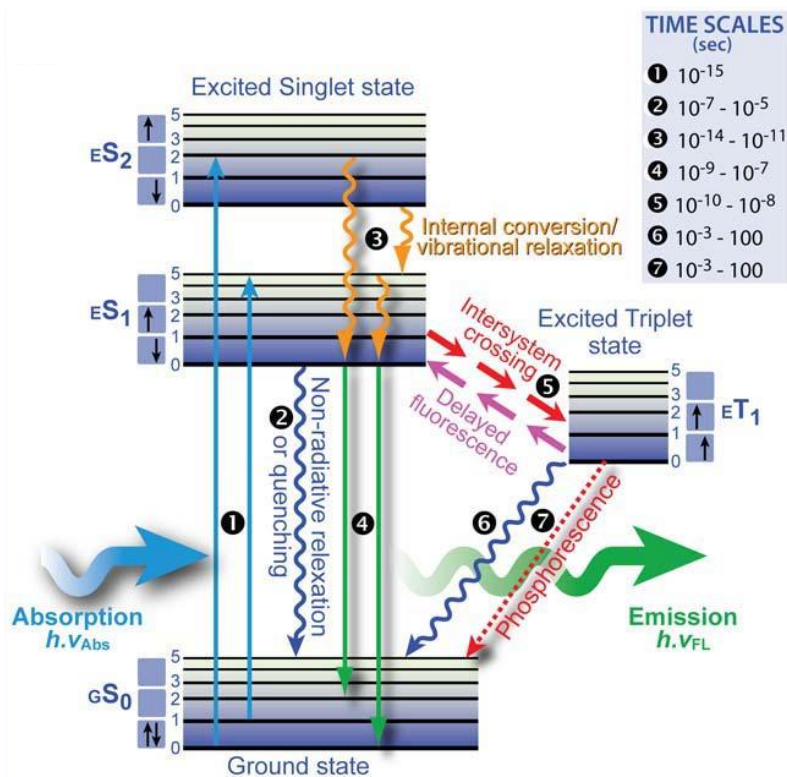
fluorescencia, el electrón regresa a su orbital original y el fluorocromo disipa el exceso de energía ( $\Delta E$ ) emitiendo un fotón (verde):



**Figura 2.** Representación esquemática del Principio de la Fluorescencia

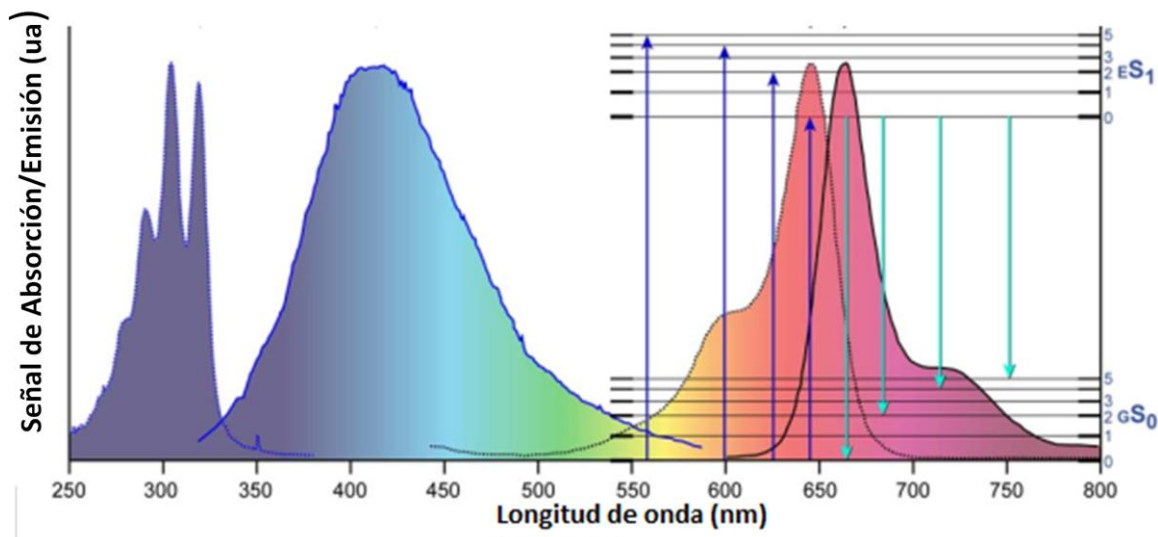
De una forma más completa, la fluorescencia se puede explicar mediante un diagrama de Jablonski que se muestra en la Figura 3, en donde se observa que un electrón abandona el estado fundamental  $GS_0$  (singlete electrónico) cuando un cuanto de luz (un único fotón) es absorbido y se muda a un estado excitado mayor, se relaja rápidamente a un estado excitado vibracional más bajo (línea naranja) y de este modo pierde energía. Cuando regresa al estado fundamental, disipa la energía restante emitiendo un fotón con una longitud de onda más larga, es decir, emisión de fluorescencia. (Ishikawa, H. et al 2012).

Cuando el electrón finalmente regresa al nivel de menor energía (el estado fundamental  $GS_0$ ) originado por, un cuanto de luz (fotón) es emitido con una longitud de onda mayor, lo cual es una transición permitida desde que el espín es retenido. En muchos fluorocromos, la emisión de fotones es producida por una transición  $\pi-\pi^*$  o  $n-\pi^*$ , dependiendo de cuál requiera la menor energía para que ocurra la transición. (Ishikawa, H. et al 2012).



**Figura 3.** Diagrama de Jablonski. (Tomado de Ishikawa, H. et al 2012)

La irradiación de una muestra fluorescente con luz de distintas longitudes de onda dentro del espectro UV-Visible, genera numerosas transiciones permitidas que pueblan los distintos niveles energéticos vibracionales de los estados excitados, algunos de los cuales tienen una mayor probabilidad de ocurrir que otros y en conjunto forman el espectro de absorción de la muestra fluorescente, ejemplo de este tipo de espectros es el que se muestra en la Figura 4. (Ishikawa, H. et al 2012), (Sugden, J. 2004).



**Figura 4.** Espectro típico de absorción/excitación y emisión

Debido al decaimiento de energía interna en los niveles del estado excitado y puesto que la longitud de onda varía inversamente con la energía radiante, la emisión de fluorescencia generalmente ocurre a longitudes de onda más largas y concomitadamente menor energía que la luz usada para excitar al fluorocromo, siempre que un único fotón esté involucrado durante la excitación. De esta forma, los fluorocromos no solo tienen un espectro de excitación característico, sino también un espectro de emisión característico que son dependientes de su configuración vibracional específica y sus propiedades. (Ishikawa, H. et al 2012).

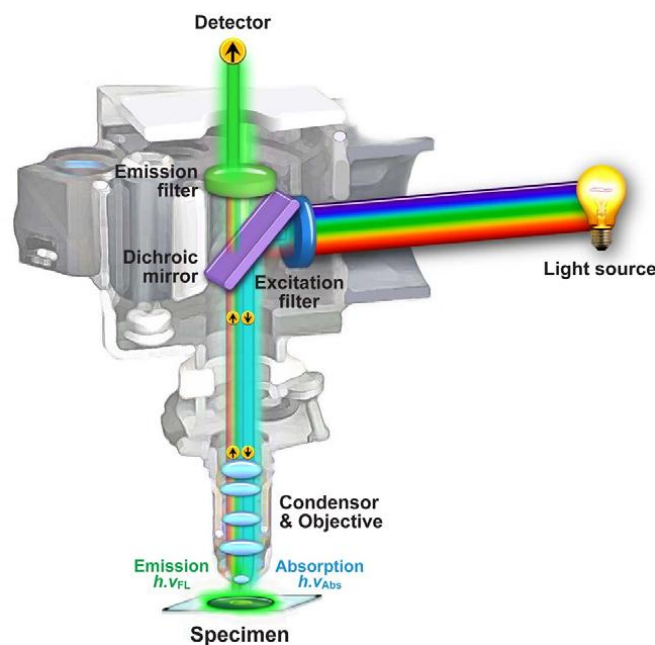
### 3.2. Microscopio de Fluorescencia y Fluorocromos

El primer microscopio de fluorescencia fue desarrollado a principios del siglo XX. En 1904, August Köhler construyó un microscopio con iluminación UV para Zeiss Optical Works en Jena, Alemania, en el cual él utilizó una lámpara de cadmio como fuente de luz. Sin embargo, fue Oskar Heimstädt quien desarrolló el primer microscopio de fluorescencia en 1911, con el cual, estudió la auto-fluorescencia en compuestos inorgánicos y orgánicos. (Ishikawa, H. et al 2012).

Sin embargo, esos microscopios de fluorescencia prematuros sufrieron de muchos inconvenientes, incluido el hecho de que las fuentes de luz en ese tiempo no tenían el



suficiente poder para excitar los fluorocromos a las velocidades suficientemente altas y que la separación efectiva de la señal de fluorescencia de la luz de excitación era difícil de lograr. Para obtener la señal suficiente, Heimstädt tuvo que confiar en la iluminación de campo-oscuro, la cual aseguraba que solo una limitada cantidad de luz excitadora entraría en el lente del objetivo, pero esto fue un método técnicamente desafiante y ciertamente no conveniente para el desarrollo de la microscopia de fluorescencia como una herramienta de uso principal. La invención del microscopio de epi-fluorescencia, cuya anatomía se muestra en la Figura 5, en 1929 por Philipp Ellinger y August Hirt fue un paso determinante para lograr esta meta. (Ishikawa, H. et al 2012).



**Figura 5.** Anatomía de un microscopio de epi-fluorescencia  
(Tomado de Ishikawa, H. et al 2012)

En esta configuración, la iluminación y la detección toman lugar de un lado de la muestra, la luz emitida por la fuente (light source) es reflejada en un filtro de excitación (excitation filter) la cual posteriormente choca en un espejo (dichroic mirror) que dirige la luz hacia la muestra. De esta forma se asegura que solo la luz emitida y excitatoria reflejada en la muestra alcance el objetivo (condensator and objective), que resulta en una señal significativamente mejorada captada por el filtro de emisión (emission filter) y que puede ser observada por un detector (detector), como una cámara digital.

*En los 1930's el austriaco Max Hatingen y otros desarrollaron la técnica de "fluorescencia secundaria" en la cual, las muestras eran sistemáticamente teñidas con colorantes fluorescentes, inicialmente para hacer muestras biológicas débilmente autofluorescentes más visibles. Hatingen también fue el primero en introducir el término "fluorocromo" para estas tinciones fluorescentes. (Ishikawa, H. et al 2012).*

*En los inicios de 1940, Albert Coons desarrolló la técnica de anticuerpos marcados con colorantes fluorescentes. Esto fue un gran progreso, ya que permitía marcar proteínas específicas y estructuras subcelulares y como resultado hizo visibles estas estructuras moleculares con un contraste y una resolución nunca antes vistas. Desde aquellos primeros experimentos, la tinción con anticuerpos con marcadores fluorescentes secundarios se ha convertido en un método estándar en la investigación biológica y biomédica, y en diagnóstico clínico para muestras fijas, incluyendo tejidos y células simples. Además se logró un incremento significativo en la señal de fluorescencia con estos fluorocromos sobre la débil autofluorescencia endógena de especies biológicas. (Ishikawa, H. et al 2012).*

*La falla en la capacidad de excitación fue resuelta con el desarrollo de láseres en los 1960's basados en los fundamentos teóricos de Einstein con respecto a la emisión estimulada por Gould, Schawlow y Maiman. Los láseres ofrecen: un alto grado de coherencia temporal y espacial, lo que significa que la difracción monocromática limitada y el rayo coherente pueden ser enfocados en un pequeño punto, logrando una muy alta irradiación local. Además, esto vuelve posible la separación efectiva de señales utilizando filtros apropiados y espejos dicróicos (filtros de interferencia especializados que selectivamente permiten el paso de la luz en un rango particular de longitudes de onda, mientras reflejan otras longitudes de onda cuando se sitúan en el camino de luz en un ángulo de 45°). (Ishikawa, H. et al 2012).*

*Hoy en día, la microscopía de fluorescencia es el método de elección para obtener imágenes de células vivas y es un procedimiento estándar para estudiar el proceso biológico-celular de células simples normales y patológicas, compartimentos subcelulares o poblaciones de células, introduciendo fluorocromos específicamente dirigidos a las biomoléculas de interés. La mayor de las ventajas es que la microscopía de fluorescencia provee información con resolución espacio-temporal y es, generalmente, menos destructiva comparada con otras técnicas para obtener imágenes (ej. Microscopía electrónica). (Ishikawa, H. et al 2012). (Sugden, J. 2004).*

*A modo de resumen, Lo que hace a la microscopía de fluorescencia una gran y específica herramienta para el análisis y la visualización celular y molecular, esencialmente es su selectividad y el realce de contraste. Mientras la selectividad es lograda*



*predominantemente a través de métodos de marcaje anteriormente mencionados, el aumento en el contraste es realizado por el mismo microscopio. Los microscopios modernos de fluorescencia pueden maximizar la recolección de la luz fluorescente emitida, mientras minimiza la recolección de la luz de excitación incidente. Así, una de las principales ventajas de la microscopía de fluorescencia es el dramático aumento en la señal de las moléculas marcadas y las moléculas en contra de un campo oscuro- análogo a las estrellas en el cielo en una noche oscura que no son visibles durante el día. (Ishikawa, H. et al 2012). (Sugden, J. 2004).*

*Los compuestos fluorescentes (fluorocromos) que son usados en la investigación para marcar componentes específicos de células vivas son comúnmente llamados sondas. Las sondas son frecuentemente utilizadas en células cultivadas. La microscopía de fluorescencia provee mayor detección sensible de las sondas que la microscopía de luz ordinaria porque los objetos teñidos son fuentes de luz que resaltan en un fondo oscuro (idealmente negro). (Kiernan, J. 2006).*

*La mayoría de los colorantes no entran en células vivas; aquellos que lo hacen son catiónicos y moderadamente lipofílicos, con pequeños o medianos sistemas conjugados, colorantes sin afinidad fuerte por las proteínas o por los lípidos de la membrana celular. Dentro de la célula un fluorocromo puede acumularse en organelos particulares como el núcleo, la mitocondria o los lisosomas. (Kiernan, J. 2006).*

*Los colorantes aniónicos generalmente no penetran células vivas, son repelidos tal vez por los aniones de la glicoproteína en la superficie exterior de la membrana celular. Los cationes de colorantes de moléculas largas son también excluidos. Si la membrana celular se vuelve porosa, como en las células muertas, los colorantes aniónicos y catiónicos grandes penetran y se unen a las proteínas o a los ácidos nucleicos. (Kiernan, J. 2006).*

*Los ésteres carboxílicos de algunos colorantes aniónicos fluorescentes no presentan carga y son lipofílicos; estos compuestos típicamente tienen grupos fenólicos acetilados y grupos carboxi acetoximetilados. (Kiernan, J. 2006).*

*Algunos compuestos fluorescentes usados con este propósito tienen una cadena lateral clorometil o clorobencil que reacciona con los grupos hidroxilo, tiol o amino (OH, SH o NH<sub>2</sub>) y ancla el colorante a las proteínas citoplasmáticas. El fluorocromo intracelular es frecuentemente aquel cuyo color emitido cambia con el potencial de hidrógeno (pH) o con las fluctuaciones de concentración de un ion significativo biológicamente como el potasio, calcio o magnesio, exhibiendo cambios sensitivos potenciales en sus emisiones. (Kiernan, J. 2006).*

*La principal desventaja de cualquier marca fluorescente es que podría eventualmente cambiar, perdiendo su fluorescencia principalmente como consecuencia de la exposición a la radiación UV y visible. Para examinar las preparaciones por microscopía de fluorescencia es necesario iluminar brillantemente a una longitud de onda cercana al máximo de absorción del fluorocromo. La desaparición puede ser retardada adicionando sustancias al medio de montaje. Los aditivos más comunes son 2-mercaptoetanol, propil galato y p-fenilendiamina. (Kiernan, J. 2006).*

*Finalmente, es importante destacar que en la actualidad existe una gran diversidad de fluorocromos que prácticamente cubren la mayoría de las longitudes de onda del espectro UV-Visible, cada uno de ellos tiene un espectro de excitación característico, los cuales de forma muy compacta, se muestran en la Figura 6. (Ishikawa, H. et al 2012).*



**Figura 6.** Espectros de emisión de los colorantes orgánicos y las proteínas fluorescentes más usadas.

#### 4. Isoxazoles

---

Los isoxazoles son compuestos heterocíclicos que tienen un gran número de aplicaciones y han demostrado ser muy versátiles como bloques de construcción en síntesis orgánica. Poseen un amplio rango de actividades biológicas, dentro de las cuales se incluyen propiedades farmacológicas tales como: analgésico, antiinflamatorio (Madhavi, K. et al. 2010) y antibacterial. Además, algunos derivados de los isoxazoles muestran propiedades agroquímicas, es decir, actividad herbicida y fungicida y tienen aplicaciones como pesticidas e insecticidas. Los isoxazoles también han sido usados como colorantes, aceites eléctrico aislantes, lubricantes de alta temperatura y los poliisoxazoles tienen aplicación como semiconductores. (Pinho e Melo, T. 2005).

La característica clave de estos heterociclos es que poseen las típicas propiedades de un sistema aromático pero contienen un enlace nitrógeno-oxígeno débil que, bajo ciertas condiciones de reacción, particularmente en condiciones de reducción o en condiciones básicas, es un sitio potencial de escisión del anillo. Por ello, los isoxazoles son intermediarios muy útiles, dado que es fácil romperlos cuando es necesario, para formar derivados complejos funcionales. La apertura del anillo proporciona compuestos disfuncionales, llamados 1,3-dicarbonil-enaminocetonas,  $\gamma$ -amino alcoholes, oximas  $\alpha,\beta$ -insaturadas,  $\beta$ -hidroxinitrilos o  $\beta$ -hidroxicetonas; por ello los isoxazoles pueden ser considerados formas enmascaradas de esas unidades sintéticas. Consecuentemente, los isoxazoles se han convertido en una importante herramienta de síntesis. (Pinho e Melo, T. 2005).

La construcción del anillo isoxazol puede lograrse por distintas rutas sintéticas. Sin embargo, las dos rutas mayormente empleadas son la cicloadición 1,3-dipolar de alquenos y alquinos con óxidos de nitrilo y la reacción de hidroxilamina con un componente de tres átomos de carbono, como las 1,3-dicetonas o una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturados, ésta última fue la empleada durante el desarrollo de este trabajo, para obtener los compuestos deseados. (Pinho e Melo, T. M. V. D. 2005).

Además de los usos antes mencionados de estos compuestos, en el Laboratorio de Química Medicinal se ha observado que debido a las propiedades estructurales que poseen estas moléculas y tras observar pequeñas muestras de ellos bajo la luz de una lámpara UV, presentan propiedades fluorescentes; por ello se ha decidido investigar su potencial uso como colorantes, que pueden ser aplicados en técnicas de identificación citogenética.

Actualmente en el mercado existen diversas opciones de colorantes que pueden emplearse para las técnicas descritas en el apartado “2. Técnicas Citogenéticas”, sin embargo, la mayoría de ellos posee alguna desventaja, la principal: son agentes genotóxicos y mutagénicos potenciales, como es el caso de los colorantes más comúnmente utilizados: bromuro de etidio, naranja de acridina y quinacrina (pertenecientes a los fluorocromos intercalantes), solo por mencionar algunos. (Matselyukh, B. et al 2005) Debido a lo anterior, con la evaluación de estos nuevos compuestos sintetizados (a la que se llamó serie LQM 100) se pretende contar con nuevos compuestos que ofrezcan mejores ventajas como colorantes fluorescentes, así como bajo costo de fabricación y bajo nivel tóxico.

## 5. Determinación estructural de compuestos orgánicos mediante técnicas espectroscópicas y espectrometría de masas

---

En el siglo XIX y a principios del XX la determinación de la estructura de un compuesto orgánico era un proceso difícil que consumía mucho tiempo, pero ahora están disponibles técnicas poderosas que simplifican enormemente el problema. (McMurry, J. 2008). A continuación se describen brevemente las cuatro técnicas utilizadas en la caracterización de los compuestos que se han sintetizado y el tipo de información que cada una de ellas nos puede brindar.

### 5.1. Espectrometría de Masas (MS)

---

La espectrometría de masas es una técnica para medir la masa molecular de una molécula. Además, con frecuencia es posible obtener información acerca de las moléculas al medir las masas de los fragmentos producidos cuando se rompen las moléculas.

El espectro de masas de un compuesto se representa típicamente como una gráfica de barras con las masas (valores  $m/z$ ) en el eje  $x$ , y la intensidad, o abundancia relativa de los iones de cierta relación  $m/z$  que llega al detector en el eje  $y$ . Al pico más alto que se le asigna una intensidad del 100%, se llama **pico base**, y el pico que corresponde al radical catión sin fragmentar se llama **pico principal** o ión molecular ( $M^+$ ).

### 5.1.1- Interpretación de los espectros de masas

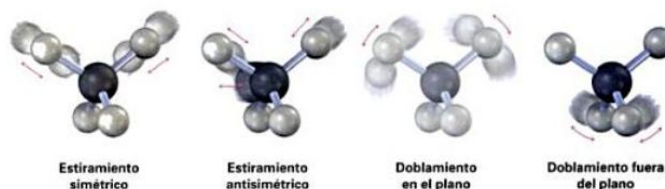
¿Qué tipos de información podemos obtener de un espectro de masas? Ciertamente la información más obvia es la masa molecular, el cual puede ser invaluable por sí mismo. Conocer la masa molecular permite limitar enormemente las opciones de la fórmula molecular.

El espectro de masas de un compuesto también sirve como un tipo de “huella digital molecular”. En una manera única, cada uno de los fragmentos de un compuesto orgánico depende de su estructura, y es pequeña la probabilidad de que dos compuestos tengan espectros de masas idénticos.

También es posible derivar información estructural acerca de una molécula interpretando su patrón de fragmentación, la cual ocurre cuando el radical catión de alta energía sale despedido por la ruptura espontánea de un enlace. Uno de los dos fragmentos retiene la carga positiva y corresponde a un carbocatión, mientras que el otro fragmento es un radical neutro.

### 5.2. Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

Como su nombre lo indica, la espectroscopia de infrarrojo utiliza la región infrarroja (IR) del espectro electromagnético, la cual es útil de los  $4000$  a  $400\text{cm}^{-1}$ . En este rango, todas las moléculas tienen una cierta cantidad de energía y están en movimiento constante. Sus enlaces se estiran y se contraen, los átomos se mueven hacia atrás y hacia adelante y ocurren otras vibraciones moleculares. A continuación se muestran algunos tipos de estas vibraciones:



**Figura 7.** Distintos tipos de vibraciones detectadas por un espectrofotómetro de IR.

Cuando se irradia una molécula con radiación electromagnética, la energía se absorbe si la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia de la vibración. El resultado de esta absorción de energía es una amplitud incrementada por la vibración; en otras palabras, el “resorte” que conecta los dos átomos se estira y se contrae un poco más. Dado que cada

frecuencia absorbida por una molécula corresponde a un movimiento molecular específico, podemos encontrar que tipos de movimientos tienen una molécula midiendo su espectro en el IR.

### 5.2.1. Interpretación de espectros de infrarrojo

Al interpretar estos movimientos, podemos encontrar qué tipos de enlaces (grupos funcionales) están presentes en la molécula. La mayor parte de los grupos funcionales tienen bandas de absorción en el IR características que no cambian de un compuesto a otro. Al aprender en dónde ocurren las absorciones características de los grupos funcionales, es posible obtener información estructural de los espectros de IR.

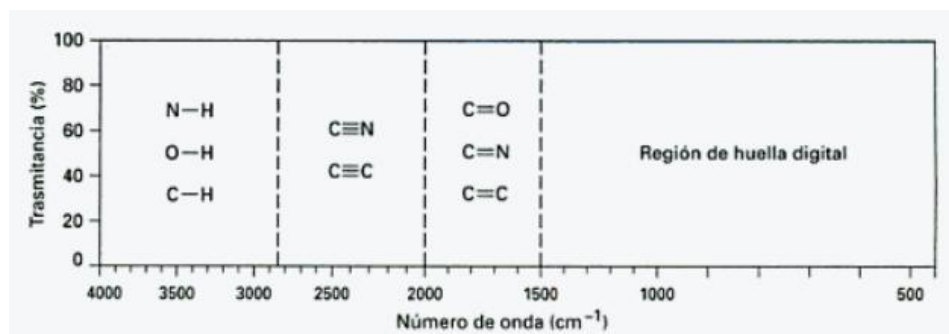
Como se muestra en la Figura 8, es de ayuda recordar la posición de las absorciones de IR específicas para dividir la región IR de  $4000$  a  $400\text{cm}^{-1}$  en cuatro partes:

I) La región de  $4000$  a  $2500\text{cm}^{-1}$  corresponde a absorciones ocasionadas por los movimientos de estiramiento de los enlaces sencillos nitrógeno-hidrógeno, carbono-hidrógeno y oxígeno-hidrógeno (N-H, C-H y O-H).

II) La región de  $2500$  a  $2000\text{cm}^{-1}$  es donde ocurre el estiramiento de los enlaces triples, y los enlaces metino y ciano ( $\text{C}\equiv\text{C}$  y  $\text{C}\equiv\text{N}$ ) absorben aquí.

III) La región de  $2000$  a  $1500\text{cm}^{-1}$  es donde absorben los enlaces dobles ( $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{C}=\text{N}$ , y  $\text{C}=\text{C}$ ).

IV) La región por debajo de los  $1500\text{cm}^{-1}$  es la porción de huella digital del espectro de IR. Una gran cantidad de absorciones debido a que aquí ocurre una variedad de vibraciones de enlaces sencillos carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno y carbono-halógeno (C-C, C-O, C-N y C-X).



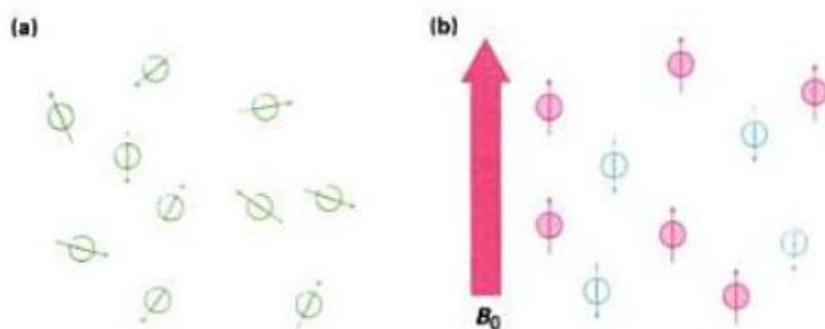
**Figura 8.** Las cuatro regiones del espectro infrarrojo

### 5.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopia de resonancia magnética complementa a las técnicas antes descritas “mapeando” la estructura carbono-hidrógeno de una molécula. En conjunto, la espectrometría de masas, el IR y la RMN hacen posible determinar las estructuras de moléculas muy complejas.

Varios tipos de núcleos atómicos se comportan como si estuvieran girando alrededor de un eje. Debido a que tienen carga positiva, estos núcleos giratorios actúan como pequeños imanes en forma de barra e interactúan con un campo magnético externo ( $B_0$ ). No todos los núcleos actúan de esta manera, pero afortunadamente, el protón ( $^1\text{H}$ ) y el núcleo  $^{13}\text{C}$  tienen momento magnético.

En ausencia de un campo magnético externo, los espines de los núcleos magnéticos se orientan al azar; sin embargo, cuando se coloca una muestra que contiene estos núcleos entre los polos de un imán poderoso, los núcleos adoptan orientaciones específicas. Un núcleo de  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$  girando puede orientarse de tal manera que su propio campo magnético pequeño se alinea con (paralelo a) (rojo) o contra (antiparalelo a) (azul) el campo externo; sin embargo, las dos orientaciones no tienen la misma energía y probablemente no son iguales. La orientación paralela es ligeramente menor en energía por una cantidad que depende de la fuerza del campo magnético, haciendo que este estado de espín esté muy ligeramente favorecido sobre la orientación antiparalela.



**Figura 9.** Orientación de los espines magnéticos por influencia de  $B_0$

Si ahora se irradian los núcleos orientados con radiación electromagnética y ocurre una inversión del espín, se dice que los núcleos magnéticos están en resonancia con la radiación aplicada.



La frecuencia exacta necesaria para la resonancia depende de la fuerza del campo magnético externo y de la identidad de los núcleos. Si se aplica un campo magnético muy fuerte, es mayor la diferencia de energía entre los dos estados de espín y se requiere radiación con mayor frecuencia (mayor energía) para invertir el espín. Si se aplica un campo magnético más débil, se requiere menos energía para efectuar la transición entre los estados de espín nucleares.

Los núcleos de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  no son los únicos en cuanto a su capacidad para exhibir el fenómeno de RMN. Todos los núcleos con un número impar de protones, y todos los núcleos con un número impar de neutrones muestran propiedades magnéticas sin embargo, estos dos son los más utilizados, puesto que las moléculas orgánicas están constituidas en su mayoría por átomos de carbono e hidrógeno.

En un espectro de RMN, el eje horizontal muestra la fuerza del campo efectivo sentida por los núcleos, y el eje vertical indica la intensidad de absorción de la energía de rf; cada señal en el espectro corresponde a un núcleo de  $^1\text{H}$  o de  $^{13}\text{C}$  químicamente distinto en la molécula.

### 5.3.1. Desplazamiento químico

Los espectros de RMN se representan en gráficas que muestran la fuerza del campo aplicado que aumenta de izquierda a derecha; por tanto, la parte izquierda de la gráfica es el lado de menor campo o campo bajo, y la parte derecha es el lado de mayor campo o campo alto. Los núcleos que absorben en el lado de campo bajo de la gráfica requieren una fuerza de campo menor para la resonancia, lo que significa que tienen relativamente menos protección. Los núcleos que absorben en el lado de campo alto requieren una fuerza de campo mayor para la resonancia, lo que significa que tienen relativamente más protección. La posición en la gráfica en la cual absorbe un núcleo se llama desplazamiento químico.

### 5.3.2. RMN- $^{13}\text{C}$

Esta técnica hace posible contar el número de átomos de carbono diferentes en una molécula. Los factores que determinan los desplazamientos químicos son complejos, sin embargo, una tendencia es que se afecta el desplazamiento químico de un carbono por la electronegatividad de los átomos vecinos, absorbiendo a campo bajo (a la izquierda) de los carbonos de alcanos típicos. Debido a que los átomos electronegativos atraen electrones,

*los apartan de los átomos de carbono vecinos, ocasionando que se desprotejan esos átomos y se pongan en resonancia en un campo menor.*

*La determinación derivada de esta técnica es extraordinariamente útil para la determinación de la estructura; no sólo podemos contar el número de átomos de carbono distintos en una molécula, sino que también podemos obtener información acerca del ambiente electrónico de cada carbono e incluso podemos encontrar cuantos protones están unidos a cada uno.*

### 5.3.3. RMN-<sup>1</sup>H

*Debido a que cada hidrógeno electrónicamente distinto en una molécula tiene su propia absorción única, un uso de esta técnica es encontrar cuántos tipos de hidrógeno electrónicamente no equivalentes o diferentes están presentes.*

*En un espectro de RMN-<sup>1</sup>H, el área bajo cada señal es proporcional al número de protones que ocasionan esa señal; al medir electrónicamente, o al integrar, el área bajo cada señal, es posible medir el número relativo de los diferentes tipos de protones en una molécula.*

## HIPÓTESIS

*“Si los compuestos de la familia LQM 100 presentan afinidad por el DNA en su forma desnuda, contenido en micronúcleos o condensada en forma de cromosomas, entonces se podrá observar esta afinidad mediante la fluorescencia emitida por la unión entre los compuestos de la serie LQM 100 y el DNA en un microscopio de fluorescencia”*

## MÉTODOS

### A) Síntesis química

---

#### I- 3,5 dimetilisoxazol (LQM 101)

---

Para formar la estructura base (3,5 dimetilisoxazol) de los compuestos evaluados se llevó a cabo una condensación-ciclización, utilizando 2,4 pentanodiona y cloruro de hidroxilamina. Algunas referencias mencionan que adicionando ácido acético a esta reacción se mejora el rendimiento para obtención del 3,5 dimetilisoxazol (Ávila, G. et al. 2009). Para que la reacción se lleve a cabo se colocó a reflujo (aproximadamente 45 -60 minutos) utilizando luz infrarroja y se siguió la cinética de formación del isoxazol mediante cromatografía en capa fina. Una vez terminada la reacción, el matraz se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a neutralizar la mezcla de reacción con hidróxido de sodio, tras la neutralización se observan dos fases, estas se extrajeron con acetato de etilo realizando un total de tres extracciones. Los extractos orgánicos se reunieron y se eliminó el agua con sulfato de sodio anhidro para su posterior concentración. El concentrado obtenido es el 3,5 dimetilisoxazol, el cual es un líquido de color ámbar y olor característico.

#### II- 3,5 dimetil 4-nitroisoxazol (LQM 102)

---

Se pesó una muestra del concentrado anteriormente obtenido y se colocó en un baño de hielo con agitación. Posteriormente se adicionó gota a gota ácido sulfúrico, al terminar, se adicionó gota a gota ácido nítrico; esta mezcla se dejó agitar 30min para la posterior adición de ácido sulfúrico. Después de esta última adición se dejó agitando la mezcla de reacción 12hrs. Transcurrido el tiempo de reposo, se agregó hielo a la mezcla de reacción para favorecer la precipitación. Cuando se formó una gran cantidad del precipitado, éste se separó por filtración a vacío, haciendo tres enjuagues con agua destilada. El precipitado se recristalizó con acetato de etilo.

#### III- Compuestos LQM 103, 107, 112, 115 y 123

---

Para obtener cada uno de estos compuestos, se utilizó el 3,5 dimetil 4-nitroisoxazol que fue disuelto en etanol junto con un aldehído de elección (p-hidroxialdehído,

*o*-clorobenzaldehído, 2,4-dimetil benzaldehído, 4-fenoxi benzaldehído y teraftaldehído, respectivamente). Para favorecer la reacción de conjugación que debe llevarse a cabo, se adicionó piperidina. La mezcla de reacción se puso a calentar a reflujo utilizando luz infrarroja; alrededor de 45 min-1 h, se observó un precipitado en el matraz. Después se enfrió el matraz a temperatura ambiente, el precipitado se recuperó filtrando a vacío enjuagando con etanol tres veces. Posteriormente se determinó su pureza mediante cromatografía en capa fina, si el compuesto no estaba puro, se recristaliza con cloroformo o acetato de etilo, según sea el caso.

### *B) Caracterización*

---

*A los compuestos sintetizados, se les analizaron sus propiedades organolépticas y se llevaron a cabo pruebas de solubilidad, se determinó su punto de fusión utilizando capilares abiertos y se corroboró su estructura por medio de técnicas espectroscópicas: IR con el espectrómetro Nicolet iS10 FT-IR de la marca Thermo Scientific®; RMN<sup>13</sup>C y RMN<sup>1</sup>H utilizando DMSO o cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como disolvente y Espectrometría de Masas (MS).*

### *C) Evaluación de la fluorescencia*

---

#### **I- Técnica de Micronúcleos**

---

*Para llevar a cabo esta técnica, se administró ifosfamida (60mg/kg) a dos ratones, esta sustancia permitirá la formación de micronúcleos. A las 48h, se obtuvo sangre periférica de cada ratón, mediante un corte en la parte distal de la cola con previa analgesia tópica de la zona. Cada gota obtenida de dicho corte, se colocó sobre un portaobjetos y se realizó el frotis. Los frotis se dejaron secar brevemente para posteriormente fijarlos con metanol frío durante 10min.*

## *II- Preparaciones cromosómicas de médula de ratón*

*A los mismos animales de la técnica de micronúcleos se les administró colchicina al 0.04% (7.55µg/g peso), después de media hora de administración de la ifosfamida. Pasadas 2h de la administración, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo el fémur. Al fémur se le cortaron las epífisis y con una jeringa se enjuagó el interior del hueso con solución de cloruro de potasio (KCl) a 37°C para extraer células de la médula. Una vez obtenidas las células de la médula, se colocó a 37°C durante media hora y posteriormente se le adicionó solución fijadora metanol:ácido acético 3:1. Tras la primera adición de solución fijadora, se centrifugó la mezcla y se hicieron tres lavados y tres centrifugaciones con solución fijadora. Después de la última centrifugación, se dejan unos cuantos mL de la solución y se resuspendió la médula. El paquete celular se goteó sobre un portaobjetos. Las laminillas se fijaron con calor.*

## *III- Electroforesis de DNA sobre geles de agarosa*

*Se preparó un gel de agarosa al 1%, pesando este polvo en una balanza analítica y disolviéndola en agua caliente, sobre la cámara electroforética, utilizando un peine con 10 pozos. Una vez gelificado, se dividió el gel en tres partes. En cada parte se colocaron en dos pozos las muestras de DNA (5µL), etiquetadas como muestra 5 y 3 de concentración 22.36ng/µg y 29.63 ng/µg respectivamente, previamente mezcladas con buffer de carga (2µL). Dispuestas todas las muestras, se corrió el gel a 120V por 25min. Al término de la electroforesis se observó el gel en un transiluminador y se observó la integridad del DNA.*

## *IV- Tinciones fluorescentes*

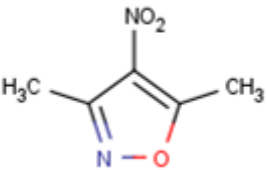
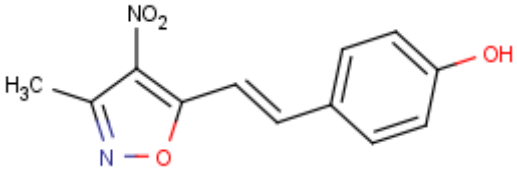
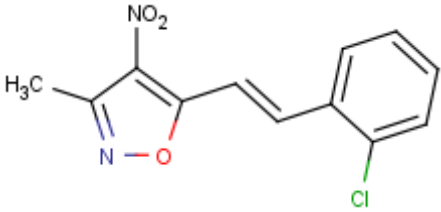
*Se prepararon soluciones de distintas concentraciones de los cinco compuestos LQM 100 sintetizados, en DMSO. Se depositaron 30µL de cada solución sobre las laminillas y frotis, después de ello se colocó un cubreobjetos y se dejaron secar 5min en un lugar oscuro. Transcurrido el tiempo se observó al microscopio de fluorescencia de la marca Accu-Scope® y se obtuvieron imágenes de lo observado con la cámara Micrometrics 390CU® y el Software Micrometrics® SE, acoplados al microscopio de fluorescencia.*

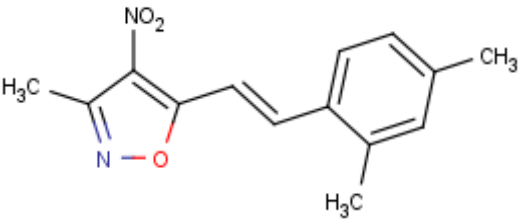
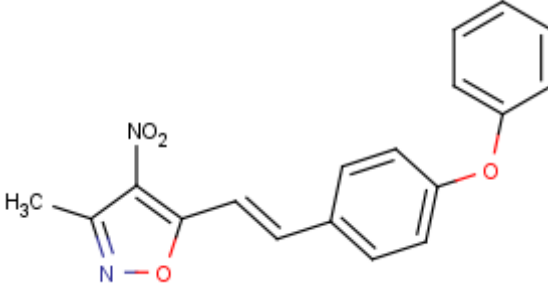
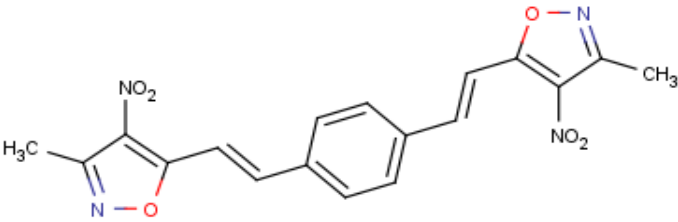
*Del mismo modo, una vez que los geles de agarosa fueron corridos en la cámara de electroforesis, se enjuagaron con DMSO para eliminar el exceso de buffer de corrimiento que pudiera existir. Posterior a este enjuague (aproximadamente 5min) se colocó cada gel en un recipiente de tamaño mediano y se vertió directamente una solución al 0.1% del compuesto a evaluar. Se dejó que tiñera por 10min y se enjuago nuevamente con DMSO, para posteriormente observarlo en el transluminador.*

## RESULTADOS

La primera parte de este trabajo consistió en la síntesis química de los compuestos que tras ser observados bajo luz UV mostraron fluorescencia. Para ello, como se mencionó anteriormente, se necesitan dos pasos principales: una condensación-ciclización y una conjugación. Los compuestos que fueron evaluados para el desarrollo de este trabajo, fueron el resultado de ambas reacciones. Una vez purificados, se evaluaron sus características organolépticas, las cuales se muestran en la Tabla 1, donde cabe resaltar que los cinco compuestos sintetizados, en efecto, presentan una fluorescencia particular cuando fueron observados bajo luz UV. Asimismo, en la Tabla 1, se muestra el rendimiento calculado de cada una de las reacciones efectuadas, resaltando, de forma general, que se obtuvo un muy buen rendimiento con valores mayores al 85%. Además se presentan las características del compuesto LQM 102 (producto de la reacción de condensación-ciclización), el cual es la base para la síntesis de los compuestos conjugados.

**Tabla 1.** Estructura, características físicas, rendimiento y peso molecular (PM) de los 5 compuestos evaluados.

Estructura	Características físicas	Rendimiento (%)	PM (g/mol)
	<p>Hojuelas blancas de olor característico (pólvora)</p>	90	142.11
	<p>Láminas pequeñas de color anaranjado fluoresce anaranjado bajo luz UV</p>	92	246.22
	<p>Cristales en forma de aguja de color verde claro fluoresce verde bajo luz UV</p>	90	264.66

Estructura	Características físicas	Rendimiento (%)	PM (g/mol)
	Cristales amorfos de color verde claro fluoresce verde bajo luz UV	89	258.27
	Cristales amorfos de color amarillo fluoresce amarillo bajo luz UV	94	322.31
	Polvo aglomerado de color amarillo fluoresce amarillo bajo luz UV	88	382.33

Debido a que la gran mayoría de las pruebas citogenéticas que se efectúan en un laboratorio, incluyendo las que fueron evaluadas en este trabajo, requieren el uso de agua en alguno de sus pasos, y considerando que la solubilidad forma parte de la caracterización fisicoquímica de los nuevos compuestos que se obtuvieron, se evaluó la solubilidad de cada uno de ellos en distintos solventes.

El primer solvente utilizado fue el agua, sin embargo tras evaluar la solubilidad en esta, se observó que ninguno de los compuestos era soluble en ella. De este modo, se evaluó su solubilidad en otros disolventes; estos resultados se muestran en la Tabla 2, donde se puede apreciar de forma importante que la mayoría de ellos es medianamente o talmente soluble en DMSO, solvente que fue elegido como idóneo para utilizar en la evaluación posterior de estos compuestos.

Por otro lado, dentro de la misma caracterización de los compuestos, se determinó el punto de fusión mediante Fisher-Johns, que además sirve como un indicador de pureza,



datos que de igual forma se muestran en la Tabla 2; en ellos se puede apreciar que los intervalos de fusión de cada compuesto son muy cortos, por lo que se puede descartar la presencia de impurezas en los compuestos evaluados.

**Tabla 2.** Punto de fusión y Solubilidad de los 5 compuestos evaluados.

LQM	Punto de fusión (°C)	Solubilidad					
		Metanol	DMSO	Agua/HCl	Ac. Acético	Acetonitrilo	Metanol/ Ac acético 3:1
<b>103</b>	216-218	++	+++	-	++	+++	+++
<b>107</b>	162-164	-	+++	-	+++	+++	-
<b>112</b>	160-162	+	++	-	++	+	+
<b>115</b>	136-138	++	+++	-	+++	+++	+
<b>123</b>	298-300	+	++	-	-	++	-

Donde:

Símbolo	Significado	Símbolo	Significado
-	Insoluble	++	Medianamente soluble
+	Poco soluble	+++	Totalmente soluble

Posterior a la caracterización fisicoquímica de los compuestos de la familia LQM 100, se determinó la estructura de dichos compuestos mediante las técnicas de espectroscopia de IR, RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ , con el fin de corroborar que el compuesto obtenido sea el mismo que aquel que fue diseñado antes de la síntesis, es decir, que sea la misma molécula objeto que se había planteado en un principio. En la Tabla 3, 4 y 5 se muestran las señales significativas que se pueden observar en los espectros de cada uno de los compuestos para IR y RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  respectivamente. Los espectros de los cuales fue obtenida la información recopilada en las siguientes tablas, pueden verse en el apartado etiquetado como Anexos.

**Tabla 3.** Bandas características en el espectro IR de los compuestos obtenidos

Compuesto LQM	102	103	107	112	115	123
Grupo funcional	Banda (cm <sup>-1</sup> )					
-NO <sub>2</sub>	1359 y 1500		1485-1516 y 1352-1377			
-C=C-	1602.5		1600-1633			
-C=N-	1453.97					
-CH <sub>3</sub>	1416.77		1415-1440			
Carbonos aromáticos	/		2000-1600			
-C <sub>sp<sup>3</sup></sub> -H	2870.69		2900-3000			
-OH	/	3215-3530	/	/	/	/
-Cl	/	/	500-800	/	/	/
-O-Ph	/-	/	/	/	1000-1300	/

**Tabla 4.** Señales características de RMN-<sup>13</sup>C de los compuestos obtenidos

Compuesto LQM	102	103	107	112	115	123
Tipo de Carbono	Señal (ppm)					
Metilo (anillo isoxazol)	14.3 y 11.9	-		11.5-13.5		-
Carbono cuaternario (C=N)	155.973	-	156.47	155.79	156.21	-
Carbono cuaternario (C=O)	172.236	-	157.24	156.27	157.04	-
Carbono cuaternario (C-NO <sub>2</sub> )	*	-	114.56	110.66	110.22	-
Metilenos (C=C)	/	-	128-137	125-142	119-143	-
Carbonos aromáticos	/	-				-
Metilos (anillo bencénico)	/	-	/	19.50 y 21.57	/	-
Carbonos aromáticos (O-Ph)	/	-	/	/	156-168	-

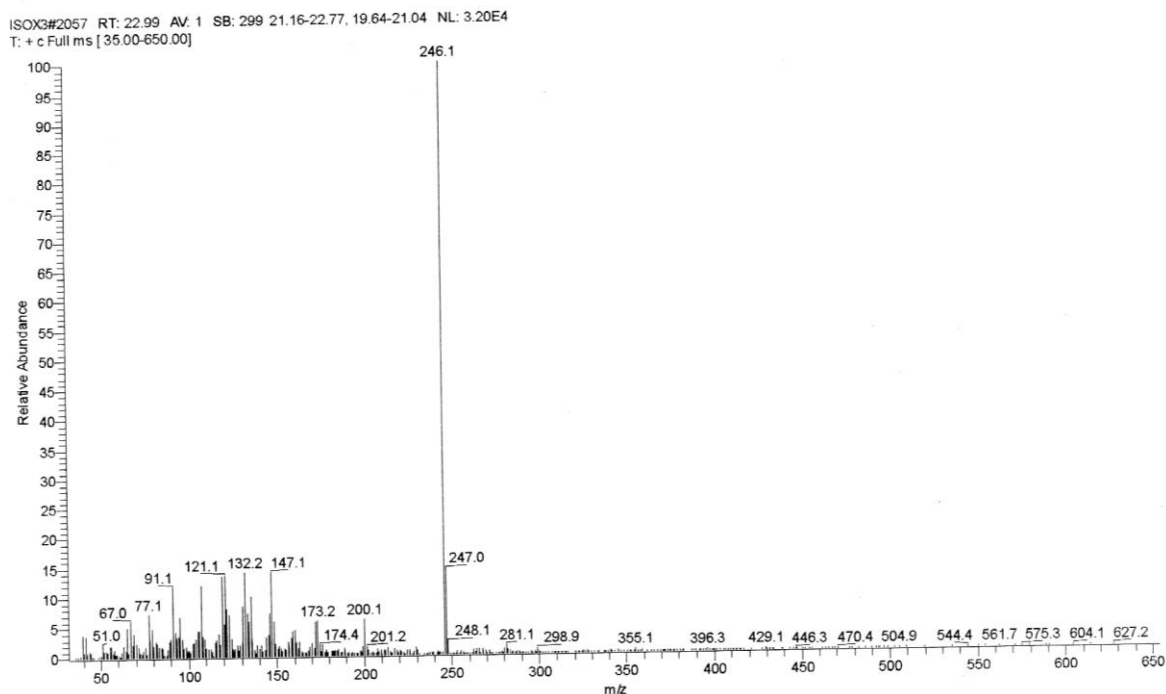
**Tabla 5.** Señales características de RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos obtenidos

Compuesto LQM	102	103	107	112	115	123
<b>Tipo de Hidrógeno</b>	<b>Señal (ppm)</b>					
-CH <sub>3</sub> (anillo isoxazol)	2.55 y 2.81	2.4	2.3	2.36	2.5	-
-CH (grupo vinilo C=C)	/	6.8-7.0	7.0-7.4	6.9-7 y 1.15-7.21	7.0-7.15	-
Protones bencénicos	/	7.3-8.8	7.4-7.8	7.07-7.11 y 7.56-7.67	7.2-8	-
-OH	*	/	/	/	/	-
-CH <sub>3</sub> (Anillo benceno)	/	/	2.46 y 2.60	/	/	-
Protones bencénico (O-Ph)	/	/	/	7.2-8	/	-

Donde:

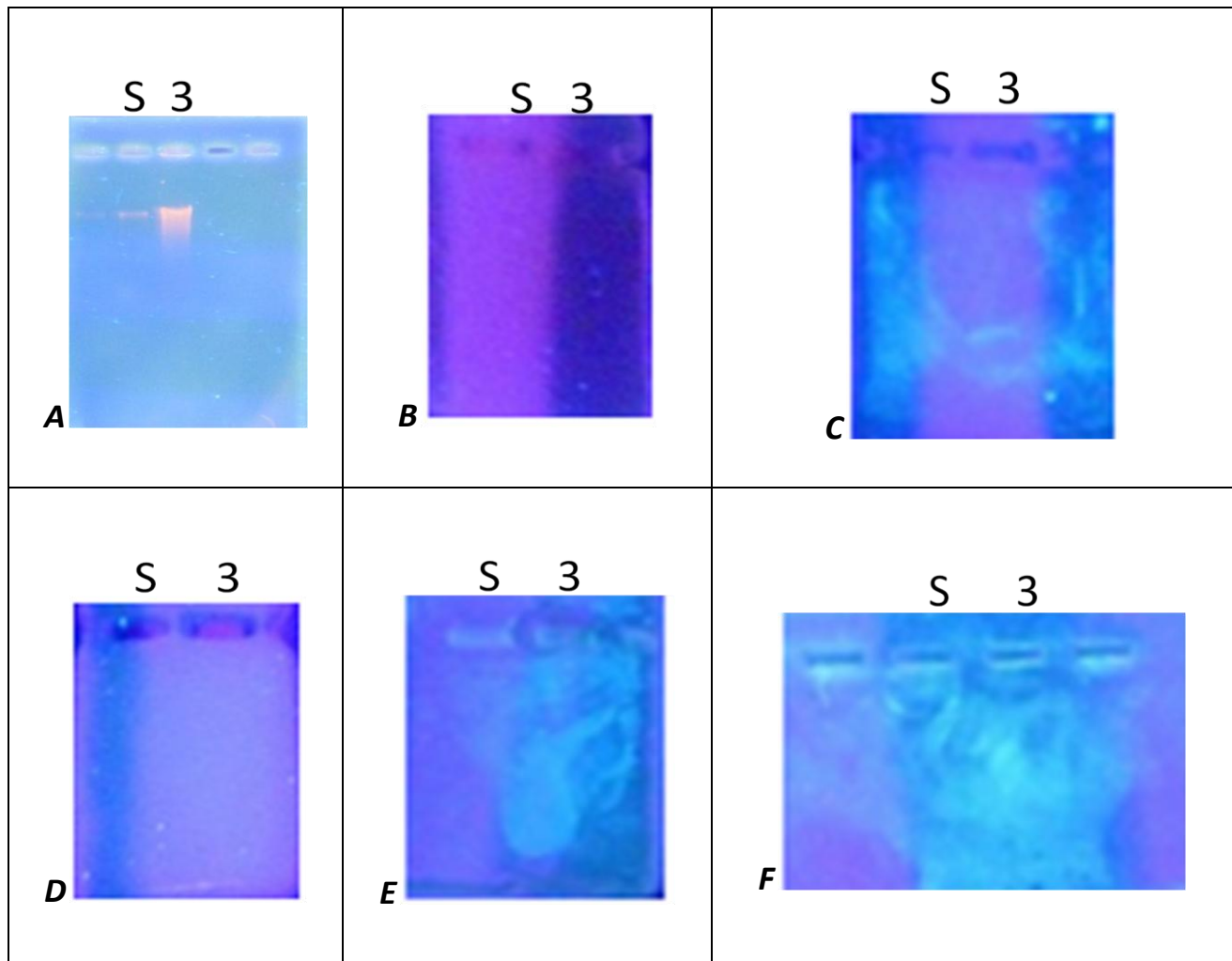
Símbolo	Descripción	Símbolo	Descripción
/	Grupo funcional no presente en la molécula	*	Ausencia de la señal en el espectro
-	Espectro no disponible		

Además, se obtuvo el espectro de masas sólo del compuesto LQM 103, el cual se muestra en la Figura 10; en este espectro se puede observar que el pico base o ión molecular ( $M^+$ ) tiene una relación masa/carga ( $m/z$ ) de 246.1, el cual corresponde con el peso molecular calculado teóricamente para el compuesto en cuestión. Dentro de este espectro cabe destacar el pico que tiene la relación  $m/z$  de 200.1, el cual corresponde a la fragmentación típica del grupo nitro, que, al observar la estructura del LQM 103, este compuesto posee.

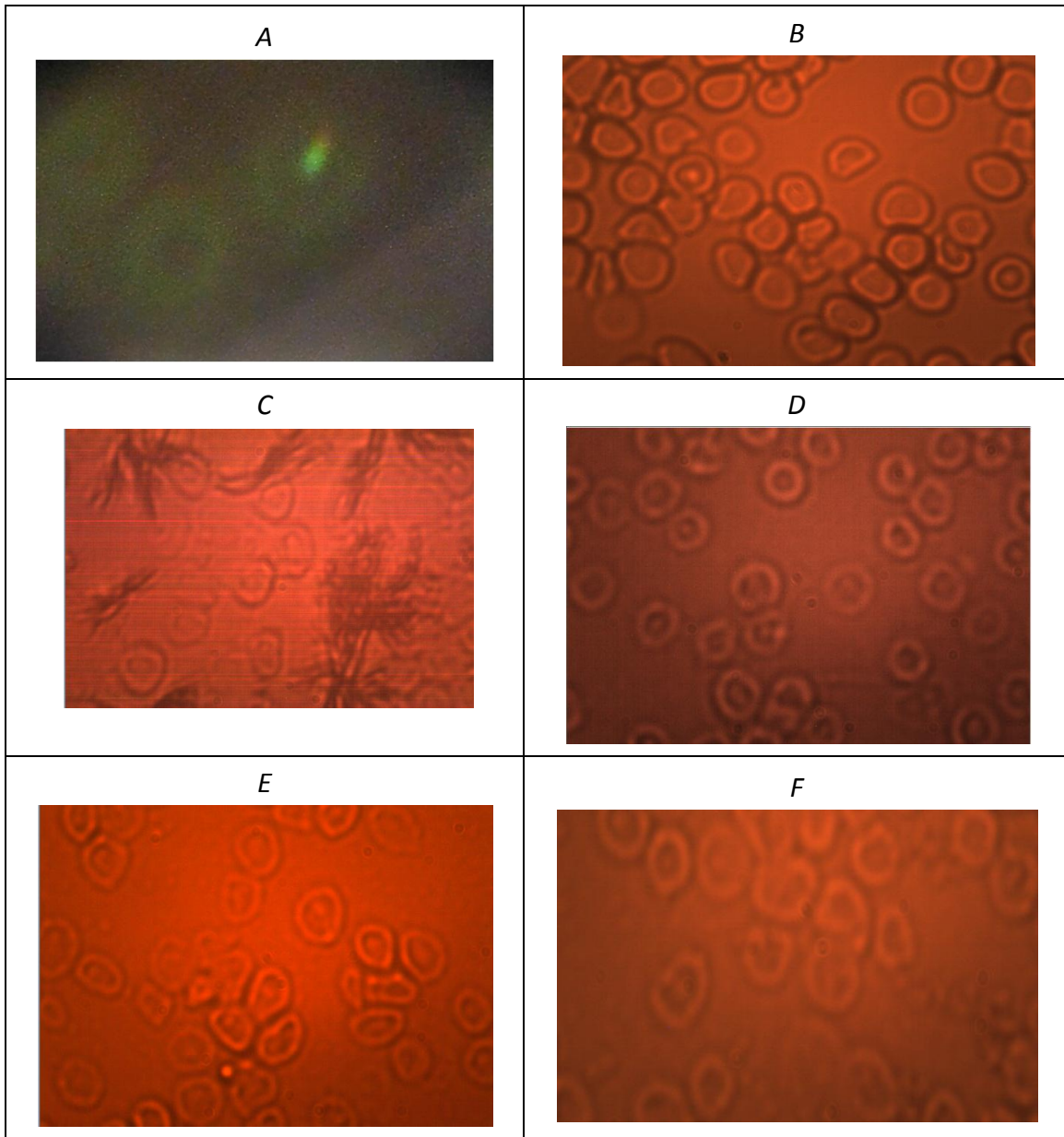


**Figura 10.** Espectro de Masas del compuesto LQM 103

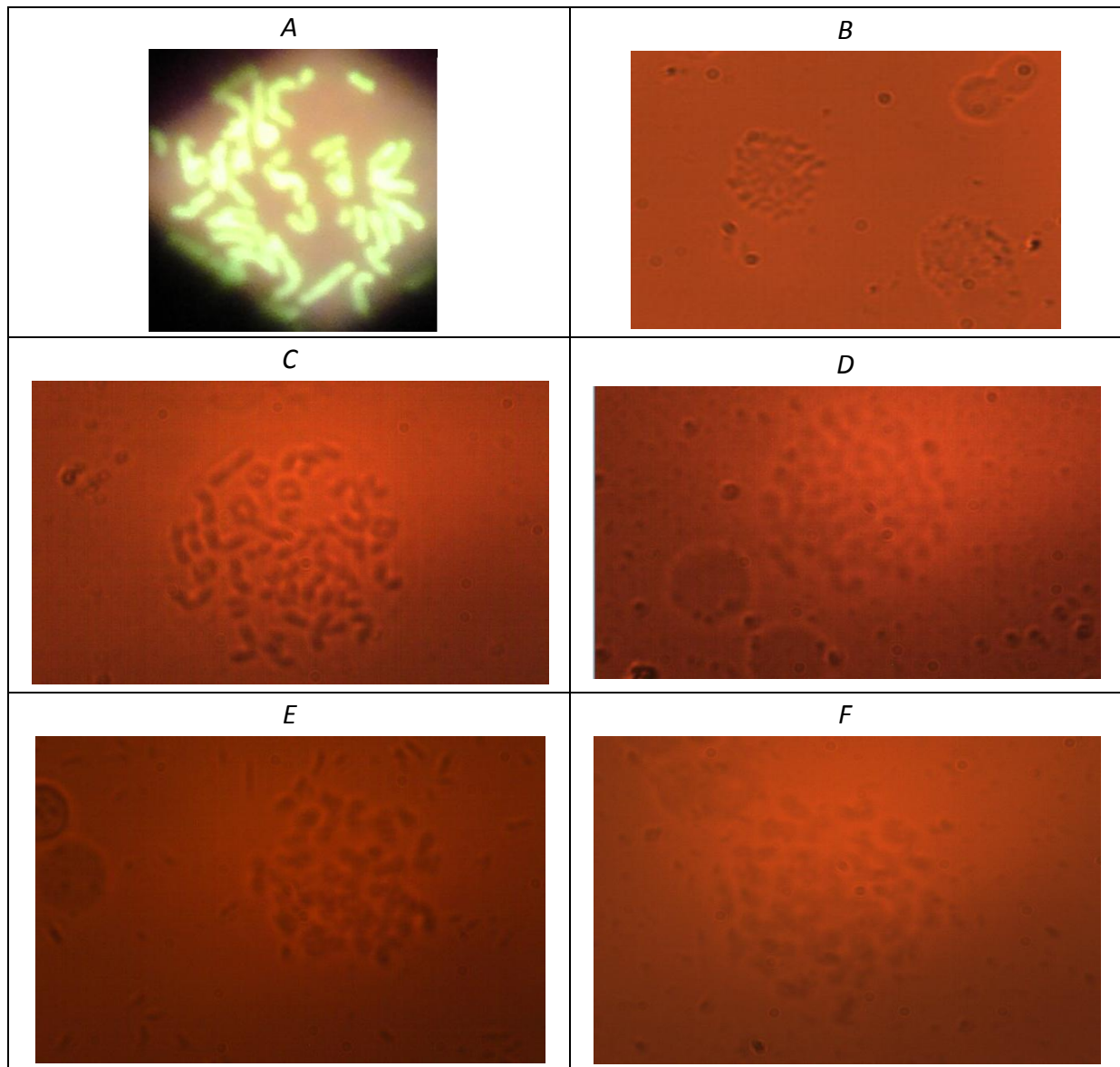
Una vez comprobado que la estructura de los compuestos sintetizados corresponde con la que se había planteado inicialmente, se procedió a evaluar su posible uso como colorantes fluorescentes, aplicando dichos compuestos como colorantes en distintas pruebas citogenéticas: Electroforesis de DNA en gel de agarosa, Prueba de micronúcleos y Laminillas con cromosomas de Médula Ósea. A continuación se muestran las imágenes obtenidas (Figuras 10, 11 y 12), en el caso de los geles de electroforesis, tras observar dichos geles bajo la luz UV de un transluminador; en el caso de lo prueba de micronúcleos y las laminillas con cromosomas, se muestran las imágenes captadas mediante la cámara del microscopio de fluorescencia utilizado.



**Figura 11.** Geles de agarosa (1%) para electroforesis de DNA utilizando (A) Bromuro de etidio, (B) LQM 103, (C) LQM 107, (D) LQM 112, (E) LQM 115 y (F) LQM 123 como colorantes; eluidos a 120V, durante 30min, utilizando las muestras etiquetadas como S y 3, ambas con una concentración de 22.36ng/ $\mu$ g y 29.63 ng/ $\mu$ g respectivamente.



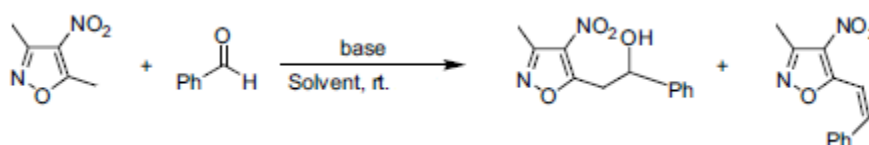
**Figura 12.** Laminillas de frotis sanguíneo con micronúcleos (40X) teñidas con (A) Naranja de Acridina, (B) LQM 103, (C) LQM 107, (D) LQM 112, (E) LQM 115 y (F) LQM 123. Los micronúcleos tienen la forma de pequeños puntos fluorescentes dentro del eritrocito, como se puede apreciar en (A), dichos puntos fluorescentes no se observan en el resto de las laminillas. En la laminilla etiquetada como (C) se observan, incluso, cristales de colorante precipitados.



**Figura 13.** Laminillas de médula ósea con cromosomas (40X) teñidas con (A) Naranja de Acridina, (B) LQM 103, (C) LQM 107, (D) LQM 112, (E) LQM 115 y (F) LQM 123. En todas las laminillas se observa la presencia de cromosomas, sin embargo en ninguna de ellas, a excepción de (A), se aprecian teñidos fluorescentemente.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

La reacción que sirvió como base para llevar a cabo la síntesis de los compuestos de la familia LQM 100, es la reacción de Henry, la cual consiste de forma general en la conjugación de un compuesto carbonílico y un compuesto alquilnitro, para obtener la formación de un enlace carbono-carbono entre las moléculas conjugadas. La forma esquemática de representar esta reacción se muestra en la Figura 14. (Adamo, M. y cols. 2009).



**Figura 14.** Reacción de Henry

El resultado de la reacción es una mezcla racémica de un compuesto con un grupo  $-OH$  y otro con un doble enlace en lugar del grupo hidroxilo. El rendimiento y el favorecimiento de la formación de un solo producto en esta reacción ésta en función del solvente y la base utilizados como medio en la reacción. De esta forma, con el método utilizado se encontró que utilizando como base piperidina y como solvente etanol, tras un tiempo promedio de 90 min de reflujo, el rendimiento de la reacción fue mayor al 85% para los cinco compuestos sintetizados y evaluados en este trabajo, favoreciendo de esta forma la formación del compuesto que posee un enlace vinílico entre el anillo isoxazol y el anillo fenol del aldehído conjugado.

Para poder corroborar que el producto propuesto fue el obtenido, así como corroborar que los productos finales (LQM 103, 105, 107 112 y 123) fueron los esperados, después de su purificación y caracterización fisicoquímica, fueron obtenidos sus espectros de IR, RMN- $^1H$ , RMN- $^{13}C$ , y en alguno de los casos MS (esto debido a la poca accesibilidad que se tiene a los equipos), para corroborar que corresponden con los compuestos esperados teóricamente.

Con base a la información contenida en las Tablas 4, 5 y 6 se puede afirmar que los compuestos sintetizados son los que se esperaban obtener; asimismo, podemos decir que



su síntesis se ve favorecida por el uso en la reacción de la base: piperidina y utilizando etanol como solvente.

Cabe destacar, como se puede ver en los espectros obtenidos (Ver Anexos) cuando es muy poco el número de acumulaciones (nt) que se deja una muestra en el espectrómetro, la relación señal/ruido es muy pobre, esto debido a la baja abundancia natural de  $^{13}\text{C}$  (1.1%) lo que significa que cualquier espectro de RMN individual es extremadamente "ruidoso". Esto es, las señales son tan débiles que están atestadas con ruido electrónico aleatorio de fondo. Por lo que es recomendable que los ciclos sean los suficientes, hasta que la relación señal/ruido mejore, y de esta forma poder asignar más fácilmente cada una de las señales que se obtengan.

Después de haber corroborado que los compuestos obtenidos son los compuestos que se esperaban, se llevaron a cabo las pruebas citogenéticas que nos permitieron evaluar si los compuestos que se sintetizaron tienen afinidad por el DNA y, asimismo, si esta unión sirve como marcaje fluorescente del mismo.

En las pruebas citogenéticas que se realizaron se utiliza de forma ordinaria, como medio de preparación de distintas soluciones (incluidas las soluciones de colorante), el agua; sin embargo, durante la síntesis, específicamente en el proceso de purificación, se observó que los compuestos que se habían sintetizado eran insolubles en la misma. Por tal motivo, además de formar parte de la caracterización de cada compuesto, se probó la solubilidad del compuesto en algunos otros solventes, como se muestra en la Tabla 2, encontrándose así que el solvente más adecuado y con opción de no tener efectos sobre las laminillas, en el que estos compuestos se disolvían en mayor medida era el DMSO. Se pensó en un principio que este solvente podía intervenir de mala forma en alguna de las pruebas, en específico, en el análisis de la integridad del DNA en geles de agarosa; para observar si este solvente ejercía algún efecto en particular, se colocó una porción de un gel de agarosa al 1% en DMSO, y este se observó a distintos tiempos, encontrándose así que en tiempos prolongados (mayor a 30min), los geles se adelgazaban, por lo que a la hora de la tinción se dejó el gel bajo el colorante sólo 20min. Lo que provocó el adelgazamiento de los geles es debido a que el DMSO solubiliza fuertemente a la agarosa, por lo tanto al estar en contacto durante la tinción, la agarosa comienza a disolverse, provocando así la disminución de su tamaño. (Ling, H. et al. 2011).

A pesar de lo anterior, se realizaron algunos otros intentos para poder solubilizar estos compuestos en agua; una de estas formas fue tratando de obtener la forma salina del compuesto, tratándolo con distintos tipos de ácidos desde ácido sulfúrico, clorhídrico, tartárico, fórmico, entre otros; dando un resultado negativo. De igual forma, se

*prepararon soluciones buffer de distintos pH, pero el resultado fue nulo también. Esto último ayudó también a calcular teóricamente los pKa de los compuestos, estos fueron de signo negativo, a excepción del compuesto 103, cuyo grupo hidroxilo es el responsable del pKa que tiene (9.4); además, este compuesto en particular, presenta distintos tipos de coloraciones cuando el pH cambia, simulando un indicador de pH.*

*De esta forma, se evaluaron entonces los compuestos en tres distintas pruebas, con el fin de probarlo en las distintas formas que se puede encontrar el DNA: de forma “desnuda”, que se evaluó con las tinciones sobre geles de agarosa; en forma de cromosoma, que se evaluó mediante la tinción de cromosomas obtenidos de médula ósea de ratón y condensado sin forma peculiar dentro de la célula, que se evaluó en la técnica de micronúcleos.*

*Con lo que respecta a la prueba de electroforesis de DNA sobre geles de agarosa, cuyos resultados se muestran en la Figura 11, se puede observar que las bandas de DNA no son perceptibles debido a que no fueron teñidas, es más ni siquiera son apreciables al ser vistas en el transluminador; lo que se aprecia fluorescente en los geles, es el compuesto evaluado que precipitó, a pesar de manejar ésta técnica con DMSO. Cabe la posibilidad que la cantidad de agua con que se prepara el gel o el contenido acuoso del buffer de corrimiento, facilitaron dicha precipitación; esto también se trató de solucionar, evaluando geles en los cuales se colocó el colorante directamente con la muestra en el pozo y los que fueron teñidos después de la corrida directamente en un recipiente con colorante, sin embargo no se observó algún cambio importante, puesto que en ambos intentos, el compuesto precipitaba. Otro factor que al final también pudo afectar sobre esta técnica es el uso del DMSO el cual, a pesar de que se evaluó su efecto sobre el gel de agarosa, en conjunto con el colorante pudiera crear interferencia y afectar directamente la muestra de DNA.*

*Por otro lado, es bien sabido que los eritrocitos de los mamíferos no tienen núcleo, por lo que si dentro del eritrocito se observan pequeños núcleos, estamos hablando de micronúcleos, estos micronúcleos se forman mediante distintos mecanismos, pero se trata de cromosomas o parte de ellos que quedan fuera del núcleo durante la mitosis (Zamora, A. 2008); este nos sirvió de criterio para determinar la presencia o no de los mismos. Si observamos la Figura 12, se aprecia que a pesar de la presencia de micronúcleos, estos no están teñidos de forma selectiva, impidiendo de cierta manera su observación clara en el frotis, como en el caso de la imagen de la Figura 12 (A), donde se aprecia un punto más brillante en la imagen, que la naranja de acridina (afín al DNA) tiñó.*

*En lo referente a la evaluación de la tinción de cromosomas, se puede apreciar en la Figura 13, que los cromosomas no se ven teñidos en su totalidad o ciertas regiones específicas de los mismos (bandas), como se puede apreciar en la Figura 13 (A), donde el naranja de acridina tiñó los cromosomas en su totalidad. Debido a los problemas de solubilidad y los inconvenientes que durante la experimentación se suscitaron, se decidió enjuagar las laminillas, así como no hacerlo y observar cada una al microscopio. Con lo anterior, se observó que cuando las laminillas no se enjuagaban, había cristales del compuesto, además de que el campo se notaba muy saturado.*

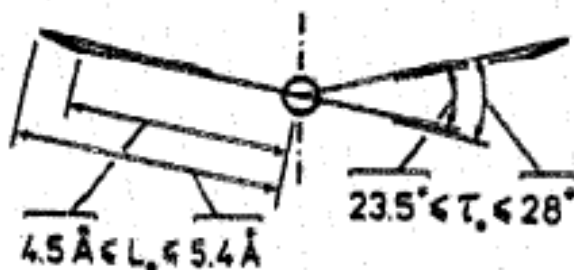
*Así entonces, recapitulando el hecho de que los compuestos que se sintetizaron no fueron capaces de teñir el DNA en sus diferentes presentaciones, se debe de forma mayoritaria a problemas estructurales, puesto que en investigaciones que se han realizado (Stockert, J. et al. 2005). (Kahne, D. 1995), se ha demostrado que los fluorocromos más utilizados (aquellos que se unen al surco menor del DNA rico en adenina-timina [A-T]) deben tener ciertas características: “(a) Estado catiónico, (b) forma no-rígida y arqueada, y (c) que formen puentes de hidrógeno para los átomos aceptores N3 y O2 de A y T, respectivamente.” Sin embargo, en este mismo se explica que la capacidad de formar puentes de hidrógenos con los átomos antes mencionados es la característica más importante: “Entre los parámetros estructurales de los fluorocromos para DNA evaluados, solo la formación de puentes de H mostró una correlación positiva. Otros parámetros como la carga eléctrica o la curvatura del ligando y su correspondencia cercana a la curvatura del DNA, parecen ser irrelevantes al respecto, a pesar de que un estado catiónico y una curvatura adecuada para situar los átomos de H ligantes en la posición correcta para formar enlaces de H fueron importantes prerrequisitos que fueron cumplidas por los fluorocromos.” (Stockert, J. et al. 2005).*

*Lo anterior es debido al grupo amino que poseen algunos de estos colorantes como el 4'-6 diamidino 2-fenilindol (DAPI) y el Hoechst 33258, el cual favorece la formación de estos puentes de hidrógeno: “Entre todas las características aquí contempladas, los fluorocromos H-enlazantes (ej. Que contienen mayor número de grupos N-H) están más cerca de encajar en el surco menor del DNA y formar enlaces de H con los pares de bases AT. En contraste, el voluminoso grupo amino de la guanina en el par guanina-citosina (GC) no permite la interacción específica de estos fluorocromos con el surco menor. En el caso de los fluorocromos catiónicos no H-enlazantes, parece lógico el asumir que se unen al DNA debido a fuerzas electrostáticas.” (Stockert, J. et al. 2005).*

*También se sabe que fluorocromos recientemente sintetizados que contienen el grupo tiazol o oxazol en su estructura (similares al grupo isoxazol de los compuestos sintetizados*

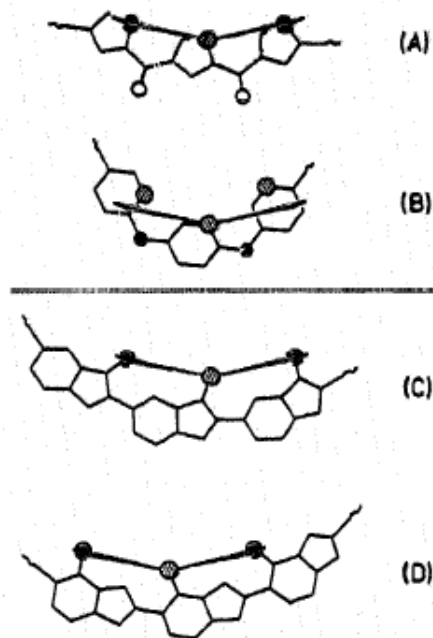
para este trabajo) son intercalantes y no ligandos enlazantes del surco menor. (Stockert, J. et al. 2005).

Además se ha propuesto, mediante estudios computacionales, una especie de plantilla que reúne características “ideales” para nuevos fluorocromos que pretendan ser sintetizados (Zasedatelev, A. S. 1991): “Los diagramas polares  $L_0$ ,  $\tau_0$  (Figura 14) pueden ser usados como un plantilla que determina las tres posiciones subsecuentes de los átomos donadores de H en la molécula del ligando. Cuando el átomo de en medio es impuesto en el círculo, los centros de ambos hidrógenos vecinos deben encajar o ajustarse a los pequeños segmentos mostrados con líneas gruesas.



**Figura 15.** Diagrama Polar  $L_0$ ,  $\tau_0$  que provee el plantilla útil para revisar la posiciones de los tres átomos unidos a H subsecuentes.

De esta forma, los esqueletos pirrol-cetona (A) son bastante buenos, pero casi fuera del límite inferior de los valores permitidos de  $L_0$ . Los esqueletos piridil-amino (B) claramente demuestran una baja posibilidad de ser usado para diseñar futuros fluorocromos para DNA. Así, nuevos motivos estructurales se han sugerido (C, D), las cuales tienen una mejor coincidencia con la plantilla. Por lo tanto estos motivos son más adaptables a las desviaciones locales de la conformación real del DNA”, como se muestra en la Figura 15:



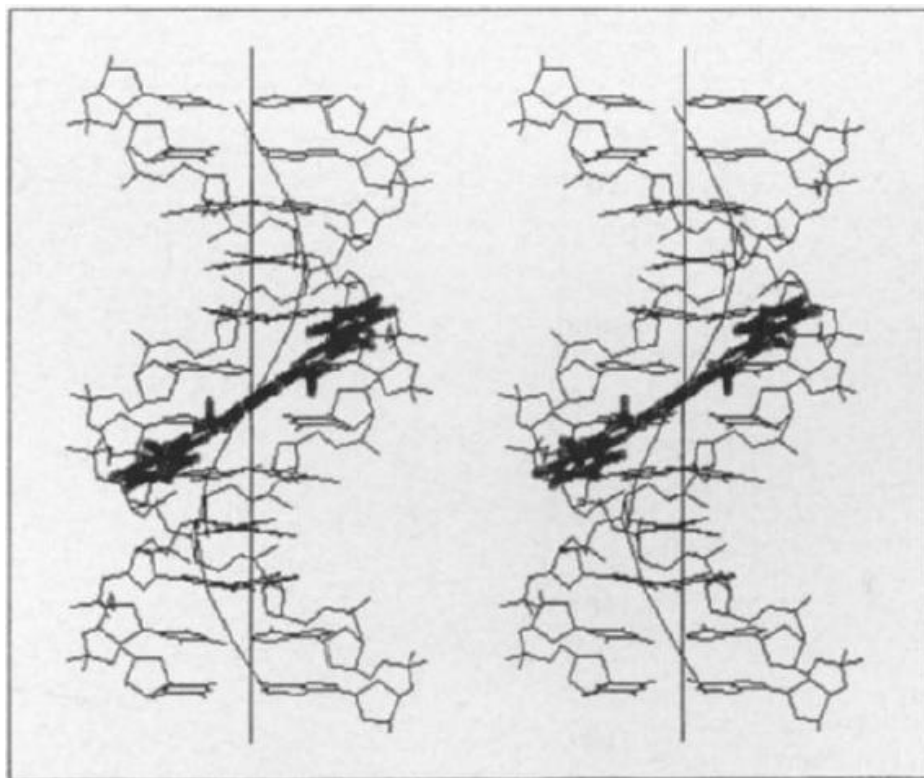
**Figura 16.** Plantilla con posibles grupos capaces de interaccionar con el DNA (A) y (B) isolexinas sugeridas anteriormente. (C) y (D) nuevos motivos estructurales. Los círculos sombreados representan los átomos donadores de puentes de hidrógeno (nitrógeno u oxígeno).

Ahora bien, con lo que respecta a los fluorocromos intercalantes, se ha observado que “El intercalamiento en el DNA no es específico y es favorecido cuando las concentraciones del fluorocromo son menores a las del DNA, además la rotación restringida de la molécula (especialmente de moléculas con anillos aromáticos) ayuda a diferenciar entre la forma intercalada y la no intercalada (...) El colorante oxazol amarillo (YO) y naranja tiazol (TO) tienen interacciones no electrostáticas con el DNA, debido a su forma no plana que les permite adaptarse más fácil al doblez de las pares de bases. Se demostró también que los colorantes análogos a la quinoleína tienen especificidad por las regiones ricas en GC y los análogos a la piridina tienen especificidad por AT.” (Petty, B. et al. 2000), (Stockert, J. et al. 1997), (Goodsell, D. et al. 1986).

De esta forma, reuniendo la información anterior, se puede decir que si se pretende sintetizar nuevos compuestos cuyo fin sea unirse al DNA, se deben tomar los consejos aquí mencionados: (a) poseer grupos aminos u otro grupo que contenga hidrógenos para lograr entablar una interacción por puentes de hidrógeno, (b) que puede ser ionizado, preferentemente en su forma catiónica, o en su defecto, si es un colorante que se pensara

tiene un mecanismo intercalante, (c) que sea un catión, y (d) una molécula rígida y así favorecer las interacciones electrostáticas con los grupos fosfato cargados negativamente en el DNA o (e) que sea no plana para favorecer las interacciones no electrostáticas.

Finalmente, se sugiere que tomando en cuenta estas consideraciones, se realice un docking "in silico" para ver si las interacciones entre los nuevos compuestos a diseñar tienen una interacción con el DNA, utilizando como referencia uno de los colorantes comerciales ampliamente utilizados; como se muestra en la Figura 16 donde se observa la interacción entre el colorante POPOP y el surco menor del DNA y que el ligando está dentro del surco en un segmento que contiene A-T. La curva cerca del eje vertical del DNA corresponde a los hidrógenos de las adeninas.



**Figura 17.** Dibujo computacional de la posible unión del compuesto POPOP en el surco menor del DNA.

## CONCLUSIÓN

*Se sintetizaron compuestos 5-sustituídos derivados del 3,5-dimetil 4-nitro isoxazol mediante una ciclización-conjugación de una dicetona e hidroxilamina; los cuáles debido a la fluorescencia que presentan cuando se observan bajo luz UV y otras propiedades estructurales, se probaron como posibles fluorocromos en técnicas citogenéticas.*

*El resultado de las pruebas de micronúcleos, cromosomas y DNA “desnudo” no mostraron el efecto que se esperaba, es decir, la interacción o el intercalamiento de estos compuestos con el DNA con el fin de observar el efecto fluorescente tras esta interacción.*

*Los motivos por los cuales dicha afinidad no se observó, es debido a cuestiones estructurales, ya que se ha observado que para que un compuesto que pretenda fungir como colorante y tenga afinidad por el DNA debe cubrir ciertas características:*

*(a) Poseer grupos aminos u otro grupo que contenga hidrógenos para lograr entablar una interacción por puentes de hidrógeno*

*(b) Que puede ser ionizado, preferentemente en su forma catiónica*

*En su defecto, si es un colorante que tiene un mecanismo intercalante:*

*(c) Que sea un catión*

*(d) Que sea una molécula rígida y así favorecer las interacciones electrostáticas con los grupos fosfato cargados negativamente en el DNA*

*(e) Que tenga estructura no plana para favorecer las interacciones no electrostáticas.*

## PROSPECTIVAS

*A partir de lo que se ha descrito a lo largo de este trabajo, para trabajos posteriores se puede revisar las características que deben tener, propiamente, las moléculas que se pretenda deban tener afinidad por el DNA y en base a ello hacer un mejor diseño de nuevas moléculas. Además, antes de llevar a cabo la síntesis, sería recomendable el realizar un estudio “in silico” de las moléculas propuestas, para confirmar así su posible actividad, de una forma teórica.*

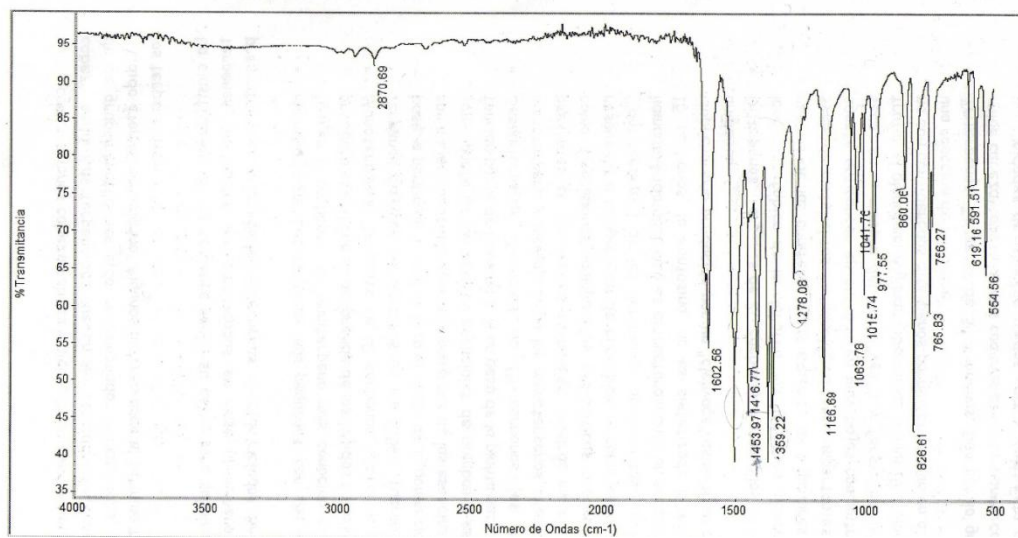
*Además, como se mencionó en este trabajo, el colorante etiquetado como LQM 103 presentó distintas coloraciones cuando fue expuesto a pH diferentes (ácido, neutro, básico), por lo que se podrían hacer estudios para poder proponer y utilizar dicho compuesto como indicador de pH.*

*Finalmente, basados en los compuestos sintetizados y tratando de que dicho compuestos adquieran ciertas características para presentar afinidad por el DNA, puede llevarse a cabo cierto tipo de reacciones que modifiquen la estructura ya establecida para darle a los compuestos dicha propiedad; tal es el caso de reducir el grupo nitro de los compuestos, y así obtener un grupo amina que puede donar hidrógenos para establecer interacciones puente de hidrógeno con el DNA.*

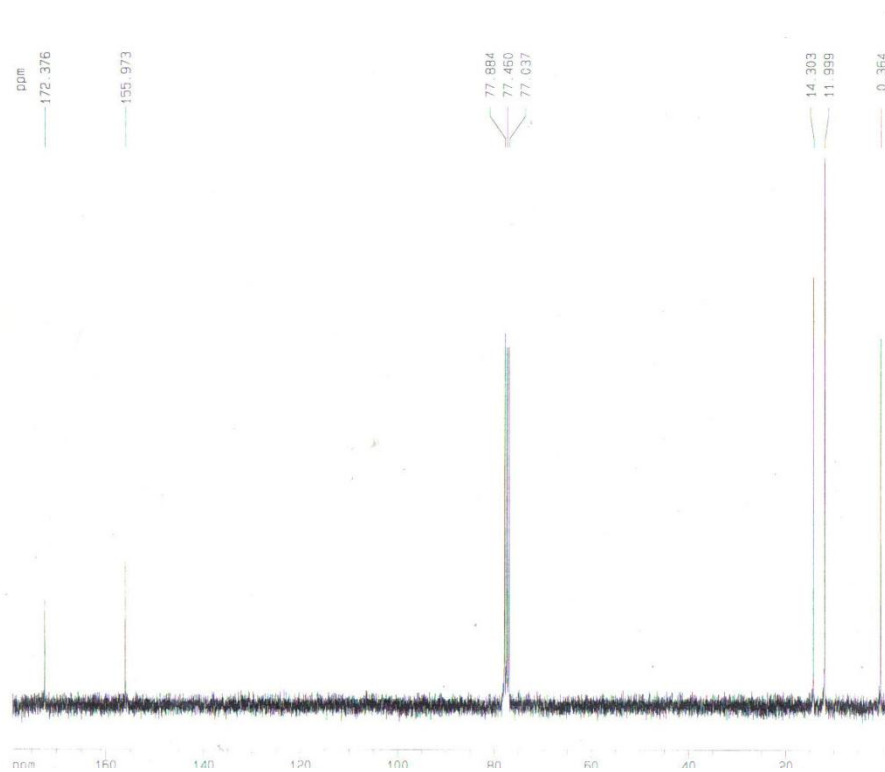


## ANEXOS

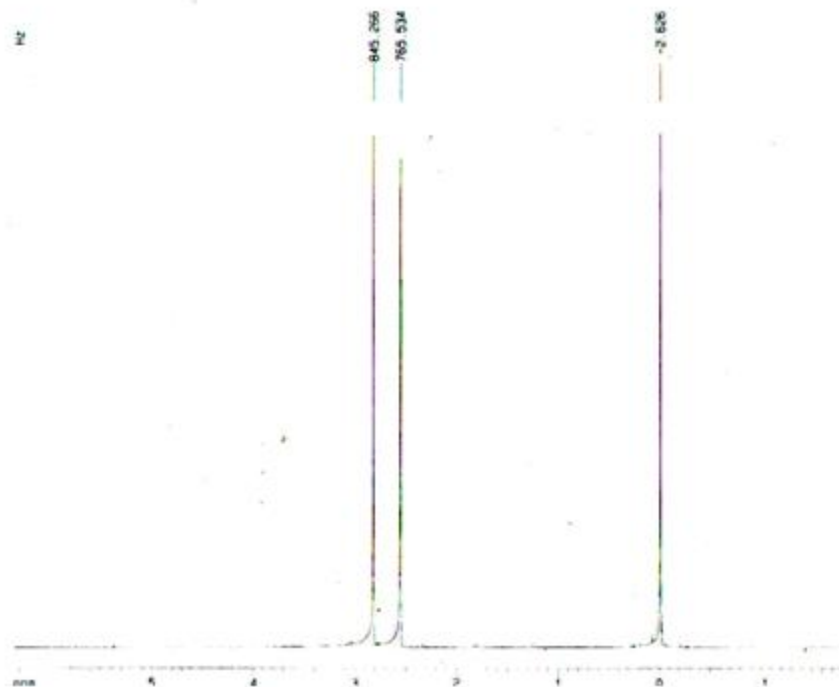
Isocx-2



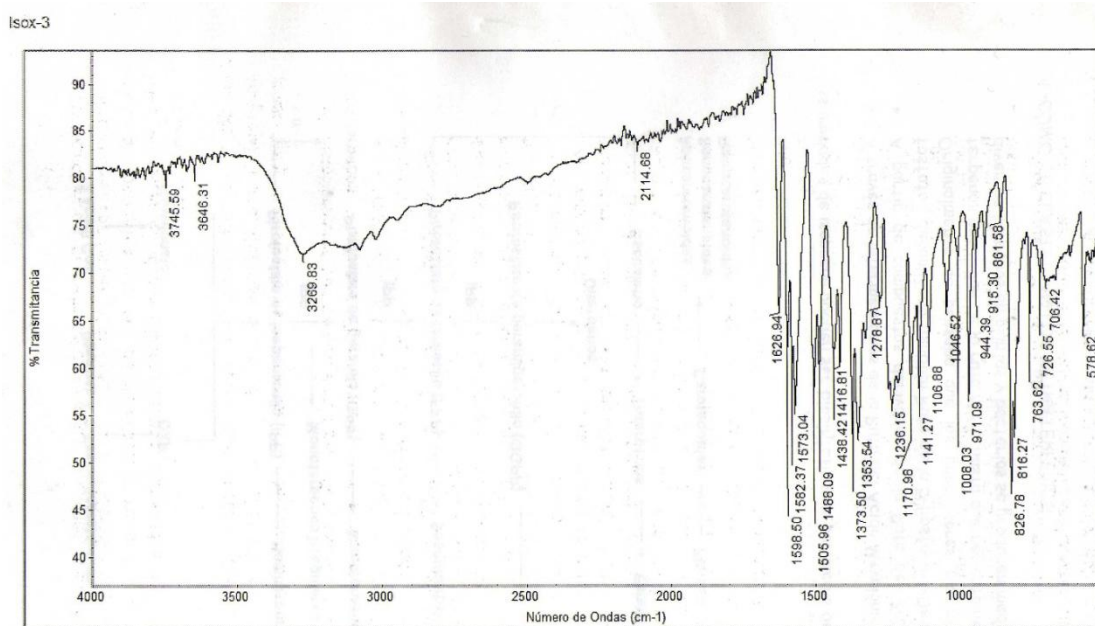
**Anexo 1. Espectro de IR del compuesto LQM 102**



**Anexo 2. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto LQM 102**



**Anexo 3.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto LQM 102

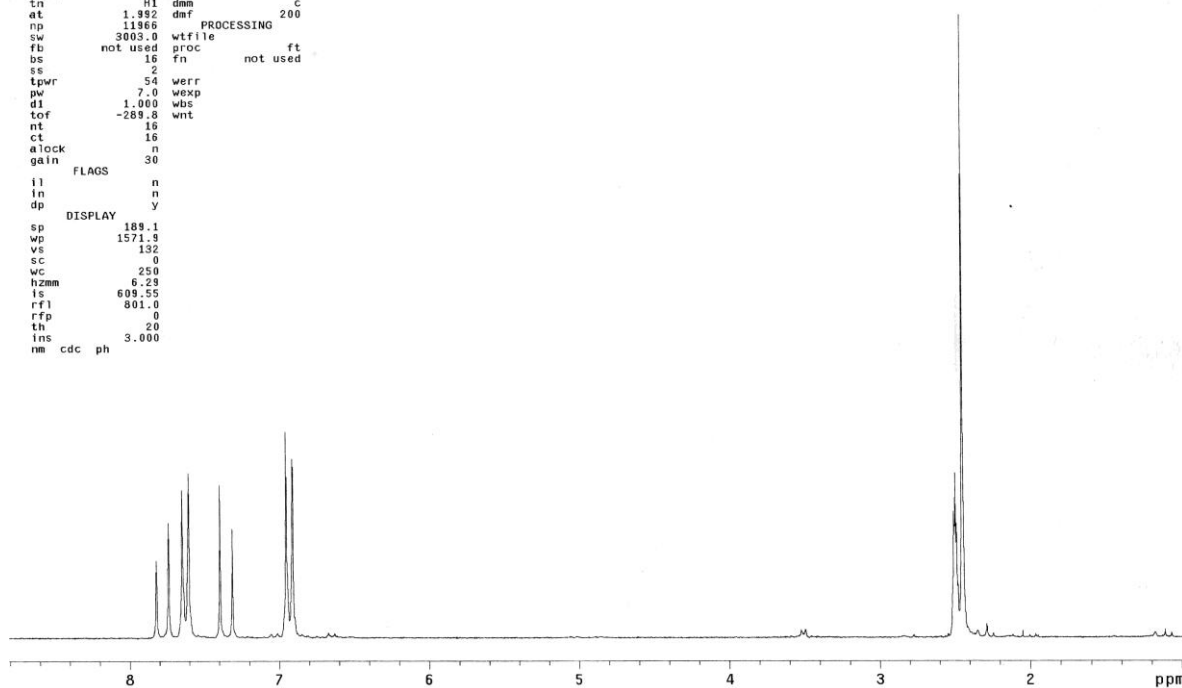


**Anexo 4.** Espectro de IR del compuesto LQM 103

```

isoxazoli-3-PRESAT_DMSO_2704604
exp71 PRESAT
SAMPLE DEC. & VT
date Apr 27 2004 dfrq 199.977
solvent DMSO dn H1
file exp dpwr 30
ACQUISITION dof 0
sfrq 199.977 dm nnn
tn H1 dmm c
at 1.952 dmf 200
np 11866 PROCESSING
sw 3003.0 wtfile
fb not used proc ft
bs 16 fn not used
ss 2
tpwr 54 werr
pw 7.0 wexp
dl 1.000 wbs
tof -289.8 wnt
nt 16
ct 16
alock n
gain 30
FLAGS
il n
in n
dp y
DISPLAY
sp 189.1
wp 1571.9
vs 132
sc 0
wc 250
hzam 6.29
fs 609.55
rf1 801.0
rfp 0
th 20
ins 3.000
rm cdc ph

```

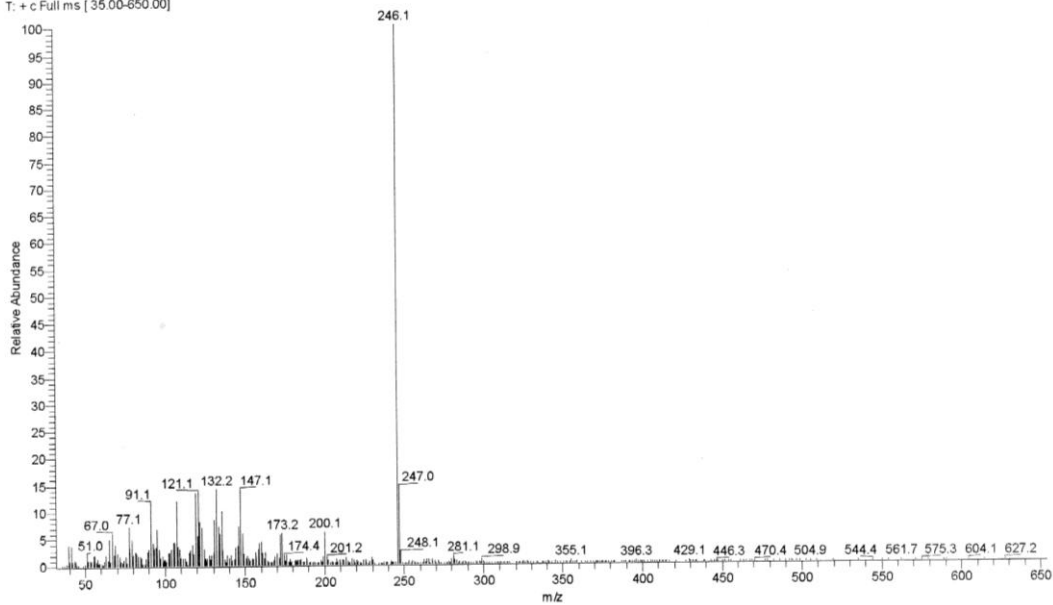


**Anexo 5. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto LQM 103**

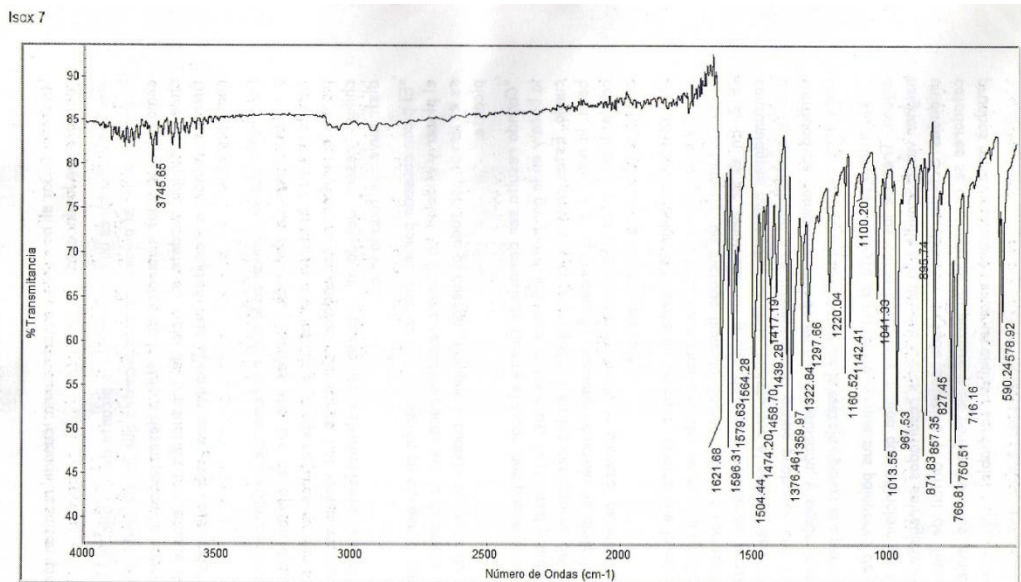
```

ISOX#2057 RT: 22.99 AV: 1 SB: 299 21.16-22.77, 19.64-21.04 NL: 3.20E4
T: + c Full ms [35.00-650.00]

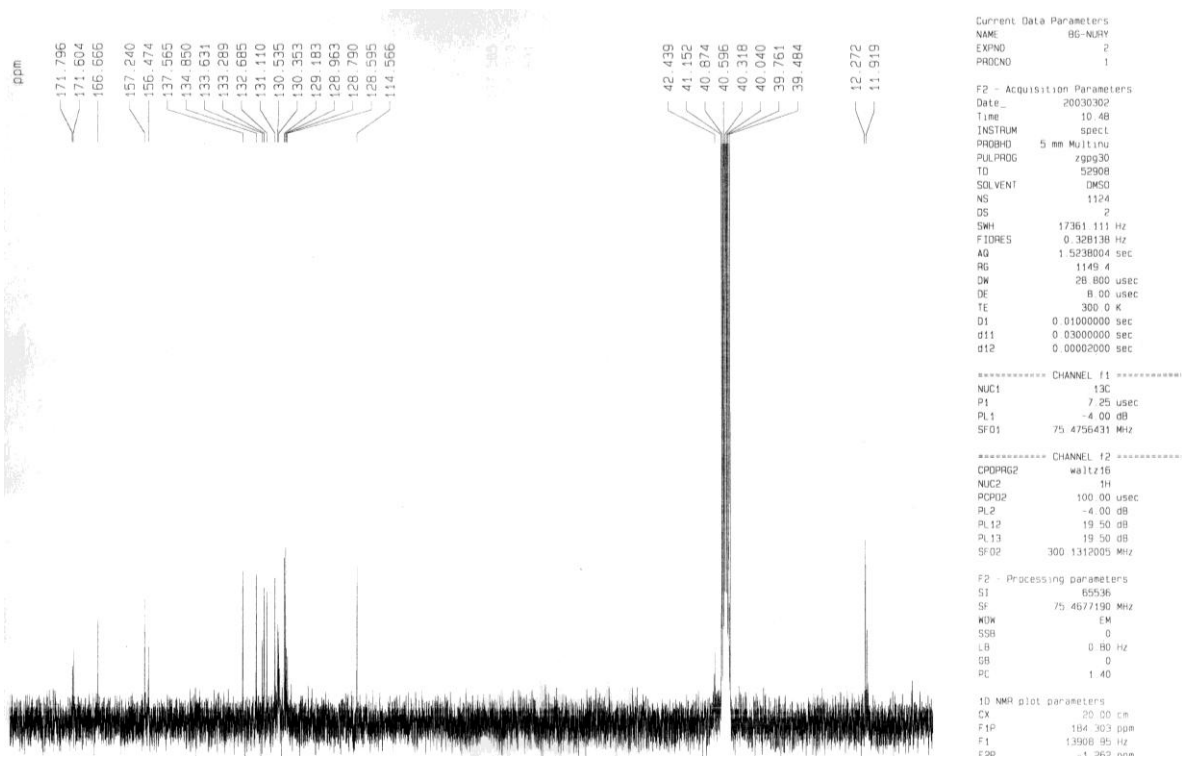
```



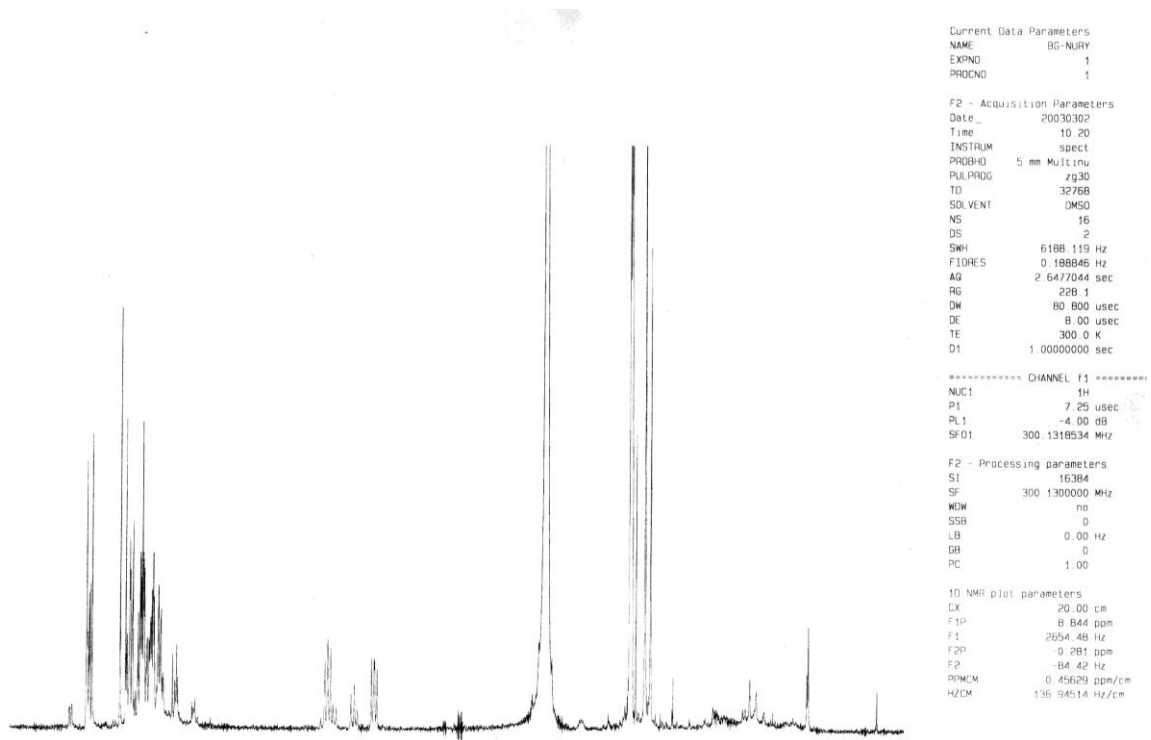
**Anexo 6. Espectro de Masas del compuesto LQM 103**



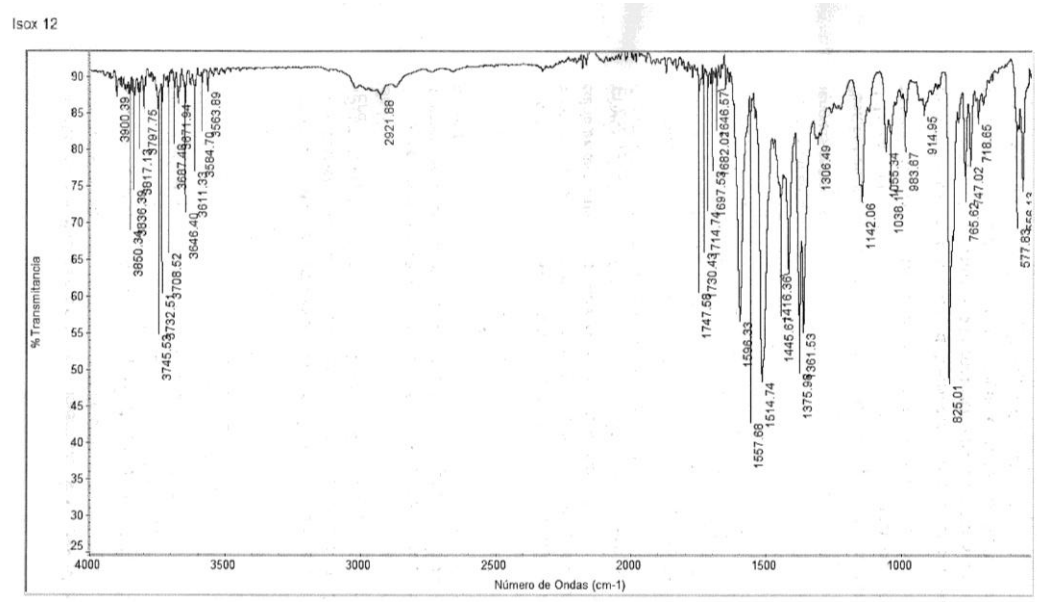
Anexo 8. Espectro de IR del compuesto LQM 107



Anexo 9. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto LQM 107



**Anexo 10. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto LQM 107**

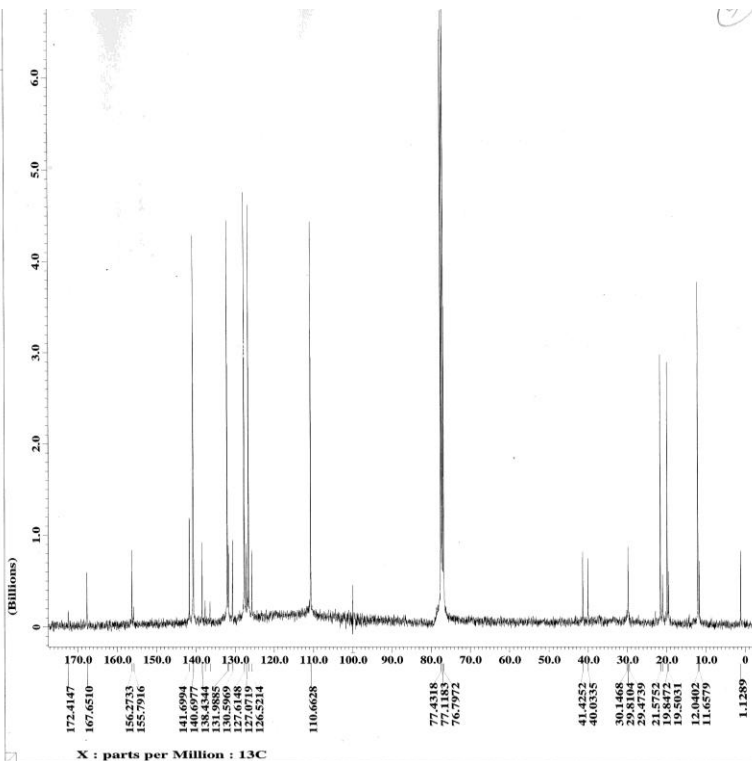


**Anexo 11. Espectro de IR del compuesto LQM 112**

**JEOL**

---- ACQUISITION PARAMETERS ----  
File Name = Magali\_13c\_spectrum\_32  
Author = Delta  
Sample ID = 3248  
Content = Single Pulse with Broa  
Creation Date = 30-JAN-2003 09:24:40  
Revision Date = 30-JAN-2003 09:27:25  
Spec Site = Eclipse-400  
Spec Type = DELTA\_NMR  
Data Format = 1D\_COMPLEX  
Dimensions = X  
Dim Title = 13C  
Dim Size = 32768  
Dim Units = [ppm]  
Acq\_delay = 37.2[us]  
Autolock\_level = 180  
Delay\_of\_start = 1[s]  
Digital\_filter = FALDZ  
Experiment = single\_pulse\_dec  
Field\_strength = 9.389766[?]T  
Filter\_factor = 1  
Filter\_mode = BUTTERWORTH  
Irr\_domain = 1H  
Irr\_freq = 399.783677[S(MHz)]  
Irr\_noise = WALTZ  
Irr\_offset = -3.7[ppm]  
Iterations = 1  
Probe\_id = 2564  
Recvr\_gain = 27  
Relaxation\_delay = 0.6[s]  
Scans = 27973  
Solvent = CHLOROFORM-D  
Spin\_get = 16[MHz]  
Temp\_delay = 0[s]  
Temp\_get = 14.8[DC]  
X\_acq\_duration = 1.3608896[s]  
X\_domain = 13C  
X\_freq = 100.53535686[MHz]  
X\_offset = 100[ppm]  
X\_points = 32768  
X\_prescans = 4  
X\_pulse = 9.7222222[us]  
X\_resolution = 0.7687282[Hz]  
X\_sweep = 25.18891688[kHz]

130y 12

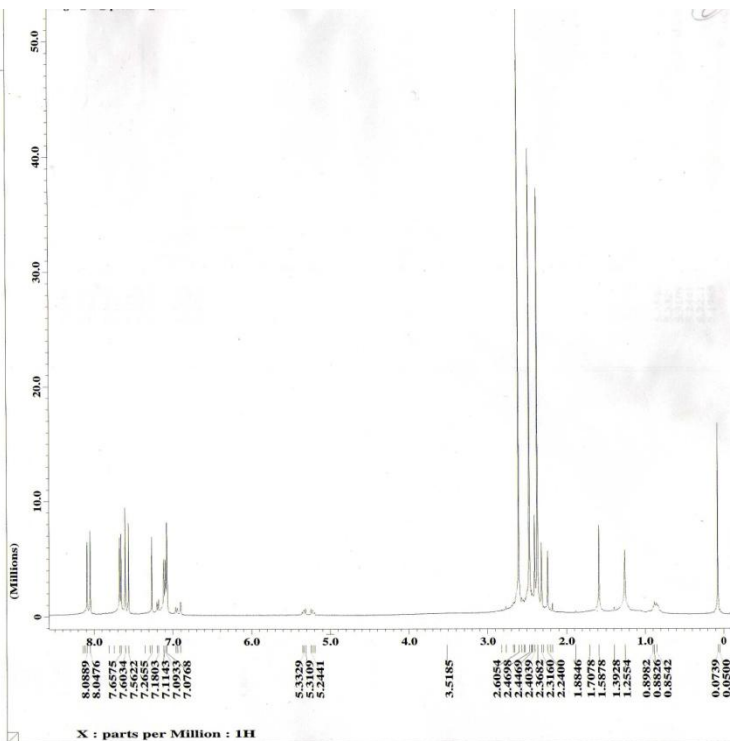


Anexo 12. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto LQM 112

**JEOL**

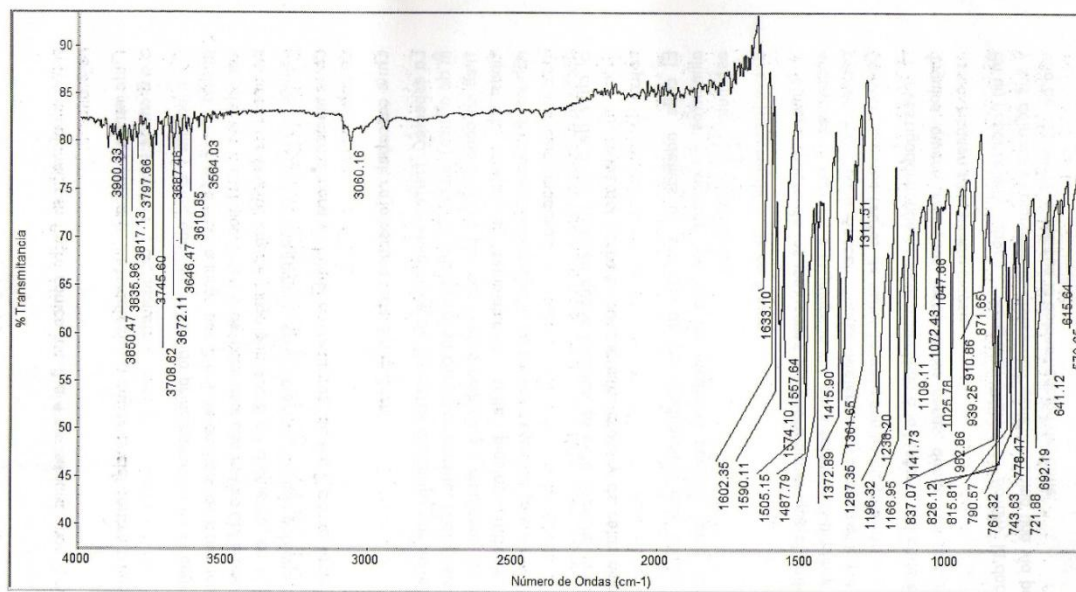
---- ACQUISITION PARAMETERS ----  
File Name = Magali\_1H\_spectrum\_324  
Author = Delta  
Sample ID = 3248  
Content = Single Pulse Experi  
Creation Date = 28-JAN-2003 18:50:21  
Revision Date = 30-JAN-2003 09:22:04  
Spec Site = Eclipse-400  
Spec Type = DELTA\_NMR  
Data Format = 1D\_COMPLEX  
Dimensions = X  
Dim Title = 1H  
Dim Size = 16384  
Dim Units = [ppm]  
Acq\_delay = 0.1634[ms]  
Autolock\_level = 180  
Delay\_of\_start = 1[s]  
Digital\_filter = FALDZ  
Experiment = single\_pulse\_exp  
Field\_strength = 9.389766[?]T  
Filter\_factor = 1  
Filter\_mode = BUTTERWORTH  
Irr\_noise = WALTZ  
Iterations = 0  
Probe\_id = 2564  
Recvr\_gain = 17  
Relaxation\_delay = 4[s]  
Scans = 16  
Solvent = CHLOROFORM-D  
Spin\_get = 16[MHz]  
Temp\_delay = 0[s]  
Temp\_get = 17.2[DC]  
X\_acq\_duration = 2.7332128[s]  
X\_domain = 1H  
X\_freq = 399.7841973[MHz]  
X\_offset = 5[ppm]  
X\_points = 16384  
X\_prescans = 0  
X\_pulse = 6.7[us]  
X\_resolution = 0.16616906[Hz]  
X\_sweep = 5.99880024[kHz]

130xaz01 12

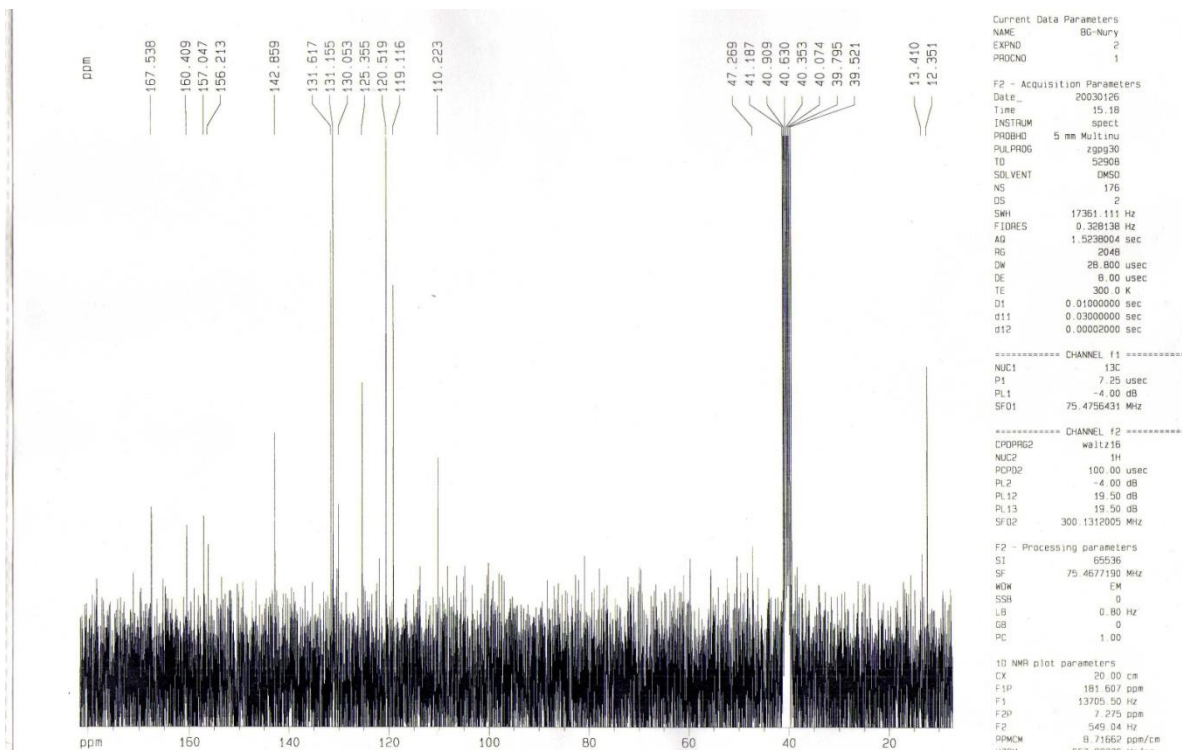


Anexo 13. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto LQM 112

Isos 15

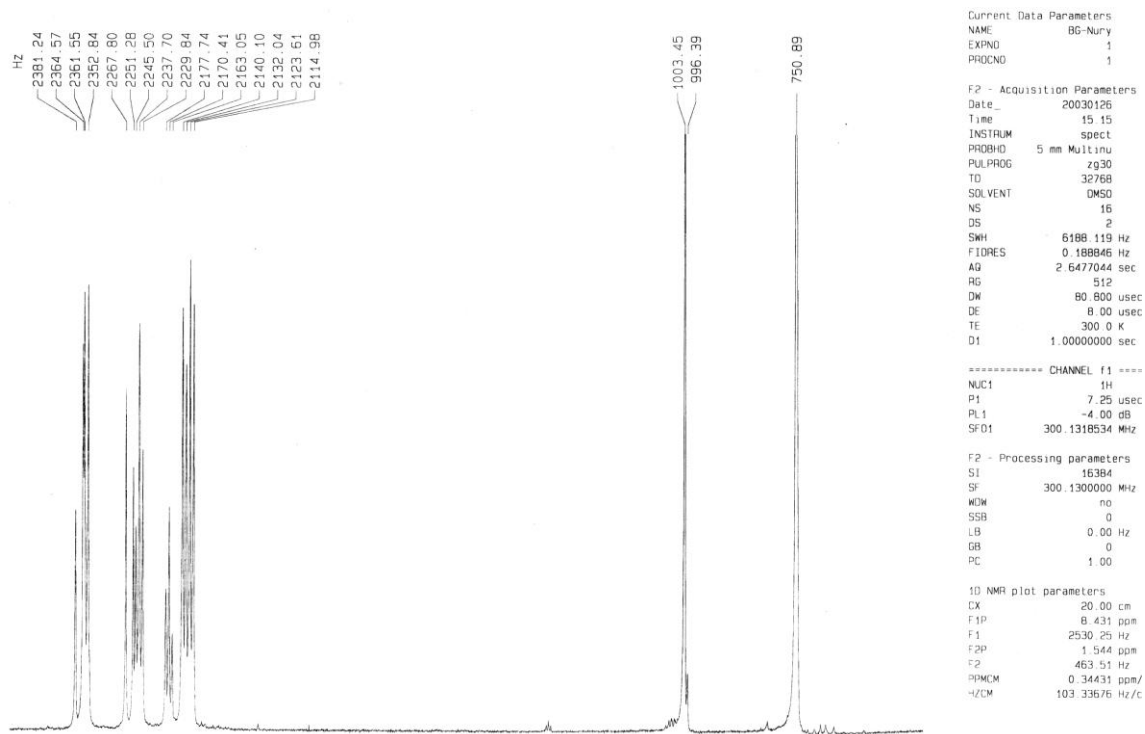


Anexo 14. Espectro de IR del compuesto LQM 115

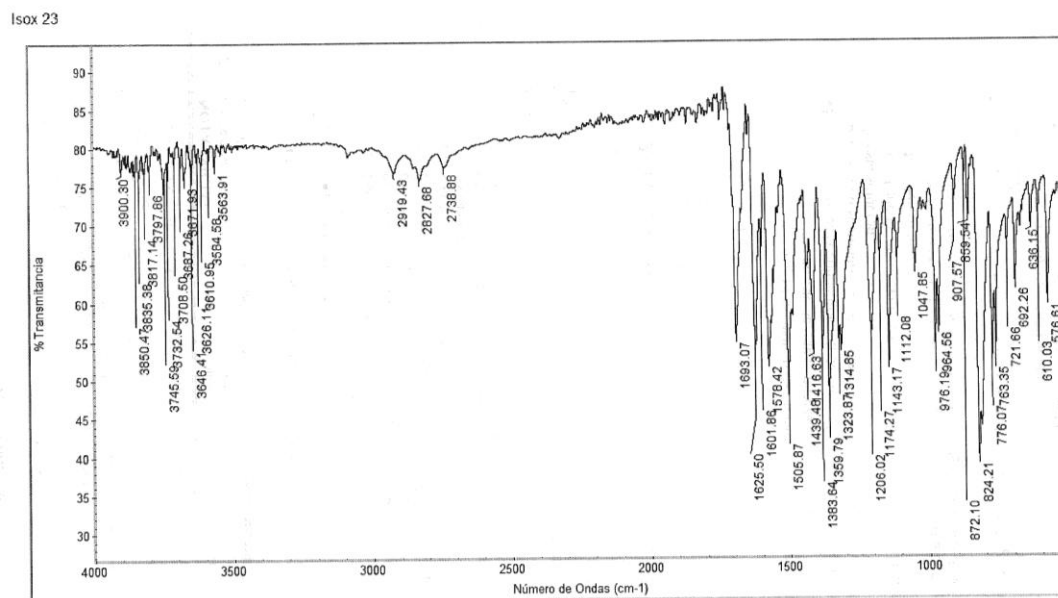


Anexo 15. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto LQM 115





**Anexo 16. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto LQM 115**



**Anexo 17. Espectro de IR del compuesto LQM 123**



## REFERENCIAS

- 1) Adamo, M. & Suresh, S. (2009). Vinylogous nitroaldolo (Henry) reaction using 3,5-diethyl-4-nitroisoxazole and carbonyl compounds. *Tetrahedron*, 65, 990-997.
- 2) Arencibia, D. F. & Rosario, L. A. (2003). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. *Retel (Revista de Toxicología en línea)*, 24-41. Recuperado de [http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/20003.pdf](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/20003.pdf)
- 3) Arencibia, D. F., Vidal, A., Rosario, L. A., Suárez, Y. E. & Delgado, L. (2011). Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *VacciMonitor*, 20, 28-33.
- 4) Ávila, G. et. al. (2009). *Química Orgánica: experimentos con un enfoque ecológico*. México: UNAM, Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial
- 5) Ball, G., Parton, R. M., Hamilton, R. S. & Davis, I. (2012). A Cell Biologist's Guide to High Resolution Imaging. *Methods in Enzymology*, 504, 30-51.
- 6) Crissman, H. A. & Hiron, G. T. (1994). Staining of DNA in Live and Fixed Cells. *Methods in Cell Biology*, 41, 195-209.
- 7) Davis, R. & Wells, C. H. J. (1984). *Spectral Problems in Organic Chemistry*. England: International Textbook Company.
- 8) Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455, 81-95.
- 9) Flors, C. & Earnshaw, W. C. (2011). Super-resolution fluorescence microscopy as a tool to study the nanoscale organization of chromosomes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15, 834-844.
- 10) García, P., Minckman, J., Coco, I., Neuspiller, F. & Coco, R. (2008). Anomalía estructural del cromosoma X asociado a falla ovárica prematura. *Reproducción*, 23, 53-61.
- 11) Goodsell, D. & Dickerson, R. E. (1986). Isohelical Analysis of DNA Groove-Binding Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 29, 727-733.

- 12) Gray, J. W., Kallioniemi A., Kallioniemi O., Pallavicini, M., Waldman, F., & Pinkel, D. (1992). *Molecular cytogenetics: Diagnosis and prognostic assessment. Current Opinion in Biotechnology*, 3, 623-631.
- 13) Herrera, J. (2007). *La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. Agronomía Colombiana*, 25, 26-35.
- 14) Ihmels, H., Faulhaber, K., Vedaldi, D., Dall'Acqua, F. & Viola G. (2005). *Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-stranded DNA. Part 2: The Annelated Quinilizinium Ion as a Structural Motif in DNA Intercalators. Photochemistry and Photobiology*, 81, 1107-1115.
- 15) Ishikawa, H., Ankerhold, R. & Drummen, G. (2012). *Advanced Fluorescence Microscopy Techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. Molecules*, 17, 4047-4132.
- 16) Kahne, D. (1995). *Strategies for the design of minor grooves binders: a re-evaluation based on the emergence of site-selective carbohydrate binders. Chemistry and Biology*, 2, 7-12.
- 17) Kiernan, J. A. (2006). *Dyes and other colorants in microtechnique and biomedical research. Coloration Technology*, 122, 1-21.
- 18) Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. & Kim, Y. H. (2012). *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 20, 3923-3933.
- 19) Liberman, A., Druker, J., Refojo, D. & Arzt, E. (2008). *Mecanismos moleculares de acción de algunas drogas inmunosupresoras. Medicina*, 68, 455-464.
- 20) Ling, H., Ting, W. & Leu, J. (2011). *Effects of environmentally benign solvents in the agarose gel electrolytes on dye-sensitized solar cells. Electrochemical Acta*, 56, 5904-5909.
- 21) Madhavi, K., Bharathi, K. & Prasad, KSVRG. (2010). *Synthesis and evaluation of 3-methyl-4-nitro-5-(substitutedstyryl) isoxazoles for antioxidant and anti-inflammatory activities. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1, 1073-1082.

- 22) Mahieu, L., Falgayrettes, P., Nativel, L., Gall, P., Costa, L., Salehzada, T. & Bisbal, C. (2010). Near-field microscopy and fluorescence spectroscopy: application to chromosomes labelled with different fluorophores. *Journal of Microscopy*, 238, 36-43.
- 23) Martin, R., Leonhardt, H. & Cardoso, M.C. (2005). DNA Labeling in Living Cells. *Cytometry Part A*, 67A, 45-52.
- 24) Matselyukh, B. P., Matselyukh, D. Ya., Kovalska, V. B., Volkova, K. D., Kryvorotenko, D. V. & Yarmoluk, S. M. (2005). Studies of mutagenic activity of fluorescent DNA-sensitive monomethinecyanine and carbocyanine dyes in Ames test. *Ukrainica Bioorganica Acta*, 2, 27-34.
- 25) McMurry, J. (2008). *Química Orgánica. México: Thomson.*
- 26) Petty, J. T., Bordelon, J. A. & Robertson, M. E. (2000). Thermodynamic Characterization of the Association of Cyanine Dyes with DNA. *J. Phys. Chem.*, 104, 7221-7227
- 27) Pinho e Melo, T. M. V. D. (2005). Recent advances on the synthesis and reactivity of isoxazoles. *Current Organic Chemistry*, 9, 925-958.
- 28) Pretsch, E., Bühlmann, P. et. al. (2005). *Determinación estructural de compuestos orgánicos. Barcelona: MASSON*
- 29) Resch U., Grabolle, M., Cavaliere, S., Nitschke, R. & Nann, T. (2008). Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods*, 5, 763-777.
- 30) Reyes Pineda, M. S. (2011). *Manual de las técnicas más representativas del paquete terminal de citogenética que incluye la implementación de diagramas de flujo descriptivos y ecológicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México*
- 31) Rivera Mancía, S. Y. (2004). *Utilización de compuestos orgánicos fluorescentes en tinciones citogenéticas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México*
- 32) Stockert, J. C., Pelling, C. & Espada J. (1997). New cationic fluorochromes from diaryloxazole scintillators: fluorescence of chromatin DNA induced by N-quaternary POPOP derivatives. *Acta histochemica*, 99, 195-205.

33) Stockert, J. C., Pinna, E., Bella, J.L. & Lisanti, J. A. (2005). DNA-binding fluorochromes: correlation between C-banding of mouse metaphase chromosomes and hydrogen bonding to adenine-thymine base pairs *Acta Histochemica*, 106, 413-420.

34) Sugden, J. K. (2004). Photochemistry of dyes and fluorochromes used in biology and medicines: some physicochemical background and current applications. *Biotechnic & Histochemistry*, 79, 71-90.

35) Zamora, A., Gómez, B. C., Ramos, M. L., Batista, C. M., Luna, J., González, A., Rodríguez, J. & Zúñiga, G. M. (2008). Los felinos: ¿Una alternativa en estudios de toxicología genética?. *Rev. Biol. Trop.*, 56, 969-974.

36) Zasedatelev, A. S. (1991). Geometrical correlations useful for design of sequence-specific DNA narrow groove binding ligands. *FEBS Letters*, 281, 209-211.